



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL**

Mirelle Sifroni Farias

**DANO AO DNA, CITOTOXICIDADE, EFEITO
ANTIPROLIFERATIVO E ANTITUMORAL DE 1,4-
NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS**

Florianópolis, março de 2014.

Mirelle Sifroni Farias

**DANO AO DNA, CITOTOXICIDADE, EFEITO
ANTIPROLIFERATIVO E ANTITUMORAL DE 1,4-
NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS**

**Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica, da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito para a
obtenção do grau de Doutor em
Bioquímica.**

**Orientadora: Profa. Dra. Rozangela
Curi Pedrosa**

Florianópolis, 2014.

Farias, Mirelle Sifroni
DANO AO DNA, CITOTOXICIDADE, EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E
ANTITUMORAL DE 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS / Mirelle
Sifroni Farias ; orientadora, Rozangela Curi Pedrosa -
Florianópolis, SC, 2014.
159 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Bioquímica. 3. Atividade antitumoral.
4. Dano ao DNA. 5. 1,4-naftoquinonas substituídas. I.
Pedrosa, Rozangela Curi. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

“Dano ao DNA, citotoxicidade, efeito antiproliferativo e antitumoral de 1,4 naftoquinonas substituídas”

por

Mirelle Sifroni Farias

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 07/PPGBQA/2014) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:

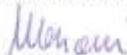


Dr(a) Rozângela Curi Pedrosa (BQA/CCB/UFSC)

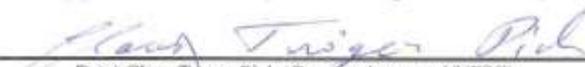
Banca examinadora:



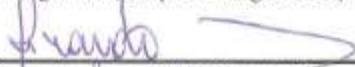
Dr(a) Eduardo Antônio Ferreira (FCE/Campus Ceilândia/UNB)



Dr(a) Maria Helena Rossi (Instituto Biológico de São Paulo)



Dr(a) Claus Tröger Pich (Campus Araranguá/UFSC)



Dr(a) Ricardo José Nunes (QMC/CFM/UFSC)



Dr(a) Fátima Regina Mota Barreto (BQA/CCB/UFSC)

Coordenador:



Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 10 de março de 2014

Este trabalho é dedicado a minha amada família e Alexandre Wolf.

AGRADECIMENTOS

A DEUS,

por minha vida, pelas oportunidades e por se mostrar sempre presente.

Aos meus pais,

pelo amor, pela confiança e por me ensinarem a nunca desistir.

Aos meus irmãos, Marcelo, Mariana, Tiane e Tiago,

pelo amor e por tudo que compartilhamos.

Ao meu amado Alexandre,

por todo amor e paciência e por me ajudar a seguir em frente a cada dia.

À minha orientadora, Prof. Dra. Rozangela Curi Pedrosa,

you were much more than my professor and my advisor, you were above all my friend. Thank you for all the knowledge transmitted, for the teachings of life, for trusting in me, for welcoming me in difficult moments and for encouraging me always.

Ao grupo Toxicology and Cancer Biology Research Group (GTOX)

da Université catholique de Louvain (UCL) de Bruxelas, Bélgica, em especial ao Prof. Dr. Pedro Buc Calderon, pelo apoio e por todo o conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Julio Benites e seu grupo de pesquisa,

pela doação das 1,4-naftoquinonas substituídas e por seu apoio técnico científico.

Ao Prof. Dr. Claus Tröger Pich,

pelo apoio com os ensaios com DNA.

Aos meus colegas do LABIOEX,

Karina Bettega Felipe, João Francisco Gomes Correia, Tânia Mara Fischer Günther, Fabiana Ourique, Eduardo Benedetti Parisotto, Valdelúcia Maria Alves de Souza Grinevicius, Nádia Falcão Buckner, Carla Cristine Baron, Marjorie Marin, Nádia Motta.

À banca examinadora,

Prof. Dra. Fátima Mena Barreto, Prof. Dr. Ricardo José Nunes, Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferreira, Prof. Dr. Claus Tröger Pich, Dra. Maria Helena Rossi e Prof. Dra. Andreza Fabro de Bem.

A CAPES,

pela bolsa concedida.

Finalmente, a todos os meus amigos,

que mesmo distante fisicamente sempre me incentivaram e me apoiaram nas decisões da vida.

MUITO OBRIGADA!

**“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”
(Benjamin Disraeli).**

RESUMO

As quinonas são uma classe de substâncias químicas de interesse na terapêutica do câncer, visto que algumas delas apresentam potencial antitumoral. Pesquisas sugerem que o efeito antitumoral destes compostos pode ser potenciado por substituições estratégicas dos substituintes ligados ao núcleo quinóide. Desta forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar o potencial citotóxico, antiproliferativo e antitumoral bem como o mecanismo molecular de ação de 1,4-naftoquinonas substituídas. Dentre os compostos avaliados, os que apresentaram maior atividade citotóxica para linhagem tumoral MCF7 (câncer de mama humano), avaliada pelo método do MTT, foram DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 ($CI_{50} < 25 \mu M$). Sugerindo-se que o efeito citotóxico é influenciado principalmente por seus substituintes onde grupos doadores e aceptores de elétrons modulam as propriedades eletrônicas do átomo de nitrogênio presente nas moléculas, facilitando ou dificultando a ocorrência do ciclo redox. Além disso, estes mesmos quatro compostos inibiram a formação de colônias celulares, promovendo um efeito citostático. Através do ensaio de fragmentação do DNA plasmidial e ensaio cometa constatou-se que as 1,4-naftoquinonas substituídas promoveram dano direto ao DNA e que a fotoativação pela luz UV-A (365 nm) potencializou este dano. Para verificar se as mesmas possuíam interação direta com o DNA, foi utilizada a técnica de varredura por espectrometria, utilizando-se o CT-DNA. Foi observado que os compostos interagem com o DNA, promovendo um efeito hipocrômico, indicando que a interação seja por intercalação, o que foi confirmado pelo ensaio de fluorescência, utilizando o brometo de etídeo como agente intercalante. O dano ao DNA induzido pelos compostos foi também confirmado por imunoeletroforese, as naftoquinonas substituídas aumentaram a fosforilação da histona $\gamma H2Ax$. Por outro lado, a citometria de fluxo demonstrou que os compostos avaliados promoveram a parada do ciclo celular na fase G2, o que foi também confirmada pelo ensaio de imunoeletroforese, onde não se observou inibição na expressão da proteína cdk2, o que poderia ser devido ao fato desta cinase dependente de ciclina estar particularmente envolvida na regulação do ciclo celular na fase G1. Além disso, também foi observado que os compostos promoveram a morte celular predominantemente por apoptose independente de caspase e/ou necrose programada tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Considerando que estes compostos aumentaram a expressão da p53 e não promoveram a clivagem da PARP. Diante desses resultados, sugere-se que os compostos possam ter

promovido a morte celular por necrose programada ou *necrosis like*/apoptose independente de caspase. Sugere-se ainda que os efeitos citotóxicos, genotóxicos e citostático promovido pelos compostos se devam a geração de EROS, que foi observado pelo ensaio com DCFH-A, onde os compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 apresentaram um aumento significativo de geração de EROs (7874,22; 6056,37; 10547,47 e 3833,33 unidades de fluorescência/mg de proteína) em relação ao controle negativo (1493,10 unidades de fluorescência/mg de proteína). Os ensaios *in vivo*, demonstraram que DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 apresentaram efeito antitumoral, se destacando o composto DPB4. Em relação ao tipo de morte celular *in vivo* foi observado que os compostos aumentaram o percentual de células apoptóticas iniciais e principalmente tardias e/ou necróticas, confirmando os resultados visualizados *in vitro*. Além disso, foi investigado se os compostos poderiam também ter uma atividade antiangiogênica, sendo este efeito observado para todos os compostos avaliados (DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5), destacando-se o composto DPB2 que em concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{M/ml}$ reduziram o percentual de vasos em 67,69; 53,84 e 76,92%. Por fim, sugere-se que os efeitos mediados pelas 1,4-naftoquinonassubstituídas em estudo se devam ao sinergismo de três mecanismos: ciclo redox, pelo aumento da geração de EROs, intercalação ao DNA e/ou inibição da topoisomerase II, que consequentemente induz a morte das células tumorais.

Palavras-chave: 1,4-naftoquinonas substituídas, dano ao DNA, atividade antitumoral.

ABSTRACT

Quinones are a class of chemicals of interest in cancer therapy, since some of them have antitumor potential. Research suggests that the antitumor effect of these compounds can be potentiated by strategic substitutions quinoid substituents attached to the core. Thus, this study aimed to characterize the cytotoxic, antiproliferative and antitumor potential as well as the molecular mechanism of action of substituted 1,4- naphthoquinones. Among the compounds evaluated, showed the highest cytotoxic activity to tumor cell line MCF7 (human breast cancer), as evaluated by the MTT method were DPB1, DPB2, DPB4 and DPB5 ($IC_{50} < 25$ mM) having substituents attached directly to the naphthoquinone nucleus. Suggesting that the cytotoxic effect is mainly influenced by their substituents groups where donors and electron acceptors modulate the electronic properties of this nitrogen atom in molecules, facilitating or hindering the occurrence of the redox cycle. Furthermore, these same four compounds inhibited the formation of cell colonies by promoting a cytostatic effect. Through the fragmentation test and the plasmid DNA comet assay was found that 1,4-naphthoquinones substituted promoted direct DNA damage and that the photoactivation by UV-A light (365 nm) potentiated this damage. To verify whether they had direct interaction with DNA, the technique of scanning spectrometer was used, using the CT-DNA. It was observed that the compounds interact with the DNA, providing a hypochromic effect, indicating that the interaction is by intercalation, which was confirmed by fluorescence assay using ethidium bromide as the intercalating agent. The DNA damage induced by the compounds was also confirmed by immunoblot, substituted naphthoquinones increased phosphorylation of histone γ H2Ax. Furthermore, flow cytometry showed that the compounds evaluated promoted cell cycle arrest in the G2 phase, which was also confirmed by immunoelectrophoresis assay where no inhibition was observed in the expression of the cdk2 protein, which could be due to the fact this cyclin dependent kinase to be particularly involved in the regulation of the cell cycle in the G1 phase. Moreover, it was observed that the compounds promoted cell death predominantly by caspase -independent apoptosis and / or programmed necrosis both *in vivo* and *in vitro*. Whereas these compounds increased the expression of p53 and did not promote the cleavage of PARP. From these results, it is suggested that the compounds may have promoted cell death by necrosis or programmed like necrosis. It is also suggested that the cytotoxic, genotoxic and cytostatic effects

promoted by the compounds are due to generation of ROS, which was observed by DCFH-A assay, where DPB1 , DPB2 , DPB4 and DPB5 compounds showed a significant increase in ROS generation (7874.22, 6056.37, 3833.33 and 10547.47 fluorescence units / mg protein) compared to negative control (1493.10 fluorescence units/mg protein). *In vivo* assays showed that DPB1, DPB2, DPB4 and DPB5 showed antitumor effect, highlighting the compound DPB4. Regarding the type of cell death was observed that compounds increased the percentage of early apoptotic cells and mostly late and/or necrotic, confirming the results shown *in vitro*. Furthermore, we investigated whether the compounds could also have a antiangiogenic activity, this effect being observed for all compounds evaluated (DPB1, DPB2, DPB4 and DPB5), highlighting the compound DPB2 that at concentrations of 5, 10 and 20 μ M /ml reduced the percentage of vessels in 67.69, 53.84 and 76.92 %. Finally, it is suggested that the effects mediated by substituted 1,4- naphthoquinones study are due to the synergism of three mechanisms: redox cycle by the increased generation of ROS, and DNA intercalating / or inhibition of topoisomerase II, which consequently leads to tumor cell death.

Keywords: Substituted 1,4- naphthoquinones. DNA damage. Antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de regulação do ciclo celular.	36
Figura 2. Esquema metástase	37
Figura 3. Mecanismos de interação de agentes antitumorais com ácidos nucleicos e proteínas.	40
Figura 4. Vias de morte celular por apoptose.	44
Figura 5. Estruturas químicas de quinonas.	46
Figura 6. Ciclo redox induzido por quinonas.	48
Figura 7. Ação das topoisomerases I e II.	49
Figura 8. Estruturas químicas das 1,4-naftoquinonas substituídas.	56
Figura 9A. Esquema de Corte da Molécula de DNA Plasmidial.	60
Figura 9B. Fotografia de um gel de agarose demonstrando a separação das formas do DNA plasmidial.	61
Figura 9C. Aparência típica de um gel obtido a partir de análise de diferentes concentrações de compostos e consequente corte do DNA plasmidial.	61
Figura 10. Classificação dos danos no DNA.	66
Figura 11. Efeitos das 1,4-naftoquinonas substituídas sobre a capacidade proliferativa de células MCF7.	80
Figura 12. Efeito sobre o DNA plasmidial das 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1 a DPB9) na concentração de 0,05 μM após 16 horas de incubação a 50°C.	81
Figura 13A. Dano direto ao DNA plasmidial de DPB1 (0,05 μM) na presença de luz UV-A (pré-incubação de 30 minutos).	84
Figura 13B. Dano direto ao DNA plasmidial de DPB2 (0,05 μM) na presença de luz UV-A (pré-incubação de 30 minutos).	86
Figura 13C. Dano direto ao DNA plasmidial de DPB4 (0,05 μM) na presença de luz UV-A (pré-incubação de 30 minutos).	88
Figura 13D. Dano direto ao DNA plasmidial de DPB5 (0,05 μM) na presença de luz UV-A (pré-incubação de 30 minutos).	90
Figura 14A. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB1 (20 μM) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.	93
Figura 14B. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB2 (20 μM) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.	94
Figura 14C. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB3 (20 μM) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.	95
Figura 14D. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB4 (20 μM) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.	96

Figura 14E. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB5 (20 μM) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.	97
Figura 14F. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB6 (20 μM) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.	98
Figura 14G. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB7 (20 μM) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.	99
Figura 14H. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB8 (20 μM) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.	100
Figura 14I. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB9 (20 μM) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.	101
Figura 15. Efeito da adição das 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1, DPB2, DPB3, DPB4 e DPB5- 1, 10, 20, 30 e 40 μM) e doxorrubicina (1, 10, 20, 30 e 40 μM) na intensidade de fluorescência do Brometo de Etídeo (30 μM) ligado ao DNA (20 μM).	103
Figura 16. Atividade genotóxica das 1,4-naftoquinonas substituídas DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 em células de câncer de mama humano (células MCF7).	105
Figura 17. Classe de danos ao DNA apresentadas pelas 1,4-naftoquinonas substituídas em células MCF7.	105
Figura 18. Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas sobre o ciclo celular de células MCF7.	107
Figura 19. Tipo de morte celular induzida pelo tratamento de 1,4-naftoquinonas substituídas <i>in vitro</i> .	110
Figura 20. Conteúdo intracelular de EROs mensurados após o tratamento de células MCF7 pelo período de 2 horas com 1,4-naftoquinonas substituídas: DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 – 15 μM .	112
Figura 21. Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas (CI_{30}) sobre a expressão da proteína cdk2 em células MCF7 avaliadas por imunoeletrforese, sob incubação de 24h.	115
Figura 22. Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas (CI_{30}) sobre a expressão da proteína p53 em células MCF7 avaliadas por imunoeletrforese, sob incubação de 24h.	117
Figura 23. Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas (CI_{30}) sobre a expressão da proteína PARP em células MCF7 avaliadas por imunoeletrforese, sob incubação de 24h.	118
Figura 24. Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas (CI_{30}) sobre a expressão da proteína γH2Ax em células MCF7 avaliadas por imunoeletrforese, sob incubação de 24h.	120

- Figura 25.** Inibição do crescimento tumoral induzido pelos tratamentos com 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1, DPB2 e DPB5 -0,5Mm/kg/dia) administradas em camundongos portadores do TAE. 123
- Figura 26.** Tipo de morte celular induzida pelo tratamento de DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 (0,05 Mm/kg/dia) administrados em camundongos portadores do TAE. 124
- Figura 27.** Atividade antiangiogênica apresentada pelas 1,4-naftoquinonas substituídas DPB1, DPB4 e DPB5 (50, 75 e 100 µg/ml). 127
- Figura 28.** Atividade antiangiogênica apresentada pelas 1,4-naftoquinonas substituídas DPB2 (5, 10 e 20 µg/ml). 127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades eletroquímicas das 1,4-naftoquinonas substituídas. ...	75
Tabela 2. Valores de CI_{50} obtidos após o tratamento de células MCF7 com as 1,4-naftoquinonas substituídas 1 a 9 (5 a 80 μM) pelo período de 24 horas. ...	77
Tabela 3. Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas (0,05 μM) sobre o DNA plasmidial.	82
Tabela 4. Efeito da luz UV-A no potencial indutor de dano direto no DNA plasmidial da 1,4-naftoquinona substituída DPB1 (0,05 μM) sobre o DNA plasmidial.	85
Tabela 5. Efeito da luz UV-A no potencial indutor de dano direto no DNA plasmidial da 1,4-naftoquinona substituída DPB2 (0,05 μM) sobre o DNA plasmidial.	87
Tabela 6. Efeito da luz UV-A no potencial indutor de dano direto no DNA plasmidial da 1,4-naftoquinona substituída DPB4 (0,05 μM) sobre o DNA plasmidial.	89
Tabela 7. Efeito da luz UV-A no potencial indutor de dano direto no DNA plasmidial da 1,4-naftoquinona substituída DPB5 (0,05 μM) sobre o DNA plasmidial.	91
Tabela 8. Percentual de células apoptóticas e necróticas obtidas após o tratamento com 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1 a DPB9 – 15 μM) em células de câncer de mama humano (MCF7) sob incubação de 24h.	109
Tabela 9. Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 (0,5Mm/kg/dia) em camundongos inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich sobre os parâmetros morfológicos dos animais.	122

Tabela 10. Percentual de células apoptóticas e necróticas obtidas após o tratamento com 1,4-naftoquinonas substituídas DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 administrados em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE. ..125

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	Fator indutor de apoptose
Apaf 1	Fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1
ASC	Ascorbato de sódio
ADP/ATP	Nucleotídeo de adenina difosfato e trifosfato, respectivamente
CAM	Ensaio da membrana córioalantóica
CDK	Cinase dependente de ciclina
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
CI ₂₀	Concentração inibitória 20%
CI ₃₀	Concentração inibitória 30%
CT-DNA	Ácido desoxirribonucleico de timo de vitelo
DCFH-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
DISC	Complexo sinalizador indutor de morte
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOXO	Doxorrubicina
DPB	Derivado de 1,4 naftoquinona
EcoRI	Enzima de restrição
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
FADD	Proteína adaptadora com domínio de morte associada a FAS
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
F-I	Forma superenovelada do DNA
F-II	Forma circular aberta do DNA
F-III	Forma linear do DNA
GLUT 1	Transportador de glicose 1
HEPES	Tampão N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanosulfônico) ácido
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
IAP	Proteína inibidora de apoptose
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K562	Linhagem tumoral de leucemia mieloide crônica
MAPK	Proteína ativada por mitógeno
MCF7	Célula de câncer de mama humano
MEN	Menadiona
MMPs	Metaloproteinases
MMP2	Metaloproteinase 2
MMP9	Metaloproteinase 9

MP	Membrana plasmática
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-yl-2,5- difeniltetrazolil
NADH	Nicotiamina adenina dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NFk-β	Fator Nuclear k-β
PARP	Poli ADP ribose polimerase
PBS	Tampão fosfato salina
P38MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno p38
OS	Fosfatidilserina
RIP	Receptores de proteínas cinases
Smac	Segundo ativador de caspases derivados de mitocôndria
STAT 5	Proteína de sinal transdutor e ativador de transcrição 5
T24	Célula de câncer de bexiga humano
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
TBE	Tampão tris-borato EDTA
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral tipo 1
TRADD	Domínio de morte de receptor de TNF
TRAIL	Fator de necrose tumoral relacionado a apoptose induzida por ligante
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca^{+2}	Cálcio
CaCl_2	Cloreto de cálcio
Mg	Magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Radical superóxido
$\bullet\text{OH}$	Radical hidroxil
O_2	Oxigênio molecular
R-O-OH	Peróxidos
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
1.1 CÂNCER: DEFINIÇÕES E EPIDEMIOLOGIA	31
1.2 BASES MOLECULARES DO CÂNCER	31
1.3 CICLO CELULAR	34
1.4 INVASÃO, METÁSTASE E ANGIOGÊNESE	36
1.5 ANTITUMORAIS E INTERAÇÃO COM O DNA.....	38
1.6 MORTE CELULAR	41
1.6.1 Necrose.....	42
1.6.2 Apoptose	43
1.7 QUINONAS COMO AGENTES QUIMIOTERÁPICOS	46
2 OBJETIVOS	53
2.1 OBJETIVO GERAL	53
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
3 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1 OBTENÇÃO DAS 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS	55
3.2 MENSURAÇÕES ELETROQUÍMICAS	57
3.3 CULTURA DE CÉLULAS.....	57
3.4 ANIMAIS.....	57
3.5 OVOS EMBRIONADOS.....	57

3.6 CITOTOXICIDADE DAS 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS	58
3.7 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA	59
3.8 INTERAÇÃO COM DNA (DANO DIRETO AO DNA PLASMIDIAL).....	59
3.8.1 Efeito da luz UV-A sobre as 1,4-naftoquinonas substituídas na fragmentação do DNA plasmidial	61
3.9 MONITORAMENTO DE INTERAÇÕES DAS 1,4- NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS COM DNA DE TIMO DE VITelo (CT-DNA), POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS	62
3.10 MONITORAMENTO DE INTERAÇÕES DAS 1,4- NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS COM DNA DE TIMO DE VITelo (CT-DNA), ATRAVÉS DE MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA.....	63
3.11 TESTE DE INTERAÇÃO COM DNA – ENSAIO COMETA	63
3.12 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR	66
3.13 ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓTICA <i>IN VITRO</i>.....	67
3.14 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE EROS.....	68
3.15 ENSAIO DE IMUNOELETROFORESE PARA CDK2, PARP, P53 E γH2Ax.....	69
3.16 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VIVO</i>	70
3.16.1 Protocolo do Modelo Experimental da forma ascítica do carcinoma de Ehrlich (TAE)	70

3.16.2 Avaliações morfológicas	70
3.16.3 Avaliações histocitológicas	71
3.17 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA <i>IN VIVO</i>.....	72
3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1 PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS.....	75
4.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA	76
4.3 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA	79
4.4 POTENCIAL DE DANOS DIRETOS AO DNA PLASMIDIAL DAS 1,4- NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS	81
4.5 EFEITO DA LUZ UV-A NO POTENCIAL DE DANOS DIRETOS DE 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS AO DNA PLASMIDIAL	83
4.6 INTERAÇÃO DE 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS COM DNA DE TIMO DE VITELLO OBSERVADA POR ESPECTROFOTOMETRIA.	92
4.7 INTERAÇÃO DE 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS/CT-DNA, POR FLUORESCÊNCIA	102
4.8 AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA <i>IN VITRO</i> – ENSAIO COMETA	104
4.9 EFEITOS DAS 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS SOBRE O CICLO CELULAR.....	106
4.10 TIPO DE MORTE CELULAR INDUZIDO PELAS 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS <i>IN VITRO</i>	108

4.11 CONTEÚDO INTRACELULAR DE EROS	112
4.12 ENSAIO DE IMUNOELETROFORESE	114
4.12.1 Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas sobre a expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular	114
4.13 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	121
4.14 ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA <i>IN VIVO</i>	126
5 CONCLUSÕES	131
6 PERSPECTIVAS	133
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
<i>ANEXO A – primeira página do artigo publicado no periódico Current Topics in Medicinal Chemistry, volume 12, páginas 2094 a 2102, no ano de 2012, sob título de Biological Evaluation of 3-Acyl-2-Arylamino-1,4-Naphthoquinones as Inhibitors of Hsp90 Chaperoning Function.</i>	157
<i>ANEXO B – primeira página do artigo publicado no periódico Molecular Medicine Reports, março 2014, sob título de Substituted 3-acyl-2-phenylamine-1,4-naphthoquinones intercalate into DNA and cause genotoxicity through increased reactive oxygen species generation culminating in cell death.</i>	159

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER: DEFINIÇÕES E EPIDEMIOLOGIA

O câncer, conforme alguns autores (DUESBERG; RASNICK, 2000; MOFFATT et al., 2000), é basicamente uma doença celular, embora sem causas totalmente definidas. É caracterizada por uma desregulação nos mecanismos de controle do ciclo e morte celular em decorrência de certa mudança no repertório da expressão gênica devido a alguma mutação ocorrida em nível de DNA que determina o aparecimento e/ou o comportamento da neoplasia.

Do ponto de vista clínico, o câncer pode ser considerado como um conjunto de mais de cem doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células que são capazes de invadir os tecidos e órgãos (INCA, 2012). A partir do ponto inicial da desordem, a proliferação celular passa a ocorrer de forma acelerada, a replicação do DNA acaba prejudicada e as células cancerosas tendem a apresentar um comportamento agressivo e incontrolável; e fatores pró-angiogênicos passam a ser liberados, tudo isto irá determinar a formação de uma neoplasia maligna. Em geral, a progressão dos tumores segue uma sequencia evolutiva: crescimento local, metástase em linfonodos regionais e para outros órgãos e óbito (COZZI, 2003).

Atualmente, apesar dos progressos alcançados na medicina, o câncer é a principal causa de mortalidade em países economicamente desenvolvidos e a segunda causa líder em países em desenvolvimento, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (JEMAL et al., 2011). Os dados estatísticos no Brasil apontam para o ano de 2014 a ocorrência de cerca de 580 mil novos casos de câncer, sendo os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não-melanoma, os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e de mama, do cólon e reto no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil de magnitude observado para a América Latina (INCA, 2014).

Somando-se a estes fatos, o incentivo às pesquisas oncológicas são de grande relevância, principalmente no Brasil, pois a sobrevivência de uma pessoa com câncer no país é em torno de 2 a 4 anos, enquanto nos países desenvolvidos esse índice sobe para 12 a 16 anos (INCA, 2012).

1.2 BASES MOLECULARES DO CÂNCER

A patogênese do câncer representa um dos problemas mais complexos em biologia, pois muitos dos aspectos pelos quais uma célula

normal é transformada numa célula neoplásica permanecem sem causas definidas. No entanto, alterações nos mecanismos regulatórios são críticos para a homeostase, permitindo que as células tumorais adquiram novas características tais como a invasão de tecidos, metástase e angiogênese. Algumas das vias de controle são ativadas, tais como proliferação celular, progressão do ciclo celular e vias de sobrevivência, enquanto outras são reprimidas, como as vias de morte celular e apoptose (FIANDALO; KYPRIANOU, 2012).

As alterações genéticas que levam a formação de neoplasias malignas alteram pelo menos quatro categorias de genes (DAS; NAGPAL, 2002; KUMAR et al., 2003). A primeira delas é a dos protooncogenes, cujos produtos são importantes para o crescimento celular normal e sua expressão aumentada ou mutação podem levar ao crescimento celular descontrolado e oncogênese, sendo então chamados de oncogenes. Os genes supressores de tumor estão relacionados ao controle da divisão celular e caso detectem alguma alteração durante o processo, promovem a parada da divisão. Outra categoria de genes que pode estar alterada é a dos genes regulares da apoptose, que são necessários para levar a morte celular quando algum erro genético não foi reparado. A quarta categoria de genes que pode estar alterada é dos genes de reparo do DNA, onde uma alteração nestes genes predispõe a novas mutações afetando a proliferação e sobrevivência celular de forma indireta, pois influenciam a habilidade do organismo de reparar danos não letais ocorridos em protooncogenes, genes supressores de tumor e genes reguladores de apoptose (DAS; NAGPAL, 2002; KUMAR et al., 2003).

A proliferação celular anormal durante o início e progressão do câncer é controlada pela progressão do ciclo celular, que consiste em várias fases: G0, G1, S, G2 e M, sendo reguladas por vários ciclinas e CDK (cinases dependentes de ciclina) e a progressão de uma fase para outra é dependente de pontos específicos (MALUMBRES; BARBACID, 2009). Um dos pontos cruciais de verificação é a p53 (notoriamente conhecido como o guardião do genoma) devido ao seu papel de reparo do DNA danificado, via aumento da regulação de efetores *downstream*, como p21 (induz parada do ciclo celular) e PUMA que bloqueia proteínas anti-apoptóticas, induzindo a apoptose (MALUMBRES; BARBACID, 2009; WANG et al., 2011). Portanto, a perda da regulação do ciclo celular via mutações do p53, permite a célula se replicar independentemente da integridade do DNA e aumenta a resistência à apoptose (WANG et al., 2011).

Sendo assim, a maioria dos tumores malignos resulta de mutações causadas por carcinógenos que de alguma forma promovem danos ao DNA e conferem vantagens que propiciam o crescimento celular e a invasão de outros tecidos. Estas mutações podem ter origem genética (mutações herdadas) ou serem adquiridas ao longo da vida (mutações adquiridas e/ou externas), que corresponde a 80% dos casos, e estão associadas ao meio ambiente (radiação ionizante e a poluição), hábitos sociais ou culturais do indivíduo (tabagismo, alcoolismo, excessiva exposição ao sol, tipo de alimentação), bem como a exposição a agentes infecciosos (virose causada por Papiloma Vírus Humano), o uso de medicamentos, dentre outros (AUDIC; HARTLEY, 2004; INCA, 2011 *apud* KVIECINSKI, 2011).

Como exemplos de genes mutados em células tumorais, pode-se citar os genes que codificam as proteínas c-Myc, p53, p16, Ras, família Bcl-2 (Bax, Bid), CDK, ciclinas, dentre outros (COLMAN et al., 2000; KAMB, 2000; RANG et al., 2004; OSBORNE, 2004). Dentre estes genes destacam-se o gene *p53* supressor de tumor, que leva à formação da proteína p53 conhecida como indutora de parada do ciclo celular e desencadeadora de apoptose; e o gene *Bcl-2*, o qual induz a produção da proteína Bcl-2, que atua como bloqueadora do processo apoptótico (CORY; ADAMS, 2002; GOGVADZE et al., 2009). Estes dois genes são os mais frequentemente mutados, sendo que em média, 50% dos tumores apresentam estas mutações (REED, 1998; COLMAN et al., 2000).

Células tumorais são conhecidas por apresentarem grande heterogeneidade genética e devido a esta instabilidade as células adquiriram características comuns a muitos tipos de câncer como: autosuficiência nos sinais de crescimento, taxa de proliferação elevada, capacidade de evitar apoptose, capacidade de invadir tecidos e promover metástases e frequentemente apresentam níveis aumentados de EROs, sendo que vários mecanismos têm sido propostos para explicar este fenômeno. Estes incluem o aberrante metabolismo das células tumorais, mas também disfunções mitocondriais ou perda funcional da p53. Além disso, foi demonstrado que a ativação de algumas oncoproteínas como BCr-Abl, Ras, c-Met e c-myc pode promover a geração de EROs (BCr-Abl, Ras, c-Met e c-myc). Além destas características, tem sido demonstrado que as células tumorais também apresentam um fenótipo glicolítico, capacidade de acumular vitamina C e um estado antioxidante alterado, muitas vezes com depleção de algumas enzimas antioxidantes ou mesmo uma redução de sua atividade (TRACHOOTHAM et al., 2006; VERRAX et al., 2009a; VERRAX et al., 2011a).

Em geral, a produção de EROs promovida pela atividade das proteínas oncogênicas induz proliferação celular e instabilidade genética, ambos são favoráveis para a progressão do câncer (VERRAX et al., 2009a). No entanto, devido ao fato das células tumorais apresentarem elevados níveis de EROs associado a uma desregulação redox e um sistema antioxidante alterado, o estresse oxidativo induzido por agentes pró-oxidantes ou compostos que inibem o sistema antioxidante tem sido utilizado como uma estratégia de terapia, independente ou associada a quimioterápicos, capaz de ativar a morte celular (VERRAX et al., 2011b).

1.3 CICLO CELULAR

A divisão celular é um evento necessário para manutenção da vida. As fases do ciclo celular existem para realizar uma tarefa específica: replicar com precisão todos os cromossomos de modo a que possam ser eficientemente e igualmente dividida em duas células filhas durante a mitose. Numerosos pontos de controle evoluíram para garantir que a mitose só passa quando as condições de crescimento são ideais e os cromossomos são replicados de forma eficiente e livre de danos (GANEM; PELLMAN, 2012).

Recentemente, após os avanços no conhecimento dos mecanismos da oncogênese e da indução da apoptose, obteve-se uma maior compreensão sobre o papel da regulação do ciclo celular nas vias de transformação neoplásica e do desenvolvimento da resistência à quimioterapia (SCHWARTZ; SHAH, 2005).

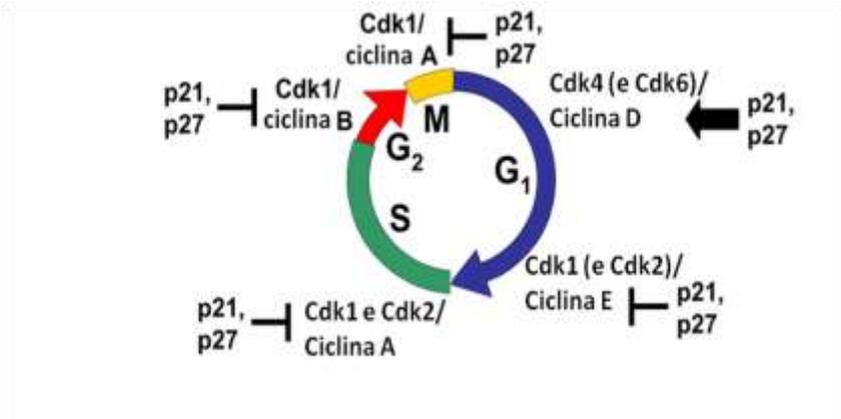
De maneira geral, a divisão de uma célula eucariótica ocorre em quatro fases distintas: G1, S, G2 e M. O processo de divisão celular e a separação das células filhas ocorrem na mitose (fase M); o período entre uma mitose e outra é denominado interfase. A replicação do DNA nuclear ocorre no período de síntese (fase S). O intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA é chamado de fase G1, e o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose é fase G2 (NAKAJIMA, 2010).

Etapas de verificação, conhecidas como “pontos de checagem”, asseguram a fidelidade da replicação e separação cromossomal, permitindo a manutenção da estabilidade genética. Um ponto de checagem ocorre na transição de G1 para S (ponto de restrição) onde as células tornam-se independentes de fatores de crescimento e comprometidas com a divisão celular. O outro ponto de checagem ocorre na transição de G2 para M, sendo que este, responde ao dano no DNA e causa um atraso que permite seu reparo antes que a célula progrida à fase M; o terceiro ponto ocorre antes da anáfase e assegura a correta formação do fuso, garantindo a

manutenção da integridade genômica (MOLINARI, 2000; SWANTON, 2004). A parada do ciclo celular permite que os diversos mecanismos celulares de reparo do DNA atuem a fim de corrigir o dano genômico (LODISH et al., 2000; WEINBERG, 2000).

Já a progressão no ciclo celular é basicamente regulada por duas classes de proteínas: as ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas (CDKs). As CDKs complexam-se com ciclinas distintas nas diferentes etapas do ciclo celular, formando o complexo CDK-ciclina. Uma vez ativada, as CDKs fosforilam seus substratos. Na maioria dos casos, a fosforilação que ocorre em sítios de serina/treonina sinaliza para a progressão do ciclo celular (COLLINS; GARRET, 2005).

Em G1, o ponto de restrição é coordenado por duas famílias de ciclinas, D e E. As ciclinas tipo D interagem com as cdk 4 e 6 e as ciclinas E1 e E2 com a cdk2. As atividades de ambas as ciclinas são requeridas para regular a transição de G1 para S, mediada parcialmente pela fosforilação do retinoblastoma (Rb - proteína supressora de tumor). O complexo ciclina D/CDK4,6 formado leva a fosforilação inicial de Rb, que em última instância leva a síntese de ciclina E, além de resultar na redistribuição de p21 e p27, impedindo que estas proteína inibam o complexo de ciclina E/CDK2. Dessa forma o complexo ciclina E/CDK2 fica livre para hiperfosforilar Rb (SWANTON, 2004; NAKAJIMA, 2010). Posteriormente, a ciclina E é degradada e substituída pelas ciclinas A e B, que formarão complexo com CDK2 e CDK1 e serão responsáveis por manter a fosforilação de Rb durante as fases S, G2, G2/M (FANG;NEWPORT, 1991) (Figura 1). Já, a regulação da transição G2/M e entrada em mitose dependem da correta ativação do complexo ciclina B/cdk-1 e sua localização subcelular (SWANTON, 2004).

Figura 1. Esquema de regulação do ciclo celular.

Fonte: Adaptado de Galea et al., 2008.

A análise por *microarrays* de tumores de mama realizada por Whitfield e colaboradores (2006) indica que 62% dos genes encontrados alterados são genes envolvidos na proliferação e no controle do ciclo celular. Sabe-se que, entre as alterações sofridas na aquisição do fenótipo tumoral, a perda da integridade das vias pRb e p53 de controle do ciclo celular são algumas das características predominantes no desenvolvimento do câncer (SHERR; McCORMICK, 2002). ; sendo que o p53, pode impedir que as células passem pelos pontos de checagem das fases G₁ e G₂, além de poder induzir a célula a apoptose (BENADIBA, 2008).

Muitos dos compostos em estudo com atividade antineoplásica têm ação em varios passos do ciclo celular e seus efeitos podem ser citostático ou citotóxico, dependendo do perfil do ciclo celular da célula alvo. Diante disso, o entendimento das interações moleculares envolvidas pode sugerir maneiras de sensibilizar as células aos efeitos desses compostos (SHAPIRO; HARPER, 1999).

1.4 INVASÃO, METÁSTASE E ANGIOGÊNESE

As células tumorais nem sempre permanecem na massa tumoral primária, podendo ser deslocadas por: (1) invasão, ou o movimento de células para o interior do espaço ocupado por tecidos vizinhos; (2) por metástase, onde há a formação de tumores secundários em outros órgãos localizados em pontos distantes do tumor primário (Figura 2) (OPPENHEIMER, 2006).

Figura 2. Esquema metástase.



Fonte: Adaptado de Weinberg, 2008.

Sabe-se que entre os atributos essenciais para a invasão das células tumorais na membrana basal estão a motilidade celular ativa, a capacidade de proteólise e a perda da adesão célula-célula. E células tumorais possuem a tendência de promover fraca adesão entre si, o que facilita seu deslocamento e locomoção (KUDO et al., 2004). Além disso, células normais geralmente param de proliferar quando tocam uma nas outras, entretanto células tumorais não são controladas pelo mecanismo de contato, continuam a crescer e se mover para o interior dos tecidos circundantes, invadindo-os. Adicionalmente, as células tumorais ativam e liberam proteases, enzimas que auxiliam as células tumorais a romperem os tecidos circundantes e assim, facilitam a invasão (MAZZOCCA et al., 2005).

Invasão, em seu conceito mais simples, é a expansão de células tumorais para o interior do tecido circundante, como resultado de divisão celular contínua (FIDLER, 2002). Células tumorais possuem a tendência de promover fraca adesão entre si, o que facilita seu deslocamento e locomoção (OPPENHEIMER, 2006). Já, a metástase é a capacidade que um tumor maligno tem de estabelecer sítios secundários em tecidos funcionalmente não relacionados com aquele que o originou (PODGORSKI et al., 2007). Após se desprender do tumor primário, a célula tumoral pode invadir o hospedeiro e penetrar em vasos sanguíneos e linfáticos. A célula tumoral pode invadir os vasos linfáticos diretamente, ou através dos vasos sanguíneos. Podem ainda passar dos canais venosos para os linfáticos, e

vice-versa, indicando a existência de uma rede veno-linfática (FIDLER, 2002).

Porém, múltiplos passos são necessários para as células tumorais sofrerem metástase do seu sítio primário para os linfonodos regionais. Estes passos incluem o destacamento da célula da neoplasia primária, a invasão dos vasos linfáticos, o transporte através dos mesmos, a retenção nos linfonodos, bem como a sobrevivência e o crescimento tumoral dentro destes (HOSHIDA et al., 2006).

A angiogênese desempenha um papel crucial no desenvolvimento tumoral e na formação de metástases. Em situações especiais quando ocorre aumento do metabolismo, como é o caso no desenvolvimento de tumores, as necessidades metabólicas teciduais podem ultrapassar a demanda de oxigênio e nutrientes disponível pelos capilares existentes, desencadeando uma sequência intricada de eventos que resultam na formação de uma nova rede de capilares sanguíneos a partir de células endoteliais locais. As células endoteliais passam a proliferar e formar novos vasos sanguíneos, fenômeno denominado de angiogênese (ADORNO, 2008). Além de suportar as necessidades metabólicas tumorais, os novos vasos sanguíneos servem como uma rota de escape para as células do tumor primário se disseminar, ou seja, formarem metástases (JAKÓBISIAK et al., 2003).

Dentre os vários indutores da angiogênese nos tumores, destacam-se: o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), os fatores de crescimento fibroblásticos ácidos e básicos, a angionina, interleucina 8, as metaloproteinases (MMPs), os ativadores de plasminogênio, o fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator de crescimento transformador β (JAKÓBISIAK et al., 2003).

Ressalta-se que a atividade aumentada das MMPs, responsável pela degradação da matriz extracelular, particularmente a MMP-2 e MMP-9, está associada às fases de crescimento do tumor, invasão e metástases, sendo frequentemente superexpressas em diferentes cânceres com fenótipo agressivo, invasivo e/ou metastático (LIOTTA et al., 1991, MCCAWLEY; MATRISIAN, 2000).

1.5 ANTITUMORAIS E INTERAÇÃO COM O DNA

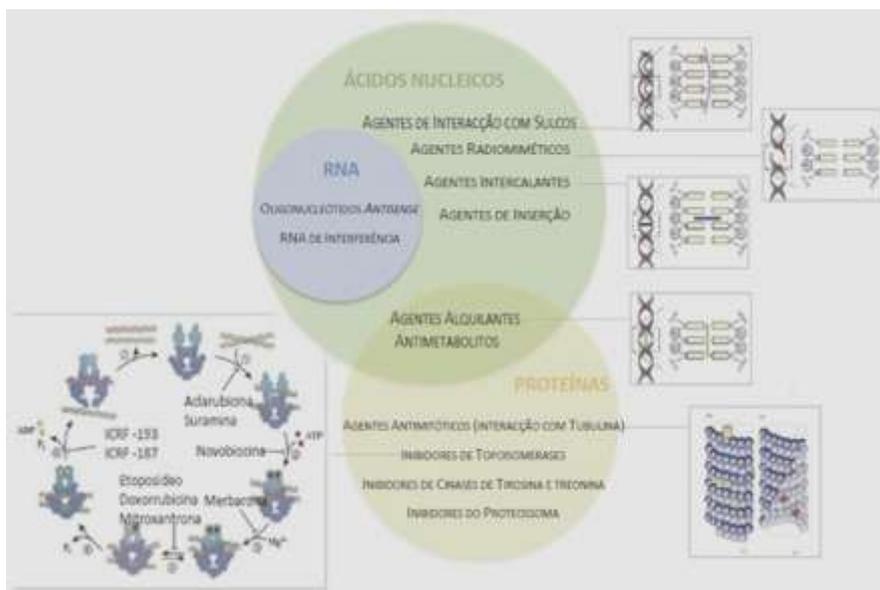
Preservação do genoma é crucial para a sobrevivência e o bem-estar de todos os organismos, porém, o genoma encontra-se sob constante agressão por uma variedade de agentes, endógenos ou exógenos, tais como luz UV ou radiação natural, radicais livres gerados pelo metabolismo oxidativo. No entanto, as células de todos os organismos são equipadas com

múltiplas vias para reconhecer e reparar danos no DNA (AGUILERA; GOMEZ-GONZALEZ, 2008).

A partir das lesões podem ocorrer mudanças na sequência específica de DNA, que se fixadas durante o processo replicativo dão origem a mutações na estrutura da dupla-hélice. Na grande maioria das vezes, os resultados das mutações são maléficos, incluindo malformação, câncer, envelhecimento e morte. Entretanto, agentes capazes de atingir o DNA passaram a ter importância farmacológica, como no combate ao câncer, tendo como principal alvo a molécula de DNA, promovendo dano a esta e consequentemente induzindo a morte celular (BATISTA, 2008).

Dentro deste contexto, vários estudos tem investigado a interação de pequenas moléculas com o DNA para poder compreender o mecanismo de ação de diversos agentes farmacológicos, em especial os antitumorais (Figura 3) (LU et al., 2010). Pequenas moléculas podem reagir com o DNA por interação covalente ou não covalente, em diferentes sítios específicos do DNA como: no sulco menor ou no sulco maior, entre os pares de bases ou ainda do lado de fora das hélices (GHOLIVAND et al., 2012). Agentes intercalantes ligam-se ao DNA por inserção de um substituinte planar e/ou aromático entre os pares de bases, simultaneamente promovendo o alongamento e desenrolamento da hélice. Já a ligação no sulco menor do DNA promove pouca perturbação na estrutura do DNA (LU et al., 2010). Além disso, outras formas de interação com o DNA podem ocorrer, através da inibição da síntese de nucleotídeos ou inibindo a DNA-girase (ALMEIDA et al., 2005).

Figura 3. Mecanismos de interação de agentes antitumorais com ácidos nucleicos e proteínas.



Fonte: Adaptado de Jordan; Wilson, 2004; Larsen et al., 2003.

Entre estes vários mecanismos pelos quais os fármacos podem se ligar ao DNA, o mais conhecido é a alquilação de sítios nucleofílicos dentro da dupla hélice. Os agentes alquilantes mais eficazes clinicamente tem duas porções capazes de desenvolver carbocátions transientes que se ligam covalentemente aos sítios ricos em elétrons no DNA, tais como a posição do N7 da guanina (um dos agentes eletrofílicos). A ligação cruzada das duas cadeias de DNA produzidos pelos agentes alquilantes bifuncionais impede a replicação e transcrição do DNA, induzindo a morte celular. Nesta categoria de antitumorais encontram-se os fármacos em uso na prática clínica como a ciclofosfamida, mitomicina C, nitrosoureas e compostos relacionados. Além disso, também cisplatina e seus congêneres são, tradicionalmente, ainda que indevidamente, consideradas agentes alquilantes (BISCHOFF; HOFFMANN, 2002; RAVERA et al., 2007).

Um segundo mecanismo de ligação a ácidos nucleicos é intercalação, isto é, a inserção de uma molécula de anel planar (geralmente aromático) entre dois nucleótidos adjacentes do DNA. Este mecanismo é característico de muitos antibióticos antitumorais, tais como daunorrubicina e

doxorrubicina. Estes fármacos não estão ligados covalentemente ao DNA, mas sua interação é forte o suficiente para distorcer a forma da dupla hélice resultando na inibição da replicação do DNA e da transcrição do RNA. Finalmente, um terceiro mecanismo de dano ao DNA é aquele induzido, por exemplo, pelas bleomicinas. Estes glicopeptídeos se intercalam entre os pares de bases guanina-citosina do DNA (RAVERA et al., 2007).

As antraciclinas são também consideradas agentes intercalantes, tendo como alvo principal a fenda menor do DNA, agindo através de um mecanismo de ação que se baseia na intercalação com os pares de base nitrogenadas CG (citosina e guanina). A intercalação apresenta uma componente eletrostática relacionada à interação do tipo π , existente entre os intercalantes e as bases CG, além de complexos de transferência de elétrons. Devido a esta característica, os intercalantes são constituídos por anéis aromáticos fundidos, apresentando alta densidade eletrônica, como as antraciclinas (RAVERA et al., 2007).

Recentes trabalhos têm demonstrado interesse no estudo da interação de derivados de quinonas e DNA, como os agentes farmacológicos da família das antraciclinas, que são indiscutivelmente os melhores intercalantes de DNA já caracterizados (LU et al., 2010; GHOLIVAND et al., 2012; ZHANG et al., 2011). Além disso, o potencial de redução baixo de derivados de antraquinonas abre possibilidades para o transporte de carga através do DNA (GHOLIVAND et al., 2012). Uma vez que o DNA pode ser considerado um importante receptor celular, muitos compostos podem exercer efeitos antitumorais através da ligação ao mesmo.

A mudança na replicação do DNA e a inibição do crescimento das células tumorais é a concepção base de novos fármacos antitumorais mais eficientes, e a sua eficácia depende do modo e da afinidade da interação entre estes fármacos e o DNA. Além disto, estes intercalantes em geral podem inibir DNA topoisomerase II e induzir rupturas no DNA e conseqüentemente a morte celular (GHOLIVAND et al., 2012).

1.6 MORTE CELULAR

O papel da morte celular no processo de desenvolvimento e na doença, os sinais que controlam este processo e os mecanismos que definem o destino da célula têm despertado grande interesse da comunidade científica, pois a modulação deste evento oferece a oportunidade de controlar processos como o câncer (GUIMARÃES; LINDEN, 2004).

Inicialmente foram definidos dois tipos diferentes de morte celular, necrose e apoptose (termo usado como sinônimo de morte celular

programada) (KERR et al., 1972). Entretanto, atualmente é sabido que os processos e os mecanismos que decidem o destino celular são muitos e muitas nuances são definidas dentro de um mesmo processo (GUIMARÃES; LINDEN, 2004). Assim, vários tipos de morte celular programada com objetivos, maquinaria celulares e também morfológicamente diferentes, têm sido descritos.

A definição molecular destes eventos e conhecimento detalhado dos participantes dos mesmos poderia permitir a modulação terapêutica das vias de morte celular em condições patológicas.

1.6.1 Necrose

Necrose é caracterizada por alterações fisiopatológicas graves, incluindo inchaço mitocondrial, perturbações plasmáticas, com ruptura da membrana plasmática e, em última análise vazamento dos conteúdos celulares. O último desencadeia a inflamação aguda exsudativa do tecido circundante; subsequente ativação e infiltração de neutrófilos, conseqüentemente um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo, e devido ao desencadeamento do processo inflamatório ocorrem alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (ANAZETTI; MELO, 2007). Com base nas suas características morfológicas e funcionais, não é surpreendente que a necrose tem sido considerada uma forma “não regulamentada” ou “acidental” de morte celular (KUNG et al., 2011).

No entanto, recentemente, estudos indicam que algumas formas de necrose envolvem ativamente vias de sinalização definidas que contribuem para a morte celular, como no caso da apoptose, considerando esta morte celular uma forma “regulada” (VANLANGENAKKER et al., 2012). Dados recentes têm mostrado que a necrose programada pode ser estimulada pelos mesmos ligantes de morte que ativam a apoptose tais como o fator de necrose tumoral (TNF), ligante Bem (FasL), e TRAIL (TNF-relacionada com ligante de indução de apoptose). Bem como algumas proteínas, como RIP – receptores de proteínas cinases tem sido associadas a necrose programada, mas dispensáveis para sobrevivência e apoptose. Assim, a ativação de receptores de morte pode levar a diferentes modos de morte celular: apoptose ou necrose programada. A escolha de sofrer apoptose em vez de necrose, no entanto, é determinada pelo fato de caspases serem ativadas, e a RIP clivada (VANLANGENAKKER et al., 2012; KUNG et al., 2011). Portanto, na via de receptor de morte, a necrose é uma resposta padrão quando a apoptose é inibida.

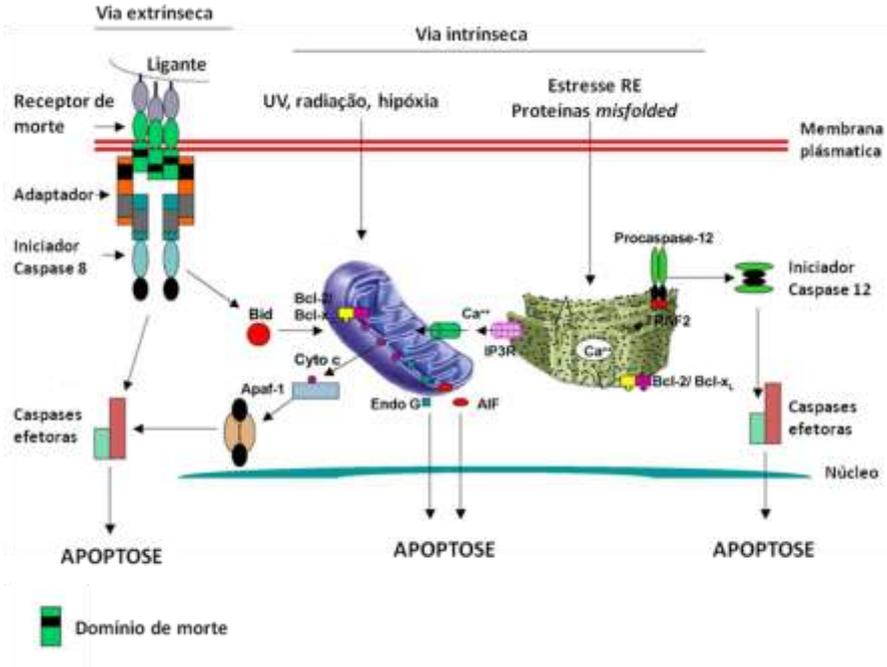
1.6.2 Apoptose

Apoptose é um fenômeno de morte celular programada, reconhecida morfológicamente como um fenômeno distinto de morte há mais de 30 anos por Kerr e colaboradores (1972), que ocorre individualmente, sendo que a morte de uma célula não leva à morte de outras células.

A célula apoptótica é caracterizada por uma sequência de eventos morfológicos como contração citoplasmática, cromatina condensada, evaginações na membrana citoplasmática, fragmentação do DNA mediada pela endonuclease em múltiplos fragmentos e a formação dos corpos apoptóticos. É um processo ativo e progressivo que envolve a substituição e eliminação de células danificadas indesejáveis, incluindo aquelas que podem eventualmente escapar do controle da divisão celular (EDINGER; THOMPSON, 2004). Sabe-se que a apoptose é um processo vital para o desenvolvimento embrionário, para a manutenção da homeostase tecidual e para o funcionamento do sistema imune, no entanto, alterações no processo apoptótico podem levar ao aparecimento de condições patológicas, como o câncer (CORY et al., 2003).

A apoptose pode ocorrer por diferentes vias, que normalmente culminam na ativação de cisteína-proteases denominadas caspases, as quais exercem papel central nesse processo de morte celular, como os iniciadores e executores da apoptose. Existem três vias (Figura 4) pelas quais as caspases podem ser ativadas, sendo duas mais estudadas e descritas como via intrínseca (ou mitocondrial) e extrínseca (ou receptor de morte), ambas as vias, eventualmente levam a uma via comum, ou a execução fase de apoptose. A terceira via menos conhecida é a via do retículo endoplasmático intrínseco (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997; GHOBRIAL et al., 2005; WONG, 2011).

Figura 4. Vias de morte celular por apoptose.



Fonte: Modificado de GUPTA (2006).

A via extrínseca do receptor de morte, como o seu nome implica, começa quando ligantes se associam a um receptor de morte. Embora vários receptores de morte tenham sido descritos, os mais conhecidos é o receptor TNF tipo 1 (TNFR1) e uma proteína relacionada chamada Bem (CD95) e os seus ligantes são chamados de TNF e Bem ligante (FasL), respectivamente (HENGARTNER, 2000). Estes receptores da morte têm um domínio de morte intracelular que recruta proteínas adaptadoras tais como domínio de morte associado ao receptor TNF (TRADD) e Bem-associado domínio de morte (FADD), bem como, cisteíno-proteases como caspase 8 (SCHNEIDER; TSCHOPP, 2000). A ligação do ligante de morte ao receptor resulta na formação de um sítio de ligação para uma proteína adaptadora e então o complexo de proteína adaptadora-ligante-receptor é conhecido como o complexo indutor de sinalização de morte (DISC) (WONG, 2011). Este complexo inicia a reunião e a ativação da pró-caspase

8. A forma ativada da enzima, caspase-8 é uma caspase iniciadora, que desencadeia a apoptose pela clivagem de outras caspases *downstream* ou efetoras (caspase 3) culminando nas alterações morfológicas e bioquímicas características de apoptose (WONG, 2011).

Como o próprio nome indica, a via intrínseca é iniciada dentro da célula, onde estímulos internos, tais como danos genéticos irreparáveis, hipóxia, concentrações extremamente elevadas de Ca^{+2} citosólico e estresse oxidativo intenso são alguns gatilhos do início da via intrínseca mitocondrial (DANIAL; KORSMEYER, 2004). Esta via, está sob forte regulamentação por vários tipos diferentes de moléculas que podem ser separadas em duas classes principais, as proteínas anti-apoptóticas, tais como o XIAP (inibidores da apoptose), Bcl-2, tais como as proteínas da família Bcl-2, BCL-2, BCL-XL ou as proteínas pró-apoptóticas, que incluem membros da família Bcl-2: BAX, BAD, BID, SMAC e Diablo, que são ativados através de eventos de sinalização que levam à permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) (SIU et al, 2008; FIANDALO; KYPRIANOU, 2012). O citocromo c é liberado, ligando-se com o APAF-1 e caspase-9 para formar o apoptossomo, a caspase-9 se torna cataliticamente ativa e atua sobre alvos *downstream*, incluindo a caspase-3 e -7 (FIANDALO; KYPRIANOU, 2012).

Outros fatores apoptóticos que são liberados a partir do espaço intermembranar mitocondrial no citoplasma incluem o fator de indução de apoptose (AIF), segundo ativador de caspases derivado de mitocôndria (Smac), proteína de ligação direta ao IAP (proteína inibidora de apoptose) com baixo Pi (DIABLO), entre outras (KROEMER et al., 2007).

A via intrínseca da apoptose também pode ocorrer através de uma rota alternativa mitocondrial, que é independente da ativação de caspase. Neste caso, um dos principais mediadores é uma oxirredutase mitocondrial, o fator de indução a apoptose (AIF). A apoptose caspase independente implicando AIF é iniciada pela clivagem da proteína que produz uma forma solúvel, Taif, que é então liberada do espaço mitocondrial para o citoplasma, onde se transloca para o núcleo promovendo a degradação do DNA (BARITAUD et al., 2010). A fragmentação do DNA promovida pela ação de AIF ocorre em larga escala, ou seja, não apresenta o perfil de fragmentação característico da apoptose, o qual envolve a quebra desse ácido nucléico em múltiplos fragmentos constituídos de 200 pares de base (PARONE et al., 2002; CHIPUK; GREEN, 2005). É interessante notar que, dado à ausência de uma atividade intrínseca endonuclease, a capacidade do AIF na degradação do DNA parece estar relacionado com o recrutamento

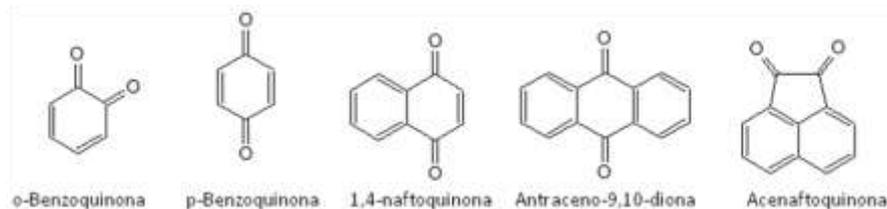
de nucleases *downstream*, tais como ciclofilina A (CypA) ou Endonuclease G (EndoG) (BARITAUD et al., 2010).

Além disso, a morte promovida por AIF pode estar associada ao fato dessa flavoenzima participar da regulação da fosforilação oxidativa, onde a diminuição da concentração intramitocondrial da mesma está vinculada a redução da formação e da atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, prejudicando a síntese de ATP (CHIPUK; GREEN, 2005).

1.7 QUINONAS COMO AGENTES QUIMIOTERÁPICOS

As quinonas são compostos orgânicos considerados produtos da oxidação de fenóis, tendo como principal característica estrutural a presença de duas unidades carbonílicas (C=O) conjugadas com pelo menos duas ligações duplas (CC) formando um sistema cíclico de seis membros, estrutura esta conhecida como unidade quinóide. Devido a esta característica estrutural as quinonas absorvem luz na região do visível, tornando seus derivados compostos extremamente coloridos. A nomenclatura das quinonas é determinada em função dos grupos carbonílicos no esqueleto carbônico. Dependendo do sistema cíclico e da posição em que se encontram as duplas ligações (CC) as quinonas podem ser classificadas como: benzoquinonas, antraquinonas e naftoquinonas (Figura 5) (SILVA et al., 2003; KUMAGAI et al., 2011).

Figura 5. Estruturas químicas de quinonas.



Fonte: Carbocyclic and Heterocyclic Ketones Rule C-317. Disponível em: http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature/79/r79_286.htm.

Estes compostos além de serem importantes na área industrial, como na indústria têxtil, fotográfica e de papel, devido sua coloração, seu uso medicinal tem despertado grande interesse, visto que em estudos farmacológicos as quinonas naturais e sintéticas mostram variadas biodinamicidades, destacando-se, dentre muitas, as propriedades microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de

sistemas celulares reparadores, processos nos quais atuam de diferentes formas (BENITES et al., 2008a; SILVA et al., 2003). Propriedades estas que estão associadas à interação das quinonas com os alvos biológicos pela formação de ligações covalentes ou agindo como agentes de transferência de elétrons em reações de oxi-redução (KUMAGAI et al., 2011).

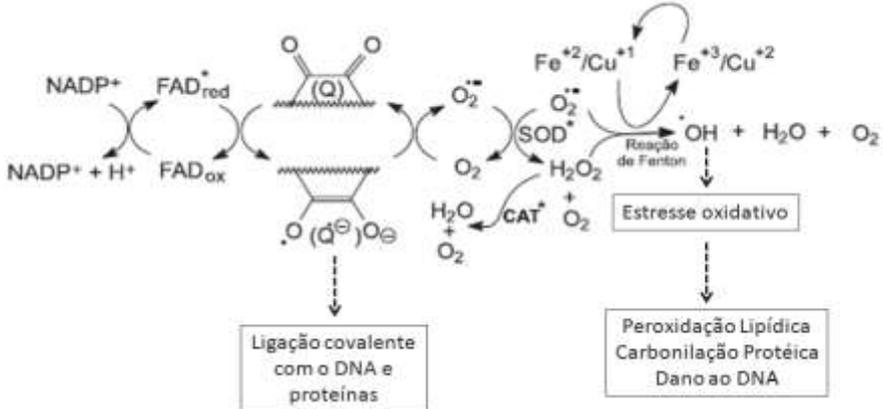
Além disto, diversas razões fazem com que exista um interesse especial por parte da comunidade científica sobre as quinonas por seus efeitos antitumorais. Desde os anos sessenta, quando as propriedades da daunorrubicina, um protótipo heterosídeo de antraquinona, foram exploradas com sucesso, conduzindo à obtenção de vários derivados aprimorados, como a doxorrubicina, as quinonas passaram a ser um alvo importante das pesquisas por novas alternativas de combate ao câncer. Desde então, vários agentes quinoides e substâncias estruturalmente relacionadas passaram a ser testadas por alguns grupos de pesquisa distribuídos pelo mundo.

Os agentes quinoides de sucesso hoje compõem uma classe de medicamentos clinicamente disponível, as antraciclina e, é fato que se trata da classe que pode ser utilizada contra uma maior variedade de tumores quando comparado a todos os demais fármacos quimioterápicos (WEISS, 1992; MINOTTI et al., 2004). Entretanto, apesar da boa eficácia terapêutica das antraciclina, os severos efeitos adversos associados às mesmas são significativos.

O mecanismo de ação das quinonas antitumorais ainda não está totalmente esclarecido. Mas, algumas características são dadas como críticas para o efeito das mesmas. A principal refere-se à biotransformação destes agentes no organismo e nas células tumorais que envolvem uma redução enzimática da quinona por um ou dois elétrons. Esta redução, catalisada por redutases do citocromo P450 e outras flavoenzimas que utilizam NADPH como doador de elétrons (NAD(P)H: quinona oxidoreductase ou DT-diaforases), resulta na formação de semiquinonas ou hidroquinonas do fármaco antitumoral (TEDESCHI et al., 1995; KUMAGAI et al., 2011). A semiquinona é um radical livre, cujos metabólitos, altamente reativos, podem interagir com as macromoléculas biológicas através de ligações covalentes. Por princípio, este processo bioirredutivo, pode prosseguir via reações subsequentes com o oxigênio, desencadeando uma cascata geradora de radicais livres que culmina por levar as células cancerosas à morte por induzirem as mesmas a um estado de desequilíbrio redox. Este processo é conhecido como ciclo redox dos agentes antitumorais quinoides, conforme demonstra a Figura 6. Ele

permanece até que o sistema torne-se anaeróbico (O'BRIEN, 1992; MONKS et al., 1992; GUTIERREZ, 2000; ABREU et al., 2002).

Figura 6. Ciclo redox induzido por quinonas.

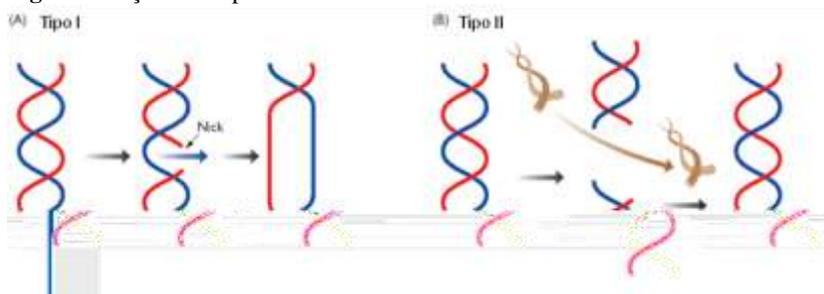


Fonte: Adaptado de DA SILVA et al., 2003.

Como outro mecanismo envolvido na atividade antitumoral de quinonas, particularmente aquelas pertencentes à classe das antraciclina, pode-se citar o potencial de interferir com as reações catalisadas pelo complexo enzimático da DNA topoisomerase. Evidências têm sido acumuladas para sugerir que estas interações estão diretamente relacionadas à citotoxicidade destes compostos (DICKANCAITÉ et al., 1997).

As topoisomerases constituem uma família de enzimas essenciais e indispensáveis, envolvidas nos processos topológicos relacionados aos eventos nucleares de replicação, transcrição, recombinação, reparo, montagem da cromatina e segregação cromossômica do DNA, sendo classificadas em dois tipos de acordo com sua função catalítica, topoisomerases I e II (Figura 7) (CHAMPOUX, 2001).

Figura 7. Ação das topoisomerases I e II.



Fonte: biosiva.50webs.org.

A topoisomerase I liga-se a uma das fitas de DNA, formando uma ligação covalente enzima-DNA sem necessidade de ATP, enquanto a topoisomerase II liga-se a uma dupla fita de DNA através de uma reação de substituição nucleofílica, clivando as duas fitas complementares com necessidade de ATP (CHAMPOUX, 2001). Os inibidores de topoisomerasas podem atuar de duas formas: estabilizando o complexo topoisomerase-DNA ou promovendo a inibição catalítica da enzima. Em relação aos inibidores catalíticos da enzima, podem-se citar as bis-2,6-dioxopiperazinas, que atuam inibindo a topoisomerase II pelo bloqueio do sítio catalítico da mesma (DA SILVA et al., 2003).

As antraciclínicas podem inibir a topoisomerase II através da estabilização do complexo topoisomerase-DNA e por meio da intercalação com o DNA. A intercalação pode bloquear o sítio de ligação da topoisomerase II ao DNA, comprometendo sua função, conseqüentemente induz danos ao DNA (INJAC; STRUKELJ, 2008). Dessa forma, a intercalação ao DNA realizada pelas antraciclínicas, deve ser considerada como mais um dos possíveis mecanismos com que as quinonas exercem efeito antitumoral (DE ALMEIDA et al., 2005).

Dentre outros mecanismos de ação especulados por alguns pesquisadores esta uma potencial atividade inibidora sobre o sistema redox associado à membrana plasmática (CRANE; BÖTTGER, 2001) e a indução de alquilação redutora sobre o DNA com potencial formação de ligações cruzadas (BORMAN, 2004). Pode-se citar ainda que as quinonas exercem efeito antitumoral através da ligação ao domínio catalítico da CDC25 fosfatase que resulta na formação de Cdk1 inativa hiperfosforilada, além de inibir a expressão da ciclina E na fase G1 e a expressão da ciclina A na

transição da G1/S, levando a parada do ciclo celular e a morte celular (WU; SUN, 1999). Bem como, a administração destas quinonas é conhecida também por induzir uma variedade de efeitos na célula incluindo: redução do pool de nicotinamida adenina fosfato e adenosina trifosfato; depleção de GSH; indução de quebra simples da cadeia de DNA; oxidação de grupos sulfidrilas e aumento da expressão do gene c-myc (TAPER et al., 2004).

Além disso, as células tumorais são conhecidas por apresentarem grande heterogeneidade genética e devido a esta instabilidade as células adquiriram características comuns a muitos tipos de câncer como: autosuficiência nos sinais de crescimento, taxa de proliferação elevada, capacidade de evitar apoptose, capacidade de invadir tecidos e promover metástases e frequentemente apresentam níveis aumentados de EROs, sendo que vários mecanismos têm sido propostos para explicar este fenômeno. Estes incluem o aberrante metabolismo das células tumorais, mas também disfunções mitocondriais ou perda funcional da p53. Foi demonstrado também, que a ativação de algumas oncoproteínas como BCr-Abl, Ras, c-Met e c-myc pode promover a geração de EROs (BCr-Abl, Ras, c-Met e c-myc). Além destas características, foi demonstrado que as células tumorais também apresentam um fenótipo glicolítico, capacidade de acumular vitamina C e um estado antioxidante alterado, muitas vezes com depleção de algumas enzimas antioxidantes ou mesmo uma diminuição de atividade (TRACHOOTHAM et al., 2006; VERRAX et al., 2009a; VERRAX et al., 2011a).

Em geral, a produção de EROs promovida pela atividade das proteínas oncogênicas induz proliferação celular e instabilidade genética, ambos são favoráveis para a progressão do câncer (VERRAX et al., 2009b). No entanto, devido ao fato das células tumorais apresentarem elevados níveis de EROs associado a uma desregulação redox e um sistema antioxidante alterado, o estresse oxidativo induzido por agentes pró-oxidantes ou compostos que inibem o sistema antioxidante tem sido utilizado como uma estratégia de terapia, independente ou associada a quimioterápicos, capaz de ativar a morte celular (VERRAX et al., 2011a).

O *Laboratório de Bioquímica Experimental – LABIOEX* (UFSC-Brasil), coordenado pela Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa, em parceria com a *Unité de Pharmacocinétique, Metabolisme, Nutrition et Toxicologie* da *Université Catholique de Louvain* (PMNT – UCL – Bélgica), coordenado pelo Prof. Dr. Pedro Buc Calderon, e com o *Laboratório de Química Orgânica* da *Universidad Arturo Prat* (Iquique – Chile), coordenado pelo Prof. Dr. Julio Benites, tem desenvolvido trabalhos com foco associado à linha de pesquisa do estudo da atividade antitumoral e mecanismo de ação

de quinonas naturais e/ou sintéticas e o efeito de modificações estratégicas na estrutura química destas quinonas, como uma forma de potencializar a atividade biológica, bem como uma maneira de aprimorar a eficácia e a segurança destes agentes.

Por fim, a hipótese é que substituições estratégicas nas 1,4-naftoquinonas, moléculas a serem exploradas neste estudo, é de que o efeito doador de elétrons dos substituintes que vai influenciar a capacidade de elétron-aceptor do núcleo quinona, culminando com maior geração de H_2O_2 desencadeando dano ao DNA e conseqüentemente o processo de morte celular. Ressalta-se então, que esta nova estratégia terapêutica deve ser melhor explorada tanto do ponto de vista do mecanismo de ação, quanto da proposição de novas abordagens para o tratamento do câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o potencial citotóxico, antiproliferativo e antitumoral bem como o mecanismo de ação das 1,4-naftoquinonas substituídas para proposição de moléculas protótipos para a pesquisa de novos agentes uteis na terapia do câncer.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

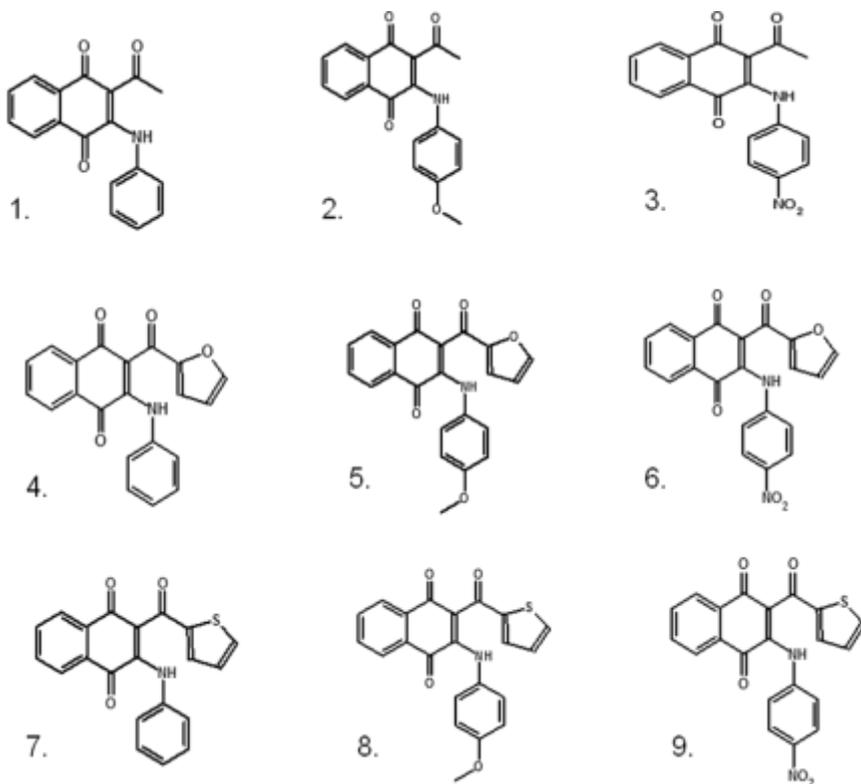
- Avaliar a citotoxicidade de nove 1,4 naftoquinonas substituídas sobre as linhagens tumorais MCF7 e seleção dos compostos mais promissores;
- Avaliar o efeito antiproliferativo dos compostos selecionados;
- Investigar o potencial genotóxico dos compostos selecionados através da avaliação de dano ao DNA plasmidial e ensaio cometa;
- Avaliar se a fotoativação por UV dos compostos selecionados potencializam o dano ao DNA;
- Caracterizar o tipo de interação com CT-DNA;
- Avaliar o efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas sobre o ciclo celular;
- Investigar o mecanismo de ação dos compostos selecionados com respeito ao tipo de morte celular induzida (apoptose/necrose) *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliar o envolvimento de estresse oxidativo na citotoxicidade e no tipo de morte celular induzida pelos compostos, através da determinação do conteúdo intracelular de EROs;
- Avaliar o potencial efeito antitumoral *in vivo* dos derivados das 1,4 naftoquinonas substituídas selecionadas;
- Avaliar a atividade antiangiogênica das 1,4-naftoquinonas substituídas selecionadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS

As 1,4-naftoquinonas (Figura 8) substituídas utilizadas neste estudo foram sintetizadas conforme artigo publicado (Anexo A,) pela parceria entre o Laboratório de Bioquímica Experimental – LABIOEX, UFSC e o Laboratório de Química Orgânica da Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile e gentilmente doadas para realização deste trabalho.

Resumidamente, a preparação do núcleo de 2-acil-3-fenilamino-1,4-naftoquinona foi iniciada com a síntese de 2-acilnaftohidroquinona via foto indução solar de Photo-Friedel-Crafts por acilação de 1,4-naftoquinona com aldeídos (BENITES, et al. 2011). Os compostos resultantes foram então oxidados com prata (I), óxido em diclorometano, e as correspondentes 2-acil-1,4-naftoquinonas foram feitas reagir *in situ* com fenilaminos selecionadas num processo de um-passo para produzir as correspondentes 1,4-naftoquinonas substituídas DPB1-DPB9 (RIOS, et al. 2012). As estruturas foram confirmadas quinonas por comparação de sua IR e de suas propriedades espectrais RMN's hidrogênio/carbono com os relatados na literatura (RIOS, et al. 2012).

Figura 8. Estruturas químicas dos 1,4-naftoquinonas substituídas.

Nota: 1: 2-Acetil-3-(fenilamino)-1,4-naftalenodiona (DPB1); 2: 2-Acetil-3-[(4-metoxifenil)amino]-1,4-naftalenodiona (DPB2); 3: 2-Acetil-3-[(4-nitrofenil)amino]-1,4-naftalenodiona (DPB3); 4: 2-(2-Furancarboxil)-3-(fenilamino)-1,4-naftalenodiona (DPB4); 5: 2-(2-Furancarboxil)-3-[(4-metoxifenil)amino]-1,4-naftalenodiona (DPB5); 6: 2-(2-Furancarboxil)-3-[(4-nitrofenil)amino]-1,4-naftalenodiona (DPB6); 7: 2-(Fenilamino)-3-(2-tiofenocarboxil)-1,4-naftalenodiona (DPB7); 8: 2-[(4-Metoxifenil)amino]-3-(2-tiofenocarboxil)-1,4-naftalenodiona (DPB8); 9: 2-[(4-Nitrofenil)amino]-3-(2-tiofenocarboxil)-1,4-naftalenodiona (DPB9).

3.2 MENSURAÇÕES ELETROQUÍMICAS

Os voltamogramas cíclicos das 1,4-naftoquinonas substituídas foram obtidos em um analisador eletroquímico Bioanalytical Systems BAS CV-50W, realizado pelo Laboratório de Química Orgânica da Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile.

3.3 CULTURA DE CÉLULAS

Células MCF-7 (linhagem de célula tumoral de mama humano) utilizadas neste estudo foram cultivadas e mantidas a 37 °C em uma atmosfera de CO₂ (5%) com 95% de umidade em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (ZHONG et al., 2006). As células são precedentes do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

As células do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) (carcinoma mamário de camundongos) utilizadas neste estudo para os ensaios *in vivo*, foram coletadas de camundongos inoculados intraperitonealmente com TAE após os tratamentos. Considerando que a inoculação deste tumor foi realizado no Biotério Setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX), CCB – UFSC.

3.4 ANIMAIS

Os ensaios antitumorais *in vivo*, foram realizados com camundongos isogênicos Balb/C (*Mus musculus*), machos (20 ± 2 g de peso), com aproximadamente 60 dias, obtidos a partir de reprodução controlada realizada no biotério setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX), CCB – UFSC.

Os animais foram pesados e divididos em grupos de 12 e mantidos em gaiolas plásticas, sendo que cada gaiola acondicionava 6 animais, sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12 hs, temperatura 25 ± 2 °C~60% umidade do ar), recebendo ração comercial autoclavada e água *ad libitum*.

Previamente à aplicação do protocolo experimental *in vivo*, submeteu-se esse projeto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número PP00744.

3.5 OVOS EMBRIONADOS

A avaliação do potencial antiangiogêncio foi realizada através da utilização de ovos de galinha (*Gallus domesticus*) fertilizados, adquiridos junto à empresa Tyson[®] do Brasil, localizada no município da Palhoça- SC.

Anteriormente a realização deste protocolo experimental *in vivo*, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número PP00610.

3.6 CITOTOXICIDADE DAS 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS

A citotoxicidade induzida pelas 1,4-naftoquinonas substituídas sobre células MCF7 foi avaliada pelo ensaio do MTT, que se baseia na viabilidade mitocondrial (MOSMANN, 1983). O ensaio procedeu-se da seguinte maneira: 1×10^4 células/mL foram adicionadas a placas de 96 poços e incubadas em estufa com ambiente controlado (temperatura de 37 °C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂). 24 horas após a incubação das células, o meio foi removido e substituído por outro contendo 1,4-naftoquinonas substituídas isoladas (0, 5, 10, 20, 40 e 80 µM). O controle negativo foi incubado somente com meio de cultura e a quantidade equivalente de veículo (DMSO a 0,25%).

Após o período de 24 horas de tratamento das células, o meio de cultura contendo os compostos foi retirado, as células lavadas com tampão fosfato-salina (PBS) a 37 °C. 100 µl de uma solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados e as células foram incubadas por 2 horas, em ambiente controlado. Decorrido esse período, o MTT excedente foi removido, sendo adicionado 100 µl de DMSO (PA) para solubilizar os cristais de formazan produzidos durante a incubação. Com auxílio de um leitor de placas (540 nm) foi realizada a avaliação espectrofotométrica das placas para determinar a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Os ensaios foram realizados em três experimentos distintos, sendo que cada concentração foi testada em triplicata. Os valores obtidos foram expressos em percentual de células viáveis de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{[(\text{Abs}_{\text{teste}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100]}{\text{Abs}_{\text{controle}}}$$

Considerou-se os valores dos controles negativo como 100% de viabilidade celular. Os valores de CI₅₀ (concentração inibitória 50%) foram calculados pelo software GraphPad Prism 5.0 utilizando-se os valores da média do percentual de viabilidade celular das três replicatas de cada concentração testada.

3.7 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA

Para a avaliação do potencial efeito antiproliferativo, realizou-se o ensaio de formação de colônia ou ensaio clonogênico (AITHAL et al., 2009). Placas de cultura de 6 poços contendo 500 células/poço e 2 mL de meio suplementado foram incubadas por 24h. Transcorrido este período, o meio de cultura foi substituído por outro contendo os compostos selecionados de acordo com a citotoxicidade: DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 (10 μ M/mL) e incubadas por 24h. O controle negativo foi incubado somente com meio de cultura e a quantidade equivalente de veículo (DMSO a 0,25%). Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS a 37 °C (3x) e o meio foi novamente substituído por outro meio fresco, seguido de uma nova incubação, agora com duração de cerca de 10-15 dias, ou até a verificação da presença de colônias (pelo menos uma colônia com cerca de 50 células), quando o ensaio foi finalizado. O meio foi retirado e as colônias coradas com uma solução de cristal violeta 0,2% para serem posteriormente visualizadas e quantificadas em contador de colônias, sendo os resultados expressos comparativamente ao controle negativo.

3.8 INTERAÇÃO COM DNA (DANO DIRETO AO DNA PLASMIDIAL)

Este ensaio foi realizado com a colaboração do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Claus Pich (UFSC, Araranguá). Para avaliar o potencial indutor de danos sobre o DNA induzido pelas 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1 a DPB9), foram utilizados plasmídeos Puc 9.1 isolados de *Escherichia coli* DH5 α FIQ.

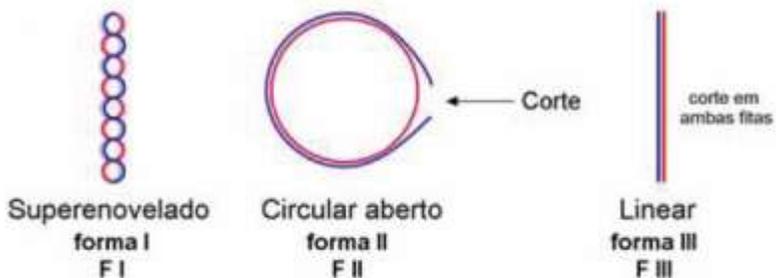
O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina, de acordo com as instruções presentes na bula do kit de extração Perfectprep Plasmid Mini da Eppendorf. A quantificação do DNA obtido foi realizada em espectrofotômetro de luz ultravioleta, com leitura em comprimento de onda de 260 nm, onde uma unidade de densidade ótica, em 260 nm, corresponde a 50 μ g/mL de DNA (BISO, 2008). O DNA plasmidial obtido, que não foi utilizado no momento da extração, foi estocado a 4 °C, por no máximo 5 dias.

Para a avaliação da atividade nucleásica foram incubados 5 μ l de uma solução de DNA plasmidial (600 ng), 5 μ l de tampão HEPES (Ph 7,4) e 10 μ l dos 1,4-naftoquinonas substituídas na concentração de 0,05 μ M, pelo período de 16 horas, a 50°C. Decorrido o período de incubação, o DNA foi submetido a uma corrida eletroforética (70-80 V) em tampão TBE (89 mM Tris Borato, 2 mM EDTA) por 30-45 min, realizada em gel de agarose 0,8%. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 g/mL, 20 min) e

então, as bandas foram visualizadas e fotografadas. As imagens foram enviadas, em seguida, para análise em software de bioinformática ImageJ 1.46, que compara a intensidade das bandas e a quantidade de pixels. A intensidade de DNA superenovelado foi corrigida por um fator de 1,47, como um resultado de sua menor capacidade de corar com brometo de etídio (SREEDHARA; COWAN, 2001). Nesse experimento, foi utilizado tampão HEPES e a quantidade equivalente de veículo (DMSO a 0,25%) como controle negativo (veículo de diluição dos compostos). Já no controle positivo adicionou-se a enzima de restrição EcoRI. Além de sua forma superenovelada (F I) normal o DNA plasmidial possui a forma circular aberta (F II) e a forma linear (F III). Quebras na dupla hélice fazem com que a forma superenovelada transforme-se em forma circular aberta através de quebras simples e forma linear através de quebra dupla de cadeia (Figura 7A). Todas as três possuem velocidades de migração eletroforéticas diferenciadas apresentando-se como bandas distintas em géis de eletroforese como demonstrado nas figuras 7B e 7C (SREDDHARA; COWAN, 2001).

Figura 9. Esquema de corte da molécula de DNA plasmidial (A); Fotografia de um gel de agarose demonstrando a separação das formas do DNA plasmidial, (B); Aparência típica de um gel obtido a partir de análise de diferentes concentrações de compostos e consequente corte do DNA plasmidial (C).

Figura 9A. Fotografia de um gel de agarose demonstrando a separação das formas do DNA plasmidial.



Fonte: modificado de BERG et al., 2008.

Figura 9B. Fotografia de um gel de agarose demonstrando a separação das formas do DNA plasmidial.

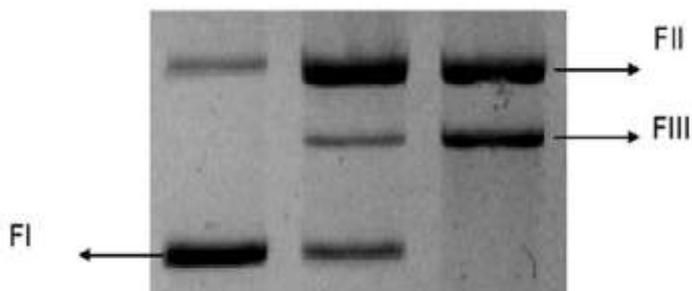
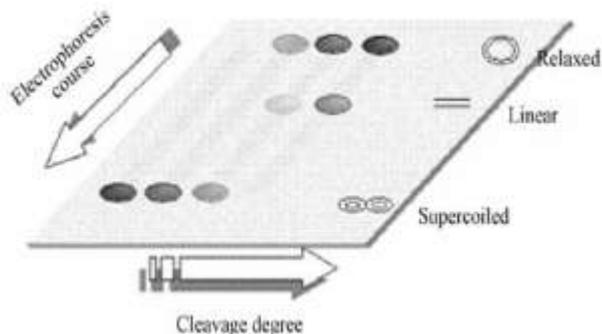


Figura 9C. Aparência típica de um gel obtido a partir de análise de diferentes concentrações de compostos e consequente corte do DNA plasmidial.



Fonte: MANCIN et al., 2005.

3.8.1 Efeito da luz UV-A sobre as 1,4-naftoquinonas substituídas na fragmentação do DNA plasmidial

A atividade das 1,4-naftoquinonas substituídas que apresentaram maior dano ao DNA plasmidial (DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5) foram analisadas sob pré-incubação (30 minutos) na luz UV-A, após incubação no

escuro a 37 °C. Quando uma molécula absorve um fóton de luz, o elétron presente nesta transição ganha energia e passa a ocupar um orbital mais energético. A molécula neste momento encontra-se em um estado excitado (singlete). Este estado tem uma meia-vida muito curta e pode decair para o estado não ativado com a emissão de um fóton (fluorescência). O estado singlete também pode sofrer uma conversão interna inter-sistema para o estado triplete. O estado triplete possui uma meia-vida maior e tende a ser importante em várias reações de fosforescência, neste estado, a molécula pode reagir com oxigênio molecular para produzir EROs, que pode promover a fragmentação do DNA (OCHSNER, 1997; KAWIAK, et al. 2007).

Após o período de pré-incubação e incubação, seguiram-se os procedimentos da corrida eletroforética do DNA plasmidial, revelação dos géis e análise dos mesmos, conforme foi descrito anteriormente.

3.9 MONITORAMENTO DE INTERAÇÕES DAS 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS COM DNA DE TIMO DE VITELÓ (CT-DNA), POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

Foi utilizada a titulação espectrofotométrica das 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1 a DPB9) com CT-DNA para se caracterizar a ligação destes compostos com moléculas de DNA (NAVARRO et al., 2003; BALDINI et al., 2003; ZHANG et al., 2004). Para caracterizar as 1,4-naftoquinonas substituídas que possuem alguma interação com CT-DNA, foram feitos espectros eletrônicos de varredura UV-Vis de soluções com CT-DNA (20 µM), para cada composto. A concentração dos compostos foi previamente determinada por varredura UV-Visível, sendo escolhida para utilização a que proporcionou um sinal de boa qualidade com pico de absorção bem definido (20 µM). Como controle positivo foi utilizado a doxorrubicina (20 µM), um quimioterápico que possui uma interação com o DNA, interação esta, através da intercalação (NEIDLE, 1979; KENNEDY et al., 2011b). Estas soluções foram analisadas imediatamente após seu preparo, sendo que os compostos, bem como o CT-DNA foram diluídos em água nanopura. Com esses espectros, foram avaliadas mudanças na absorção dos compostos, bem como deslocamento do comprimento de onda de absorção máxima.

3.10 MONITORAMENTO DE INTERAÇÕES DAS 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS COM DNA DE TIMO DE VITelo (CT-DNA), ATRAVÉS DE MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA

Com intuito de caracterizar se as 1,4-naftoquinonas substituídas em estudo interagem com CT-DNA por intercalação, foi utilizado Brometo de Etídeo, sendo que as medidas de fluorescência foram realizadas em um leitor de absorvância, iluinescência e fluorescência, TECAN Infinity M200[®], conforme adaptação da metodologia descrita por Silveira (2008). O comprimento de onda de excitação utilizado foi $\lambda_{ex} = 492$ nm e a fluorescência emitida foi medida em aproximadamente 620 nm. Para diluição do CT-DNA foi utilizado tampão fosfato 50 mM contendo 0,1 M de cloreto de sódio (NaCl), em pH = 7,4. O NaCl é utilizado para evitar uma segunda fixação do brometo de etídeo aos sítios do DNA.

A concentração de CT-DNA utilizada neste experimento foi de 20 μ M. O espectro de emissão do brometo de etídeo, na ausência e presença de DNA, foi registrado variando-se a concentração na faixa de 10 a 110 μ M. Esta variação de concentração do brometo de etídeo foi realizada para verificar o ponto de saturação de moléculas deste composto nos sítios de DNA. Após a concentração de brometo de etídeo ser estabelecida, o estudo de fluorescência foi realizado com o aumento das concentrações dos compostos DPB1, DPB2, DPB3, DPB4 e DPB5. A doxorubicina que além de possuir atividade nucleásica, também é um agente intercalante não específico de DNA, foi utilizada como controle positivo em concentrações crescentes (1, 10, 20, 30 e 40 μ M) (NEIDLE, 1979; KENNEDY et al., 2011b). As absorvâncias foram registradas em temperatura ambiente após 10 minutos da adição dos compostos.

3.11 TESTE DE INTERAÇÃO COM DNA – ENSAIO COMETA

Este teste, também chamado de SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis Assay), é capaz de detectar danos ao DNA induzido por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (VILELA, 2003).

O princípio do teste consiste no fato que as células embebidas em agarose, sofrem lise de suas membranas por detergentes e suas proteínas nucleares (inclusive as histonas) são extraídas com altas concentrações de sais. Por definição o resultado deste processo será um nucleóide, ou seja, uma série de alças superenoveladas de DNA desprovidas de histona (RIBEIRO, 2003). Como estes nucleóides serão submetidos a corrente elétrica, caso exista quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofre mudanças, visto que as alças de DNA se desenovelam formando um

halo permitindo uma migração dos fragmentos caracterizando uma cauda que deu origem ao nome do teste (RIBEIRO, 2003).

O ensaio cometa foi realizado conforme descrito por Silva et al. (2000) com algumas adaptações. No ensaio procedeu-se da seguinte maneira: células MCF7 numa densidade de 5×10^4 células/mL foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas em estufa com ambiente controlado (temperatura de 37 °C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂). 24 horas após a incubação das células, o meio foi removido e substituído por outro contendo os compostos selecionados DPB1 (80, 40 e 20 µM), DPB2 (88, 44 e 22 µM), DPB4 (60, 30 e 15 µM) e DPB5 (96, 48 e 24 µM). O controle negativo foi incubado somente com meio de cultura e a quantidade equivalente de veículo (DMSO a 0,25%).

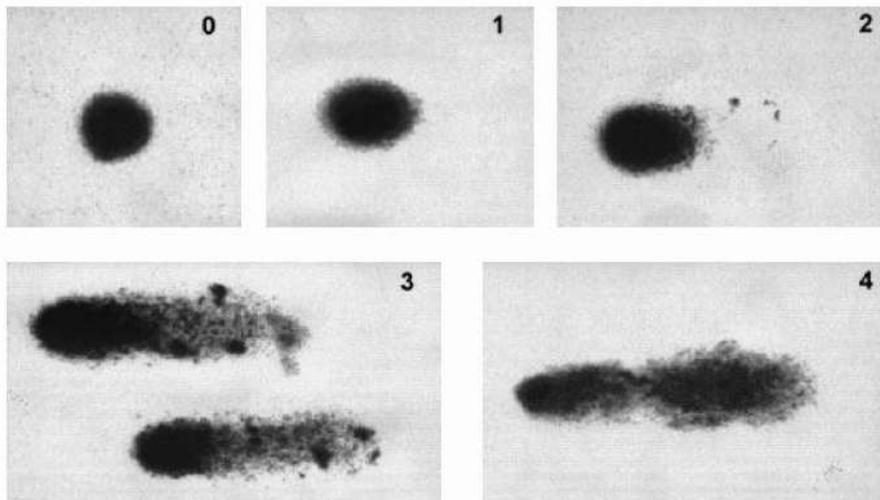
Após o período de 24 horas de tratamento das células, o meio de cultura contendo os compostos foi retirado e reservado, devidamente em eppendorfs identificados. As células foram então lavadas com PBS (2X) a 37 °C, tripsinizadas, ressuspensas em meio de cultura, para então serem adicionadas aos eppendorfs já com o meio que continha o tratamento com as 1,4-naftoquinonas substituídas. Os eppendorfs foram centrifugados por 5 minutos a 1000 rpm, após foi retirado o sobrenadante e adicionado 100 µl de agarose *low melting* (0,75%). Em seguida foi realizada a semeadura destas células tratadas sob uma lâmina pré-coberta com agarose (1,5%) onde foi adicionada uma lamínula para moldar o gel. As lâminas ficaram em temperatura ambiente por 10 minutos (até que a camada de agarose solidificasse) e depois as lamínulas foram removidas cuidadosamente e as lâminas posicionadas em uma cubeta contendo solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris; 1% Triton X-100 e 10% DMSO). Depois de no mínimo 2 horas, as lâminas foram retiradas da solução de lise e adicionadas com a parte horizontal do gel em uma cuba de eletroforese contendo solução tampão de eletroforese (300 mM NaOH; 1 mM EDTA; pH 13,00–13,50) suficiente para cobrir todas as lâminas por 20 minutos. A corrida eletroforética foi realizada por um período de 20 minutos nas condições de 300 mA em uma temperatura de 8°C. Todas as etapas descritas foram realizadas sob luz amarela para evitar fragmentação do DNA.

Após a eletroforese as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba e neutralizadas, utilizando solução de neutralização (0,4 M Tris HCL; pH 7,5). Este processo foi repetido três vezes em intervalos de 5 minutos, seguindo-se lavagem com água destilada e desidratação das lâminas em uma estufa a 37 °C. Posteriormente as lâminas foram hidratadas com água destilada e fixadas com solução fixadora (15 g de ácido Tricloracético; 5 g

sulfato de zinco ($7 \text{ H}_2\text{O}$); 5 mL glicerol; para 100 mL água destilada) por 10 minutos e lavadas três vezes com água destilada e levada a estufa 37°C por 1 hora e 30 minutos para secagem. Após, foram adicionado uma solução de brometo de etídio (0,5 mg/ml) sob as lâminas e então realizada a leitura no microscópio de fluorescência, com comprimento de onda de excitação em 515 nm e de emissão em 560 nm.

A análise consistiu em contar aleatoriamente 100 células de cada amostra em microscópio óptico de fluorescência com ampliação de 400 vezes para avaliação dos danos ao DNA. As células foram avaliadas visualmente e receberam uma classificação que varia de 0 (não danificada) a 4 (dano máximo) (Figura 8) de acordo com a intensidade e tamanho da cauda (VILLELA, 2003). Esta classificação foi multiplicada pelo número de células que a atingiram, ficando estabelecido um índice que pode variar de 0 (ausência completa de dano) até 400 (quantidade máxima de dano). Também foi avaliada a frequência de dano que demonstra o número de células danificadas entre as 100 células visualizadas podendo-se na comparação dos dados avaliar a intensidade com que determinada substância atinge o DNA (BORTOLOTTO et al., 2009).

Figura 10. Classificação dos danos no DNA. (onde a classe de dano índice 0 (zero) não apresenta fragmentação do DNA, e nas classes subseqüentes aparecem quantidades crescente de fragmentos, aumentando juntamente com sua classificação até dano índice 4).



Fonte: adaptado de Silva, Erdtmann, Henriques (2000).

3.12 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

Para avaliar os efeitos das 1,4-naftoquinonas substituídas nas fases do ciclo celular foi utilizado o PI/RNase *solution kit*, cujo princípio consiste na coloração dos ácidos nucleicos pelo PI (Iodeto de Propídeo), após a digestão do RNA. O PI, dependendo da fase do ciclo celular, emite diferentes intensidades de fluorescência que, por sua vez, são captadas pelos detectores fotomultiplicadores do citômetro de fluxo, através de variações no seu conteúdo de DNA, e, dessa forma, permite quantificar a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (GONG et al., 1994).

As células MCF7 em uma densidade de 2×10^5 células/mL foram inicialmente tratadas com nocodazol por 12h, para sincronizar as células na fase G2/M. Transcorrido este período, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foram adicionados os compostos selecionados (DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5) em uma concentração correspondente a CI_{30} (12 μ M; 13,2 μ M; 9 μ M e 14,4 μ M, respectivamente) e incubadas em estufa úmida a 37 °C, contendo 5 % de CO_2 por 24h. Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas duas vezes com solução PBS e o sobrenadante foi removido. O procedimento foi realizado conforme o kit do fabricante

(Immunostep, Espanha). Resumidamente, as células lavadas foram fixadas com 200 µl de etanol 70% e incubadas durante 30 min em temperatura de -4 °C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em PBS, contendo 2% de albumina bovina e centrifugadas 200xg, durante 10 min. Posteriormente, adicionou-se ao pellet celular 500 µl de solução de PI contendo Rnase. A suspensão permaneceu 15 min em temperatura ambiente antes da análise no citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) utilizando o software BD CELLQuest™. O controle negativo foi preparado com células sem serem tratadas com os compostos para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo.

3.13 ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓTICA *IN VITRO*

Para avaliação da atividade pró-apoptótica *in vitro* foi utilizado o kit FITC Annexin V Apoptosis Detection da BD Pharmingen (San Diego, CA, USA), conforme as instruções do fabricante, por citometria de fluxo. Durante apoptose as células modificam a estrutura de suas membranas plasmáticas (MP) para sinalizar seu suicídio ao ambiente. A externalização da fosfatidilserina (BEM) na superfície celular é uma das mudanças estruturais que ocorre sendo reconhecida pelos fagócitos. Anexina V é uma proteína de ligação para fosfolípidos que exhibe alta afinidade para ligação seletiva a BEM. Já o Iodeto de Propídeo, só consegue ultrapassar a membrana plasmática quando esta apresenta ruptura, ou seja, entra no processo de morte celular por necrose.

Para realização deste ensaio, células MCF7, em uma densidade de 10^6 células/mL foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas por 24h para permitir sua aderência. Transcorrido este período, o meio foi removido e substituído por um meio contendo as 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1 a DPB9) em concentração subtóxica (15 µM), pelo período de 24 horas. O controle negativo foi tratado com meio de cultura fresco e o volume respectivo de veículo (DMSO a 0,25%). Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS (3X) a 37 °C, tripsinizadas e novamente foi realizada lavagens com PBS (3X) a 37 °C e ressuspensas em 200 µl do tampão de ligação (0,1 M HEPES/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) previamente diluído na proporção 1:10 em água destilada. Foram adicionados 5 µl de anexina V, seguidos de incubação no escuro pelo tempo de 15 min. Por fim, foram adicionados 5 µl de iodeto de propídeo e realizada a análise no citômetro de fluxo. A intensidade de fluorescência da anexina V-FITC e do iodeto de propídeo foram

mensuradas utilizando um filtro de excitação à 488nm e de emissão na faixa de 515-545 e 564-606 nm, respectivamente (BDPHARMIGEN™, 2011).

O citômetro foi calibrado com três controles: controle normal (células não tratadas, com objetivo de descontar a autofluorescência emitida pelas mesmas), controle positivo para apoptose (células tratadas com doxorubicina na concentração de 1,5 µg/mL) e controle positivo para necrose (células não tratadas, porém congeladas em freezer -80 °C por 20 minutos após a sua tripsinização). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software Winmdi.

O tipo de morte celular induzido pelos tratamentos foi classificado da seguinte maneira: células marcadas apenas com anexina V foram consideradas em apoptose inicial; células marcadas com anexina V e iodeto de propídeo foram consideradas em apoptose tardia; já células marcadas apenas com iodeto de propídeo foram consideradas necróticas. Os resultados foram expressos como percentual de células em apoptose inicial e tardia e em necrose.

3.14 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE EROS

A concentração intracelular de EROs foi determinada conforme descrito por Glorieux e colaboradores (2011). Células MCF7 na densidade celular de $1,5 \times 10^4$ células/mL foram incubadas por 24h e transcorrido esse período, o meio de cultura foi retirado e adicionado 1 mL de 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA 10 µM) previamente diluída em HBSS à temperatura de 37 °C e incubadas novamente por 30 min. O excesso de DCFH-DA foi removido por lavagem com tampão de HBSS. As células foram então incubadas durante 2h com as 1,4-naftoquinonas substituídas que apresentaram maior citotoxicidade (DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 – 15 µM), lavou-se mais duas vezes com HBSS, em seguida, 100 µl de HBSS/poço foi adicionado. O controle negativo foi tratado com meio de cultura fresco e o volume respectivo de veículo (DMSO a 0,25%). A intensidade de fluorescência foi avaliada usando filtros de excitação a 485 nm e emissão a 520 nm. Mudanças nas concentrações intracelulares de EROs foram determinadas seguindo a fórmula a seguir: $DF/F0 = (Ft - F0)/F0$, onde F0 representa a fluorescência inicial e Ft representa a fluorescência mensurada a cada intervalo de tempo avaliado (GLORIEUX et al., 2011).

A dosagem de proteínas totais presentes no homogenato foi mensurada pelo método de Bradford utilizando o kit Coomassie (Bradford)

Protein Assay da Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA) e seguindo as instruções do fabricante.

3.15 ENSAIO DE IMUNOELETROFORESE PARA CDK2, PARP, P53 E γ H2Ax

Após, realizados os devidos tratamentos das células MCF7 em cultura com as 1,4-naftoquinonas substituídas em uma concentração correspondente a CI_{30} (12 μ M; 13,2 μ M; 9 μ M e 14,4 μ M, respectivamente) por um período de 24 horas, as células foram lavadas 3x com PBS e tratadas com o tampão de lise RIPA em pH 7,4 (Tris-Cl 25 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, desoxicolato de sódio 0,25% e fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1 mM) suplementado para uso com um coquetel inibidor de proteases 1% e outro inibidor de fosfatases 3%, ambos procedentes da Sigma-Aldrich®. A concentração de proteínas presente em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford por meio de um kit para determinação (BioRad). Em seguida, as amostras foram desnaturadas em tampão Laemmli em pH 6,8 composto por Tris-Cl 60 mM, dodecil sulfato de sódio 2% (SDS), glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5% e 0,01% de azul de bromofenol. Quantidades de proteínas adequadas (40-50 μ g) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas em tampão bloqueador (5% de leite desnatado seco, Tris 20 mmol/L, pH 7,6, NaCl 150 mmol/L, 0,01 % de Tween -20) durante 1h à temperatura ambiente, o que foi seguido por incubação com o anticorpo primário durante a noite a 4 °C. As membranas foram então lavadas e incubadas durante 60 min com um derivado anticorpo. A detecção das bandas foi feita com um kit para detecção de quimiluminescência (Amersham®) e as imagens foram obtidas por revelação em filme de raio-X. Anticorpos monoclonais primários de coelho contra cdk2, PARP, p53 e γ H2Ax foram adquiridos da Santa Cruz Biotech®. Os anticorpos secundários de coelho foram adquiridos da Santa Cruz Biotech®. Para o controle da carga de proteínas utilizava-se como marcador a β -actina da Abcam (Cambridge, UK).

3.16 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

3.16.1 Protocolo do Modelo Experimental da forma ascítica do carcinoma de Ehrlich (TAE)

Para este ensaio, foi utilizado o modelo experimental com camundongos Balb/c, pesando 20 ± 2 g e distribuídos em nove diferentes grupos experimentais (n= 6): I) controle negativo (TAE + solução de NaCl 0,9%); II) controle positivo (TAE + Doxorrubicina); III) grupo tratado com DPB1 (TAE + DPB1); IV) grupo tratado com DPB2 (TAE + DPB2); V) grupo tratado com DPB4 (TAE + DPB4); VI) grupo tratado com DPB5 (TAE + DPB5).

Os camundongos foram inoculados com 5×10^6 células tumorais no peritônio em condições assépticas, sendo considerado dia zero (0). O tratamento dos animais iniciou-se 24h após a inoculação das células do TAE, administrando-se doses de DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 (0,5 mM/kg) ou doxorrubicina (1,2 mg/kg), durante 9 dias consecutivos. Os animais do grupo I receberam 50 μ l de uma solução de NaCl 0,9% diariamente durante o mesmo período de tratamento. Todos os tratamentos foram realizados por via intraperitoneal (i.p.).

No décimo dia, os animais de cada grupo foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical, sendo retirado o líquido ascítico para a realização das análises.

3.16.2 Avaliações morfológicas

3.16.2.1 Avaliação da Variação de Peso

A variação de peso dos camundongos foi calculada através da diferença entre o peso final (após os 9 dias de tratamento) e o peso inicial dos animais (peso que os mesmos apresentavam no dia da inoculação do tumor, dia 0). Os resultados obtidos foram expressos em gramas (KVICINSKI et al., 2008).

3.16.2.2 Avaliação da Inibição do Crescimento Tumoral

A variação da circunferência abdominal dos camundongos foi calculada a partir da diferença entre a medida final (após os 9 dias de tratamento) e a medida inicial (medida que os mesmos apresentavam no dia da inoculação do tumor, dia 0) da circunferência abdominal dos animais. Os resultados obtidos foram expressos em centímetros (KVICINSKI et al., 2008).

A inibição do crescimento tumoral foi calculada a partir da variação da circunferência abdominal obtida após 9 dias de tratamento dos animais com os compostos e associações, através da seguinte fórmula:

Inibição do crescimento tumoral (%) = [(variação da circunferência abdominal apresentada pelo tratamento X 100) / variação da circunferência abdominal apresentada pelo grupo controle negativo] – 100 (KVIECINSKI et al., 2011a).

3.16.3 Avaliações histocitológicas

3.16.3.1 Determinação do volume total de líquido ascítico e volume de células compactadas

O volume ascítico total foi mensurado utilizando tubos falcon graduados. Após a centrifugação a 1000 g por 5 min dos respectivos tubos preenchidos com todo líquido retirado dos animais foi determinado o volume de células compactadas (KVIECINSKI et al., 2008).

3.16.3.2 Determinação da relação de células inviáveis e viáveis

Após 9 dias de tratamento foram retiradas alíquotas de líquido ascítico (10 µl) dos camundongos previamente tratados com as 1,4-naftoquinonas substituídas e adicionado 890 µl de salina e 100 µl de azul de tripan. Foi realizada a contagem das células viáveis e inviáveis com auxílio de um microscópio. Esta relação foi calculada a partir da divisão do número de células inviáveis por células viáveis.

3.16.3.3 Determinação do tipo de morte celular induzido

O tipo de morte celular induzido pelas 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5) foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o kit FITC Annexin V Apoptosis Detection da BDPharmingen (San Diego, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Após 9 dias de tratamento foram retiradas alíquotas de líquido ascítico dos camundongos previamente tratados contendo 10^6 células/mL. Posteriormente, as células foram lavadas em PBS (3X) e ressuspensas em 200 µl do tampão de ligação (0,1 M HEPES/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl_2) previamente diluído na proporção 1:10 em água destilada. Foram adicionados 5 µl de anexina V, seguidos de incubação no escuro pelo tempo de 15 min. Por fim, foram adicionados 5 µl de iodeto de propídeo e realizada a análise no citômetro de fluxo. A intensidade de fluorescência da anexina V-FITC e do iodeto de propídeo foram mensuradas utilizando um

filtro de excitação à 488 nm e de emissão na faixa de 515-545 e 564-606 nm, respectivamente (BDPHARMIGENTM, 2012).

O citômetro foi calibrado com três controles: controle normal (células retiradas de camundongos portadores do TAE e não tratados, a fim de se descontar a autofluorescência emitida pelas mesmas), controle positivo para apoptose (células retiradas de camundongos portadores do TAE não tratados submetidos a radiação UV por um período de 20 minutos) e controle positivo para necrose (células retiradas de camundongos portadores do TAE não tratados e posteriormente congeladas em freezer -80°C por 20 minutos após a sua lavagem). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software WinmDi.

O tipo de morte celular induzido pelos tratamentos foi classificado da seguinte maneira: células marcadas apenas com anexina V foram consideradas em apoptose inicial; células marcadas com anexina V e iodeto de propídeo foram consideradas em apoptose tardia; já células marcadas apenas com iodeto de propídeo foram consideradas necróticas. Os resultados foram expressos como percentual de células em apoptose inicial e tardia e em necrose.

3.17 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA *IN VIVO*

A avaliação da atividade antiangiogênica das 1,4-naftoquinonas substituídas selecionadas foi realizada através do ensaio da membrana corioalantóica (CAM), de acordo com a metodologia descrita por Nguyen, Shing e Folkman (1994). Ovos fertilizados da espécie *Gallus domesticus* foram incubados em uma incubadora automática e digital Chocmaster®, na posição horizontal, à temperatura de 37 °C e sob umidade relativa do ar de 33%. Após 48h de incubação (2 dias), uma pequena janela de 5 mm de diâmetro foi aberta na casca, na região onde se localiza a câmara de ar do ovo e, assim, uma quantidade de cerca de 5 mL de clara foi retirada a fim de se evitar a aderência dos embriões nas membranas ovulares.

Em seguida, outra janela (cerca de 15 mm de diâmetro) foi aberta na região do ovo posicionada acima da região da membrana corioalantóica dos embriões. As janelas foram fechadas com auxílio de fita adesiva e fita isolante de cor preta para minimizar a perda de umidade. Os embriões permaneceram assim, sob incubação, por mais 72h até a idade embrionária de 5 dias ou 120h, quando um disco de metilcelulose (1,5%) adsorvido com DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 (50, 75 e 100 µM) e DPB2 (5, 10 e 20 µM), foi implantado sobre os vasos sanguíneos no terço externo da membrana corioalantóica. O orifício foi novamente fechado com a fita adesiva e fita isolante. Assim a incubação prosseguiu por mais 48h, até a idade

embrionária de 8 dias, quando se realizou a análise da atividade antiangiogênica.

A fita foi retirada e os dados referentes ao desenvolvimento embrionário e vascular na região de implantação do disco foram registrados. Uma câmera fotográfica acoplada a um estereomicroscópio com aumento de 20x capturou imagens que foram enviadas para um microcomputador, onde cada imagem foi utilizada para se realizar uma contagem de vasos sanguíneos que interceptam o disco. Os resultados foram expressos como percentual de vasos \pm desvio-padrão, em relação ao grupo controle negativo.

3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através do método de análise de variância ANOVA, complementada por Tukey-Kramer, e o teste de Barlett quando necessário, admitindo-se um nível de significância de, no mínimo, $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS

Os valores dos ponteciais de meia-onda, $E_{1/2}^I$ e $E_{1/2}^{II}$, avaliados a partir de voltamogramas obtidos em uma velocidade de varredura de 100 mVs⁻¹, e os LogP das 1,4-naftoquinonas substituídas são apresentados na (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades eletroquímicas das 1,4-naftoquinonas substituídas.

	Potencial (mV)		LogP (calcd)
	$E_{1/2}^I$	$E_{1/2}^{II}$	
DPB1	-578,60	-1145,10	1,68
DPB2	-596,50	-1201,00	1,63
DPB3	-376,50	-914,80	2,14
DPB4	-578,30	n.d.	2,23
DPB5	-609,20	-1185,00	2,18
DPB6	-349,80	-902,50	2,68
DPB7	-552,00	n.d.	3,12
DPB8	-600,80	-1106,60	3,07
DPB9	-375,70	-875,20	3,58

Nota: n.d. = não detectável.

Em relação às propriedades redox e sua influência na citotoxicidade, estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa do laboratório LABIOEX e GTXOX desmonstraram que a atividade citotóxica de 1,4-naftoquinonas depende em grande parte da sua hidrofobicidade e do potencial de meia-onda (BENITES et al., 2010; BENITES et al., 2011; VASQUEZ et al., 2011). A literatura científica indica que compostos que possuem os valores do $E_{1/2}^I$ menos negativos são mais fáceis de reduzir que aqueles com valores mais negativos. Por outro lado, Vasquez e colaboradores (2011) demonstraram que o processo de ciclo de redox envolve o equilíbrio entre o progenitor quinona e o respectivo radical semiquinônico. Portanto, a formação da correspondente semiquinona radical, por meio de redução com ácido ascórbico e a geração de EROs no processo redox é provavelmente mais favorável para aquelas quinonas com valores de $E_{1/2}^I$ menos negativos. Neste sentido, de acordo com a Tabela 1, podemos sugerir que os compostos DPB3, DPB6 e DPB9, que

apresentaram valores de $E_{1/2}^I$ maiores que os demais compostos, teriam um efeito citotóxico maior. Entretanto, resultados posteriores revelaram que não há uma relação direta entre $E_{1/2}^I$ e citotoxicidade para os compostos em estudo, além de que a citotoxicidade dependerá também da linhagem celular de câncer estudada.

4.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA

As antraciclinas são os agentes quimioterápicos com núcleo quinóide mais eficazes e amplamente utilizados na terapia do câncer, no entanto, seu uso é limitado pelo desenvolvimento de resistência à quimioterapia e graves efeitos adversos como a cardiotoxicidade, insuficiência cardíaca congestiva e vômitos (CORTES-FUNES; CORONADO, 2007; CHRISTOFFERSEN et al., 2009). Diante disto, modificações químicas na estrutura do fármaco têm sido propostas nos últimos anos com o objetivo de promover versões farmacológicas mais eficazes, seletivas, bem como minizar seus efeitos colaterais. Neste sentido, o presente trabalho estudou nove compostos sintéticos, 1,4-naftoquinonas substituídas, contendo modificações estratégicas no núcleo quinóide, com intuito de caracterizar o potencial antitumoral e antiproliferativo.

Alguns estudos já vêm demonstrando que mudanças estruturais estratégicas no núcleo quinóide, que tem por característica estrutural a presença de duas unidades carbonílicas (C=O) conjugadas com pelo menos duas ligações duplas (CC) formando um sistema cíclico de seis membros, promovem mudanças significativas na citotoxicidade para células MCF7, DU145, T24, J82, AGS, SK-BEM-1 e prejudicam a capacidade proliferativa das células T24 (BENITES et al., 2010; VALDERRAMA et al., 2011; EMADI et al., 2011). Segundo alguns autores esta atividade citotóxica pode ser devido a presença do núcleo quinóide, unidade eletroativa, que pode sofrer uma redução enzimática de um ou dois elétrons que são catalisadas por flavoenzimas, utilizando NADPH como um doador de elétrons. Este processo leva a formação de radicais intermediários semiquinona e reações subsequentes com oxigênio, gerando desta forma EROs, os quais se crê ser responsável pela maior parte do atividade citotóxica e antiproliferativa destes compostos (GUTIERREZ, 2000; ABREU et al., 2002).

As moléculas estudadas no presente trabalho são 1,4-naftoquinonas com alterações estruturais, sendo que o princípio destas substituições estratégicas seria diminuir a eletrofilidade, potencializando assim o ciclo redox, e conseqüentemente elevando a geração de EROs, principalmente H_2O_2 , culminando com um maior citotoxicidade às células tumorais uma

vez que estas tem as defesas antioxidante pouco ativa (VERRAX et al., 2011a).

A Tabela 2 apresenta a citotoxicidade, os valores de CI_{50} ($\mu\text{M}/\text{mL}$) obtidos após a incubação de células MCF-7 com as 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1 a DPB9) em uma faixa crescente de concentração (5 – 80 $\mu\text{M}/\text{mL}$) durante o período de 24 horas.

Tabela 2. Valores de CI_{50} obtidos após o tratamento de células MCF7 com as 1,4-naftoquinonas substituídas 1 a 9 (5 a 80 μM) pelo período de 24 horas.

Compostos	CI_{50} (μM) para MCF7
DPB1	20,3 \pm 1,8
DPB2	22,6 \pm 8,0
DPB3	48,6 \pm 6,6
DPB4	15,0 \pm 8,5
DPB5	23,9 \pm 8,1
DPB6	56,0 \pm 8,7
DPB7	34,8 \pm 8,2
DPB8	28,6 \pm 7,5
DPB9	30,1 \pm 5,5

Nota: Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão dos valores de CI_{50} dos 1,4-naftoquinonas substituídas.

Como se pode visualizar na tabela 2 e apresentado no artigo de Farias e colaboradores (2013) (ANEXO B), as 1,4-naftoquinonas substituídas em estudo apresentaram efeito citotóxico importante para células MCF7 ($< 50 \mu\text{M}$), com exceção do composto DPB6 (56 μM), em um período de 24h de incubação. Além disso, observa-se que os compostos DPB4, DPB1, DPB2 e DPB5 apresentaram maior citotoxicidade (15 μM , 20,3 μM , 22,6 μM e 23,9 μM , respectivamente), sendo considerados os compostos mais ativos.

Os efeitos citotóxico de quinonas têm sido relacionados, por alguns estudos, a uma propriedade química intrínseca da unidade quinonoídica, associada a outros fatores estruturais, os quais são responsáveis pela intensidade da atividade antitumoral (DA SILVA et al., 2003; GARUTI, et al., 2004). Outros estudos têm relatado também que o efeito citotóxico apresentado por estes compostos depende diretamente da natureza dos

substituintes associados ao grupo quinonoídico, uma vez que os mesmos podem interferir no equilíbrio do sistema quinóide afetando a ocorrência do ciclo redox e conseqüentemente, a produção de EROs (GARUTI, et al., 2004; BENITES et al., 2008a e b; BENITES et al., 2009).

Neste sentido, verificou-se que dentre os compostos que apresentaram maior citotoxicidade, DPB4 e DPB1 não apresentam em sua estrutura química o radical metil, enquanto os compostos DPB2 e DPB5 apresentam este radical na posição 2. Benites e colaboradores (2010) revelaram numa análise de relação estrutura atividade de aminonaftoquinonas, que a inserção de um grupo metil ao átomo de nitrogênio da fenilaminonaftoquinonas induziu uma diminuição na atividade citotóxica dos compostos, sugerindo que a interação estereo-eletrônica entre os fragmentos doadores e aceptores, através do nitrogênio, parece ser fundamental para a atividade citotóxica do cromóforo fenilaminonaftoquinona.

Além disso, corroborando nossos resultados, estudos anteriores têm mostrado que mono ou dimetil substituição de 1,4-naftoquinona na posição 2 ou 2 e 3, respectivamente, diminui a sua citotoxicidade, quer devido à baixa taxa de ciclo redox, causada pelos mais baixos potenciais redox impostos por substituição do radical metil, ou pela menor taxa de adição eletrofílica (ROSS et al. 1986; ÖLLINGER; BRUNMARK, 1991).

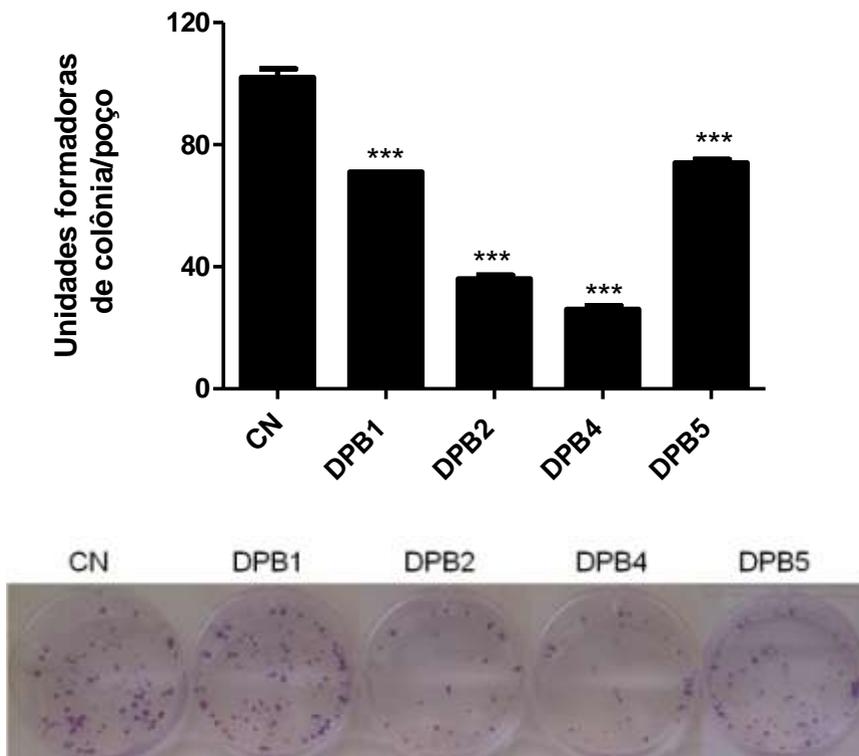
Os resultados relacionados ao efeito citotóxico nos permitem ainda relatar que os compostos DPB7, DPB8 e DPB9, que apresentaram citotoxicidade semelhante ($\approx 30 \mu\text{M}$), tem em sua estrutura o radical tioenocarbonil, o que sugere que a adição deste radical parece ser crucial para redução da atividade citotóxica destes compostos. Além disso, de acordo com Rios e colaboradores (2012), estes compostos, bem como DPB3 e DPB6, apresentam uma maior lipofilicidade, enquanto que os compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 apresentam uma maior hidrofiliabilidade, sugerindo-se, portanto, que as propriedades de lipofilicidade em conjunto com a capacidade redox de cada composto podem facilitar interações com os alvos biológicos envolvidos na atividade citotóxica.

Por fim, verificou-se que a toxicidade das 1,4-naftoquinonas substituídas em estudo é influenciada principalmente pelos substituintes ligados diretamente ao núcleo naftoquinona onde grupos doadores e aceptores de elétrons modulam as propriedades eletrônicas do átomo de nitrogênio presente nessas moléculas, facilitando ou dificultando a ocorrência do ciclo redox (BENITES et al., 2009).

4.3 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Os resultados referentes à avaliação da atividade antiproliferativa são apresentados na figura 11. Como se pode observar, os compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 apresentaram atividade antiproliferativa significativa, em torno de 30%, 65%, 75% e 27,5% respectivamente. Avaliando-se o número de colônias formadas após o tratamento das células com as naftoquinonas na concentração de 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$, pode-se verificar que DPB4 apresentou maior efeito antiproliferativo que os demais compostos, o que pode estar associado ao fato desta naftoquinona ter apresentado maior citotoxicidade em células MCF7. Portanto, assume-se que houve um efeito citostático já que se observou uma redução do número de colônias, estando implícito que houve uma redução na taxa proliferativa dessas células em face dos tratamentos com as 1,4-naftoquinonas substituídas estudadas.

Figura 11. Efeitos das 1,4-naftoquinonas substituídas sobre a capacidade proliferativa de células MCF7.



Nota: Os resultados são representados pela média do número de unidades formadoras de colônia \pm Desvio-Padrão, $n=3$. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle (CN).

Dados da literatura têm demonstrado que EROs geradas pelo ciclo redox de quinonas, podem atuar bloqueando a reação de óxido-redução catalisada pela GADPH, ao inativarem esta enzima ou ao depletarem os níveis de NAD^+ requeridos para a ocorrência da via glicolítica (VERRAX et al., 2007). Diante dos resultados apresentados, sugere-se que o efeito citostático apresentado pelos compostos em estudo, pode ser reflexo de interferências na via glicolítica causadas por esses tratamentos.

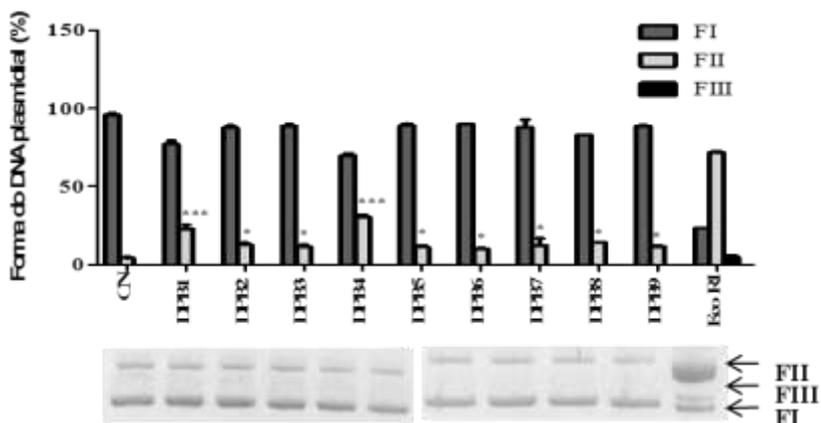
Por outro lado, a proliferação de células tumorais tem sido associada com a via do fosfoinositol 3-quinase (PI3K), que medeia efeitos na transdução de sinal e na expressão gênica que contribuem para tumorigenese (CHANG et al., 2003). Neste sentido, e corroborando os resultados obtidos neste trabalho, Chae e colaboradores (2012) demonstraram que a naftoquinona juglona inibe a proliferação de células tumorais, provavelmente pelo bloqueio da via de sinalização PI3K/AKT.

4.4 POTENCIAL DE DANOS DIRETOS AO DNA PLASMIDIAL DAS 1,4- NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS

Alguns autores têm sugerido que o potencial redox das quinonas tem sido correlacionado com quebras da fita do DNA (WANG et al., 2003; LI et al., 2005) o que levou este estudo a avaliar o potencial de indução de dano direto ao DNA plasmidial pelas 1,4- naftoquinonas substituídas.

As corridas eletroforéticas revelaram que os compostos na concentração de 0,05 μM , foram capazes de promover fragmentação do DNA plasmidial, alterando desta forma seu perfil eletroforético normal (conformação superenovelada – FI) (Figura 12 e Tabela 3).

Figura 12. Efeito sobre o DNA plasmidial das 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1 a DPB9) na concentração de 0,05 μM após 16 horas de incubação a 50 °C.



Nota: Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= controle negativo, DNA tratado apenas com o veículo de diluição

das 1,4-naftoquinonas substituídas. EcoRI= controle positivo, DNA tratado com o veículo de diluição das 1,4-naftoquinonas substituídas e enzima de restrição EcoRI. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$), (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle negativo (CN).

Tabela 3. Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas (0,05 μ M) sobre o DNA plasmidial.

Compostos	Formas do DNA plasmidial (%)		
	FI	FII	FIII
CN	95,97	4,03	0,00
DPB1	77,09	22,91***	0,00
DPB2	87,54	12,46*	0,00
DPB3	88,55	11,45*	0,00
DPB4	69,68	30,32***	0,00
DPB5	88,99	11,01*	0,00
DPB6	89,87	10,13*	0,00
DPB7	87,98	12,02*	0,00
DPB8	83,02	13,98*	0,00
DPB9	88,61	11,39*	0,00
EcoRI	23,26	71,80	4,86

Nota: Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= controle negativo, DNA tratado apenas com o veículo de diluição das 1,4-naftoquinonas substituídas. EcoRI= controle positivo, DNA tratado com o veículo de diluição dos 1,4-naftoquinonas substituídas e enzima de restrição EcoRI. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$), (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle negativo (CN).

Embora, os compostos DPB3, DPB6, DPB7, DPB8 e DPB9 não tenham apresentado efeito citotóxico tão relevante quanto os demais compostos avaliados, os mesmos foram capazes de promover a fragmentação do DNA. Por outro lado, destacam-se os compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5, que promoveram um aumento de quebras simples 5, 3, 7 e 3 vezes maior que o controle negativo. Portanto, sugere-se que um dos mecanismos pelos quais estes compostos promovem a morte das células tumorais analisadas seja pelo dano direto ao DNA.

Como controle positivo foi utilizado a enzima EcoRI, uma enzima isolada a partir de cepas de *Escherichia coli* e que é utilizada como uma enzima de restrição (KURPIEWSKI et al., 2004). Estas enzimas degradam os ácidos nucleicos em pontos de corte específicos, mas podem também exibir corte não específico, dependendo das condições presentes na reação (baixa concentração de sal, concentração de glicerol elevada, quantidade excessiva de enzima presente na reação, pH elevado e contaminação por certos solventes orgânicos) (NELSON; COX, 2000; KURPIEWSKI et al., 2004).

Tem sido demonstrado na literatura que a introdução de quebras nas fitas de DNA compromete a integridade da informação genética e conseqüentemente a viabilidade celular e que as clivagens causadas na dupla fita do DNA são mais letais para as células, pois são mais difíceis de serem refeitas pelos processos de reparação enzimática (LIU et al, 1999).

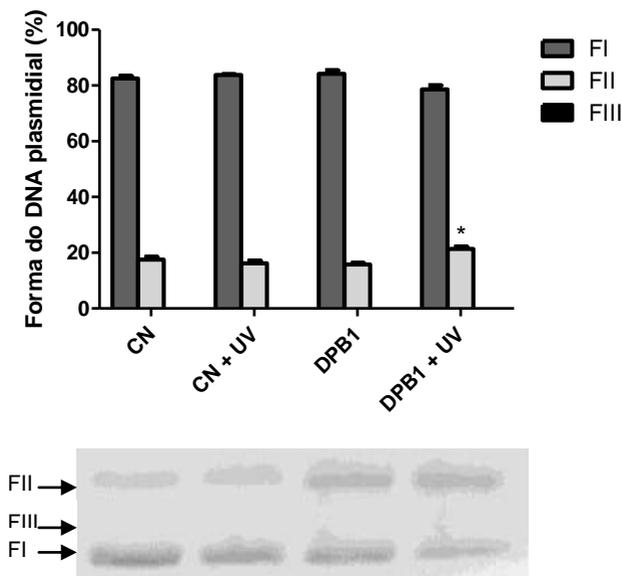
Diante destes dados na literatura e corroborando nossos resultados, Chen e colaboradores (2011) demonstraram que a plumbagina, um derivado de 1,4-naftoquinona foi citotóxico para células de tumor hepático humano (BEL7404) e esta citotoxicidade foi relacionada ao dano direto ao DNA. Kumar e colaboradores (2009) também demonstraram que o composto 1,4-naftoquinona induziu a citotoxicidade em células B16F1 (linhagem tumoral de melanoma de murino), reduziu a proliferação destas células tumorais, através do ensaio clonogênico, bem como induziu a fragmentação do DNA, sendo este dano relacionado à produção de EROs geradas pelo composto 1,4-naftoquinona, resultado semelhante ao apresentado neste trabalho.

4.5 EFEITO DA LUZ UV-A NO POTENCIAL DE DANOS DIRETOS DE 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS AO DNA PLASMIDIAL

A partir dos resultados apresentados pelas 1,4-naftoquinonas substituídas (0,05 μM) sobre o DNA plasmidial, foram escolhidos os derivados DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5, que apresentaram maior citotoxicidade as células MCF7 e promoveram a fragmentação do DNA para avaliar se os compostos na presença de luz UV-A (365 nm) são fotoativados, promovendo assim um maior dano ao DNA plasmidial.

As Figuras 13A, 13B, 13C e 13D e as Tabelas 4, 5, 6 e 7 apresentam os resultados do efeito da luz UV-A no potencial indutor de dano direto no DNA plasmidial dos derivados de 1,4 naftoquinonas DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5.

Figura 13A. Dano direto ao DNA plasmidial de DPB1 (0,05 μ M) na presença de luz UV-A (pré-incubação de 30 minutos).



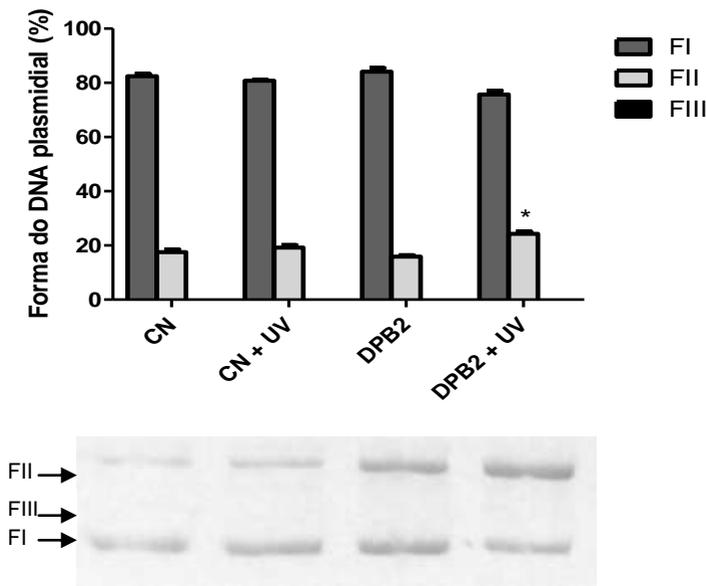
Nota: Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= controle negativo, DNA tratado apenas com o veículo de diluição das 1,4-naftoquinonas substituídas. UV-A= radiação ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm, os compostos e controle foram pré-incubados a esta radiação por 30 minutos. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao composto sem exposição a radiação UV-A.

Tabela 4. Efeito da luz UV-A no potencial indutor de dano direto no DNA plasmidial da 1,4-naftoquinona substituída DPB1 (0,05 μM) sobre o DNA plasmidial.

Compostos	Formas do DNA plasmidial (%)		
	FI	FII	FIII
CN	82,50	17,50	0,00
CN + UV	83,78	16,22	0,00
DPB1	84,18	15,82	0,00
DPB1 + UV	78,66	21,34*	0,00

Nota: Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= controle negativo, DNA tratado apenas com o veículo de diluição das 1,4-naftoquinonas substituídas. UV-A= radiação ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm, os compostos e controle foram pré-incubados a esta radiação por 30 minutos. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao composto sem exposição a radiação UV-A.

Figura 13B. Dano direto ao DNA plasmidial de DPB2 (0,05 μ M) na presença de luz UV-A (pré-incubação de 30 minutos).



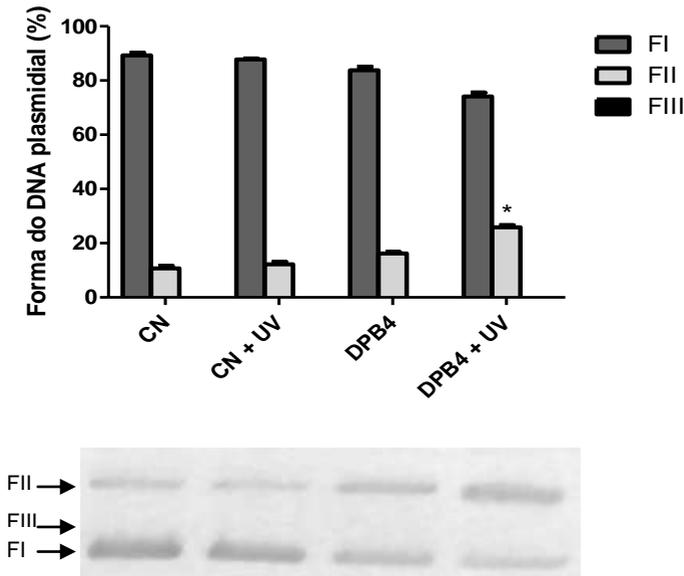
Nota: Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= controle negativo, DNA tratado apenas com o veículo de diluição das 1,4-naftoquinonas substituídas. UV-A= radiação ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm, os compostos e controle foram pré-incubados a esta radiação por 30 minutos. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao composto sem exposição a radiação UV-A.

Tabela 5. Efeito da luz UV-A no potencial indutor de dano direto no DNA plasmidial da 1,4-naftoquinona substituída DPB2 (0,05 μM) sobre o DNA plasmidial.

Compostos	Formas do DNA plasmidial (%)		
	FI	FII	FIII
CN	82,42	17,58	0,00
CN + UV	80,80	19,20	0,00
DPB2	84,15	15,85	0,00
DPB2 + UV	75,69	24,31*	0,00

Nota: Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= controle negativo, DNA tratado apenas com o veículo de diluição das 1,4-naftoquinonas substituídas. UV-A= radiação ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm, os compostos e controle foram pré-incubados a esta radiação por 30 minutos. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao composto sem exposição a radiação UV-A.

Figura 13C. Dano direto ao DNA plasmidial de DPB4 (0,05 μ M) na presença de luz UV-A (pré-incubação de 30 minutos).



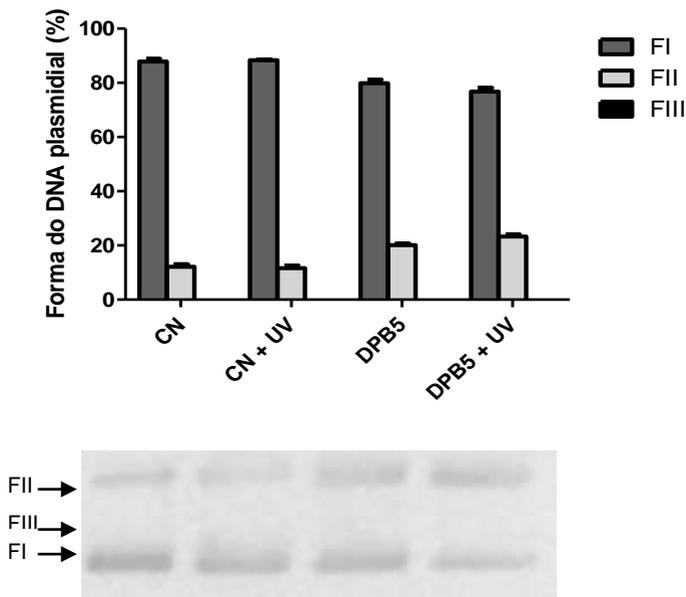
Nota: Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= controle negativo, DNA tratado apenas com o veículo de diluição das 1,4-naftoquinonas substituídas. UV-A= radiação ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm, os compostos e controle foram pré-incubados a esta radiação por 30 minutos. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao composto sem exposição a radiação UV-A.

Tabela 6. Efeito da luz UV-A no potencial indutor de dano direto no DNA plasmidial da 1,4-naftoquinona substituída DPB4 (0,05 μM) sobre o DNA plasmidial.

Compostos	Formas do DNA plasmidial (%)		
	FI	FII	FIII
CN	89,32	10,68	0,00
CN + UV	87,82	12,18	0,00
DPB4	83,83	16,17	0,00
DPB4 + UV	74,16	25,84*	0,00

Nota: Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= controle negativo, DNA tratado apenas com o veículo de diluição das 1,4-naftoquinonas substituídas. UV-A= radiação ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm, os compostos e controle foram pré-incubados a esta radiação por 30 minutos. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao composto sem exposição à radiação UV-A.

Figura 13D. Dano direto ao DNA plasmidial de DPB5 (0,05 μ M) na presença de luz UV-A (pré-incubação de 30 minutos).



Nota: Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= controle negativo, DNA tratado apenas com o veículo de diluição das 1,4-naftoquinonas substituídas. UV-A= radiação ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm, os compostos e controle foram pré-incubados a esta radiação por 30 minutos.

Tabela 7. Efeito da luz UV-A no potencial indutor de dano direto no DNA plasmidial da 1,4-naftoquinona substituída DPB5 (0,05 μM) sobre o DNA plasmidial.

Compostos	Formas do DNA plasmidial (%)		
	FI	FII	FIII
CN	87,91	12,09	0,00
CN + UV	88,34	11,66	0,00
DPB5	79,87	20,13	0,00
DPB5 + UV	76,75	23,25	0,00

Nota: Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= controle negativo, DNA tratado apenas com o veículo de diluição das 1,4-naftoquinonas substituídas. UV-A= radiação ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm, os compostos e controle foram pré-incubados a esta radiação por 30 minutos.

Os resultados obtidos demonstram que os compostos DPB1, DPB2 e DPB4, pré-incubados sob luz UV-A por 30 minutos, promoveram maior dano ao DNA plasmidial. Sendo que os compostos DPB2 e DPB4 demonstraram um potencial indutor de dano direto ao DNA muito mais efetivo, uma vez que a forma superenovelada (FII) aumentou em torno de 9% (Figura 11B e 11C; e Tabelas 5 e 6, respectivamente).

Ademais, a partir dos resultados obtidos podemos observar que a atividade de clivagem das 1,4-naftoquinonas substituídas, promoveu maior quebra da cadeia simples do DNA (forma FII) que quebra em ambas as fitas (forma FIII). Estes resultados corroboram o estudo de Dal Ben e colaboradores (2007), que demonstraram que a indução de quebras da cadeia simples é um típico efeito da antraciclina.

Segundo a literatura, a radiação UV-A (320 – 400 nm) desencadeia a morte celular através da geração de EROs, como oxigênio singlete, radicais superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, que podem reagir com macromoléculas, incluindo os ácidos nucleicos induzindo dano aos nucleotídeos, quebras simples e duplas das cadeias do DNA (SCHARFFETTER-KOCHANNEK et al., 1997; LEE; PARK, 2013). Além

disso, as propriedades espectroscópicas apresentadas por alguns compostos contendo ligantes policíclicos aromáticos tornam estas espécies químicas passíveis de fotoativação com o objetivo de se obter um estado excitado que seja eficiente na clivagem de biomoléculas (proteínas, DNA) para utilização em terapias medicinais (ALI; van LIER, 1999; BONNET, 2000).

Da mesma forma, alguns complexos metálicos como os de metais lantânio (III) e gadolínio (III) com os ligantes phen, dpq e dppz, exibiram atividade de quebra de DNA na faixa de ativação da radiação UV-A, com a geração de oxigênio singlete e radical hidroxila, além de fotocitotoxicidade *in vitro* frente a células cancerosas (HUSSAIN et al, 2010). Também Policarpi (2011), demonstrou que complexos de cobre II com ligante planares aromáticos quando fotoativados sob UV-A possuem características de interação e clivagem de DNA e atividade citotóxica.

Portanto, a partir dos resultados apresentados e dos relatos da literatura, é possível sugerir que a fotoativação via UV-A contribui de forma significativa para elevar a atividade de nuclease química das 1,4-naftoquinonas substituídas frente ao DNA plasmidial.

4.6 INTERAÇÃO DE 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS COM DNA DE TIMO DE VITelo OBSERVADA POR ESPECTROFOTOMETRIA.

Para caracterizar a interação das 1,4-naftoquinonas substituídas com o DNA, foi utilizado a técnica de espectrofotometria, na região espectral do ultravioleta próximo e do visível, que é amplamente empregada para estudar a interação de diferentes moléculas com o DNA (WANG et al., 2009). Salienta-se que quando utilizamos esta metodologia qualquer variação espectral observada entre os compostos e o DNA deverá provir da interação dos mesmos com o DNA. Portanto, após a adição de DNA a uma solução de determinado composto, a inexistência de qualquer variação da absorvância indica que o composto estudado não tem capacidade de interagir com o DNA, na condição estabelecida no estudo (KELLY et al., 1985). A literatura descreve que a doxorubicina, um potente fármaco antitumoral, é um intercalante não específico de DNA, sendo, portanto, considerado um composto de referência na avaliação de agentes intercalantes (NEIDLE, 1979).

Os espectros eletrônicos de varredura UV-Vis dos 1,4-naftoquinonas substituídas (20 μ M) com CT-DNA (20 μ M), representados nas Figuras 14A a 14I, revelaram que os compostos DPB2 (Figura 14B), DPB3 (Figura 14C), DPB6 (Figura 14F) e DPB8 (Figura 14H) apresentaram uma redução na sua absorvância (hipocromismo), à semelhança do agente intercalante

de referência na literatura, a doxorrubicina. Já os 1,4-naftoquinonas substituídas, DPB1 (Figura 14A), DPB4 (Figura 14D) e DPB5 (Figura 14E), apresentaram somente uma pequena redução na sua absorptividade.

Por outro lado, os compostos DPB7 (Figura 14G) e DPB9 (Figura 14I) não apresentaram nenhuma variação espectral, quando estes compostos não foram associados ao CT-DNA, sugerindo-se então que estas moléculas não possuem a capacidade de interagir com o DNA.

Figura 14A. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB1 (20 μ M) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.

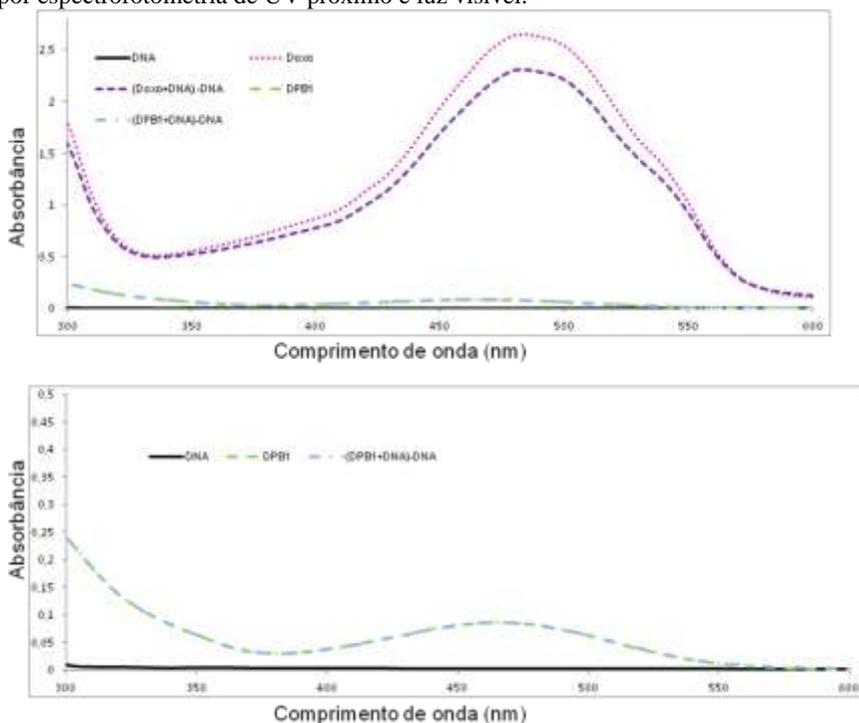


Figura 14B. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB2 (20 μ M) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.

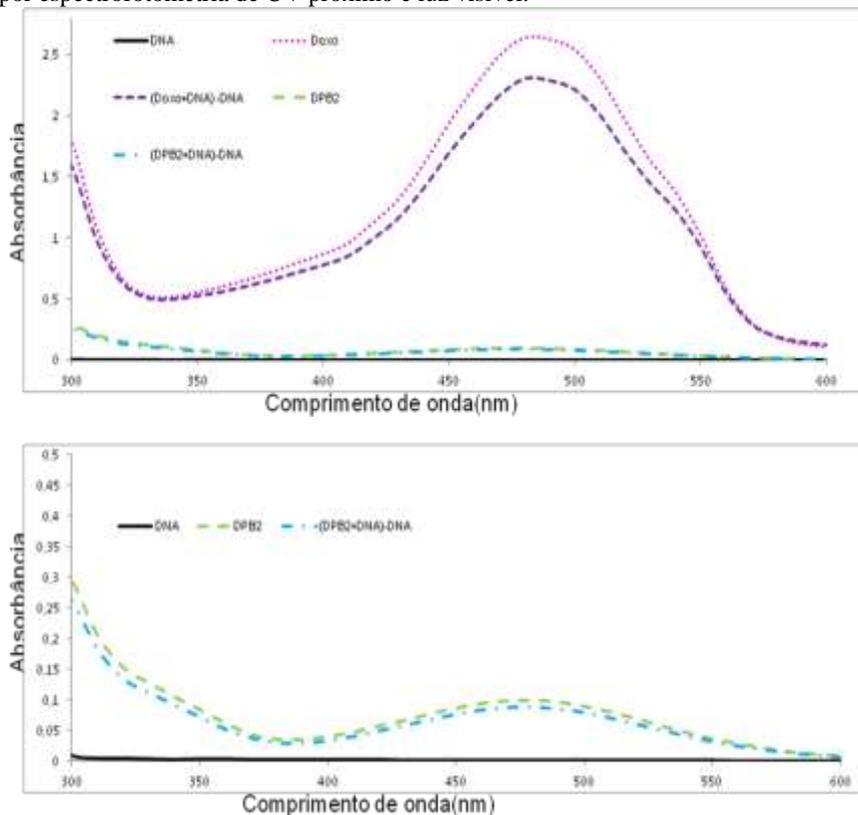


Figura 14C. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB3 (20 μM) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.

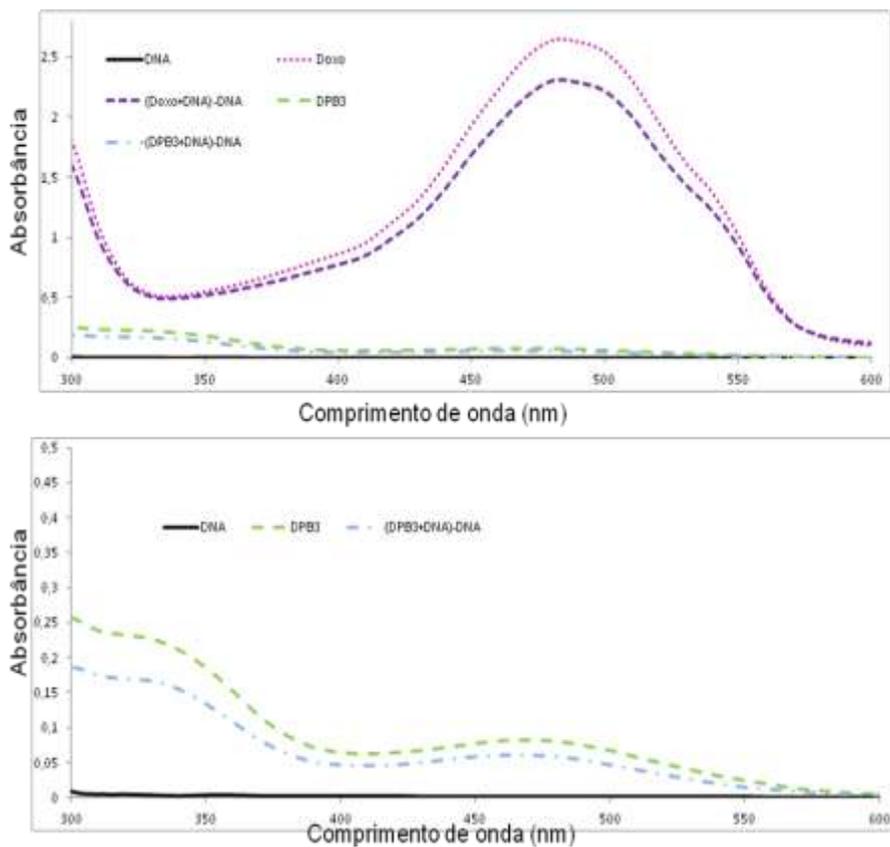


Figura 14D. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB4 (20 μ M) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.

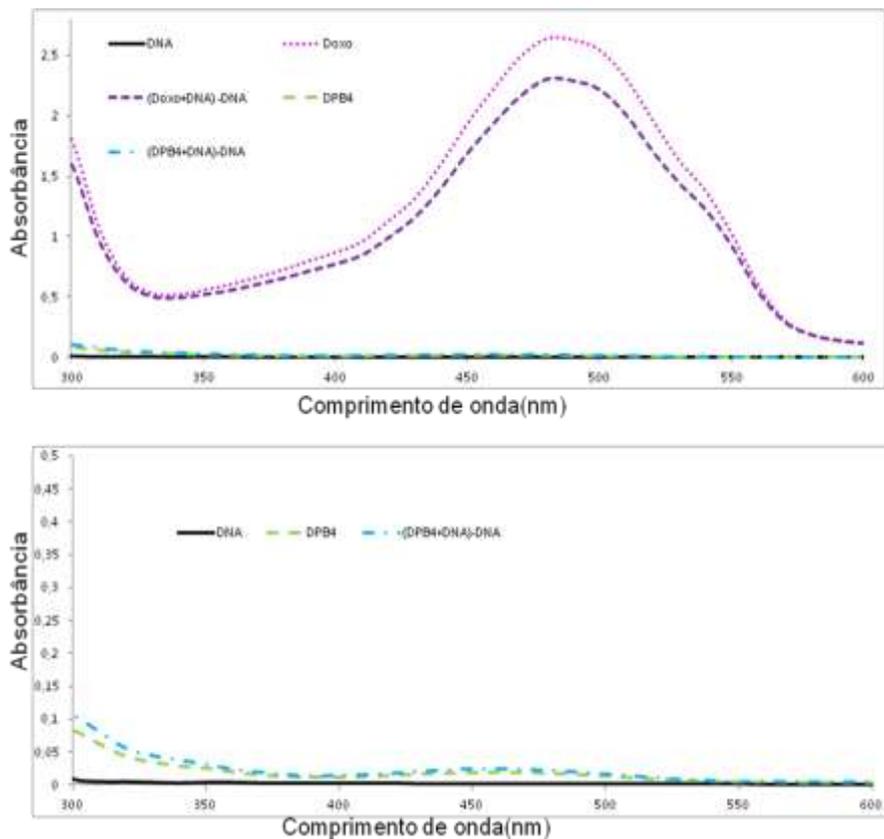


Figura 14E. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB5 (20 μM) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.

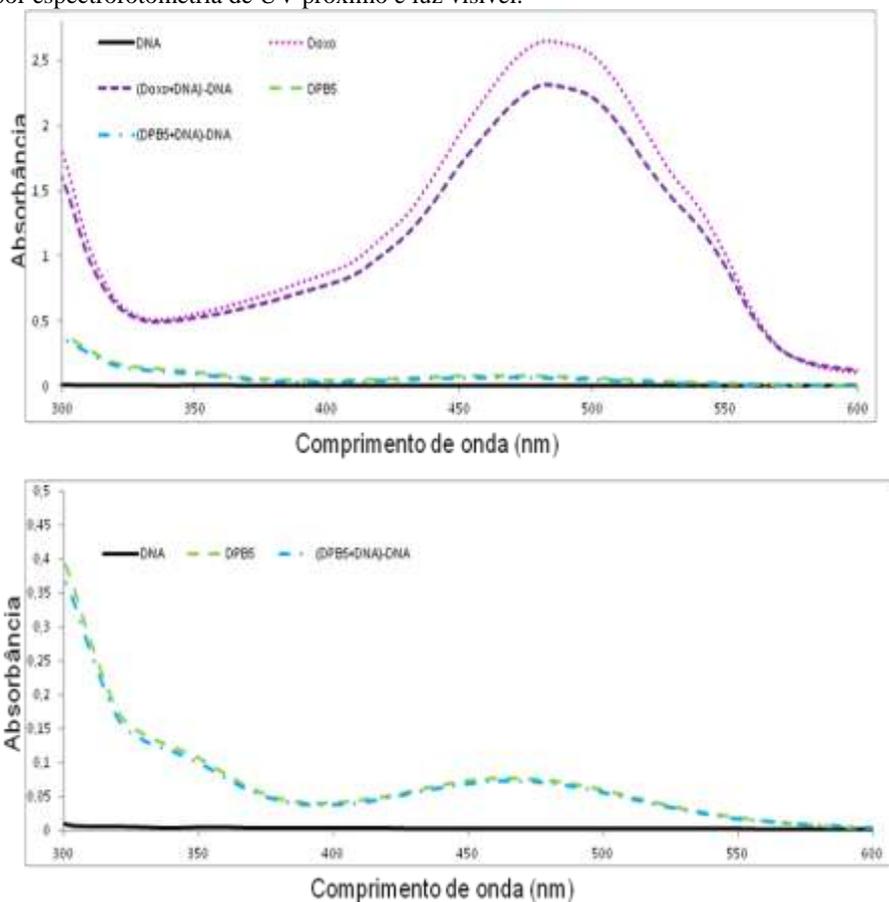


Figura 14F. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB6 (20 μ M) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.

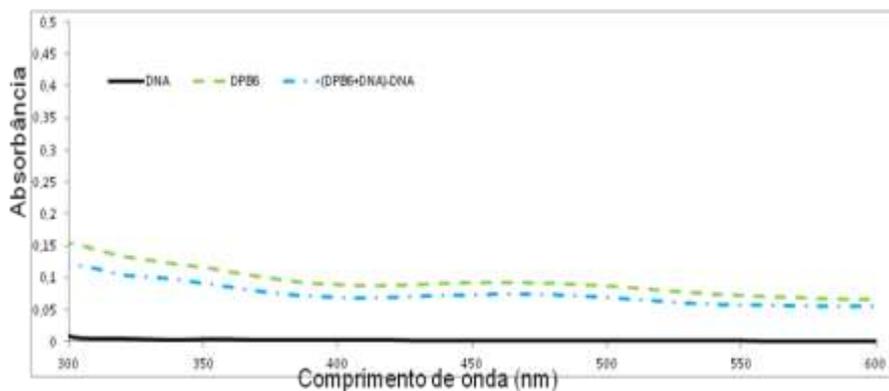
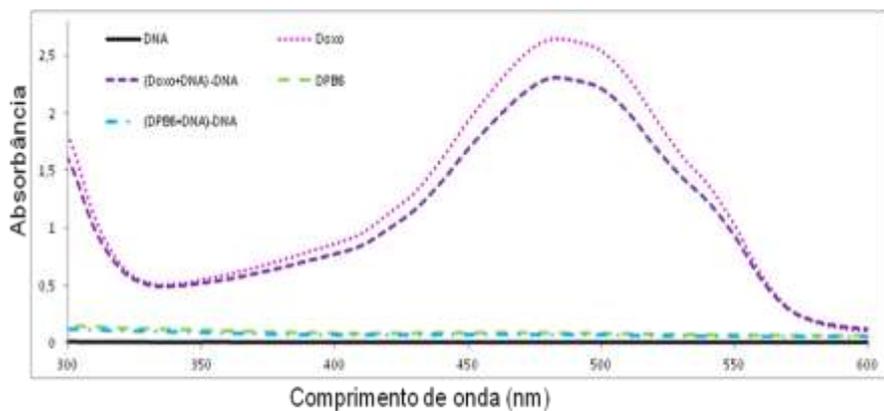


Figura 14G. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB7 (20 μM) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.

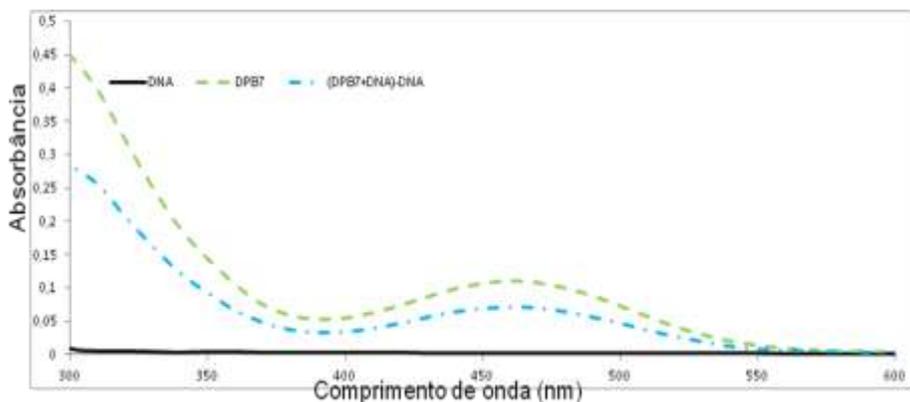
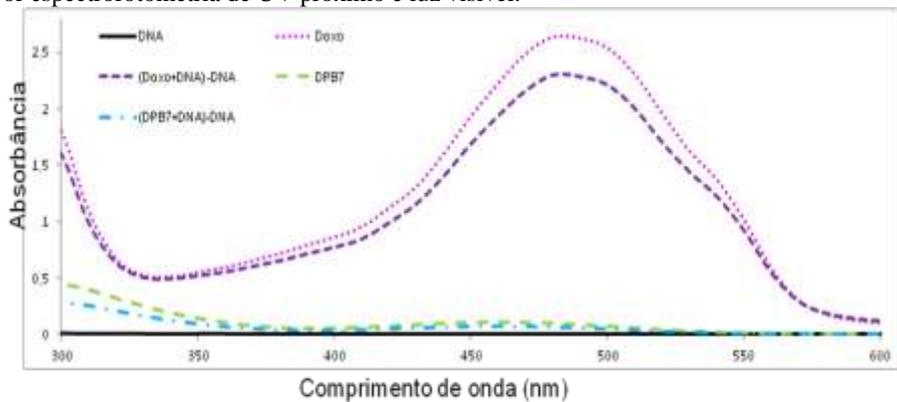


Figura 14H. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB8 (20 μ M) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.

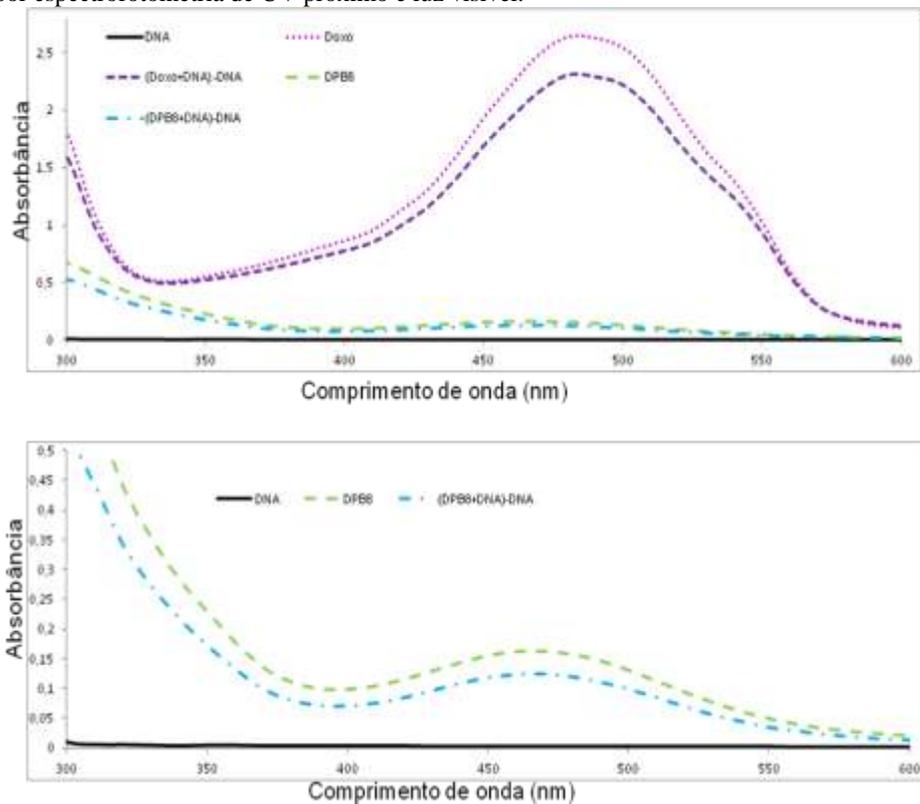
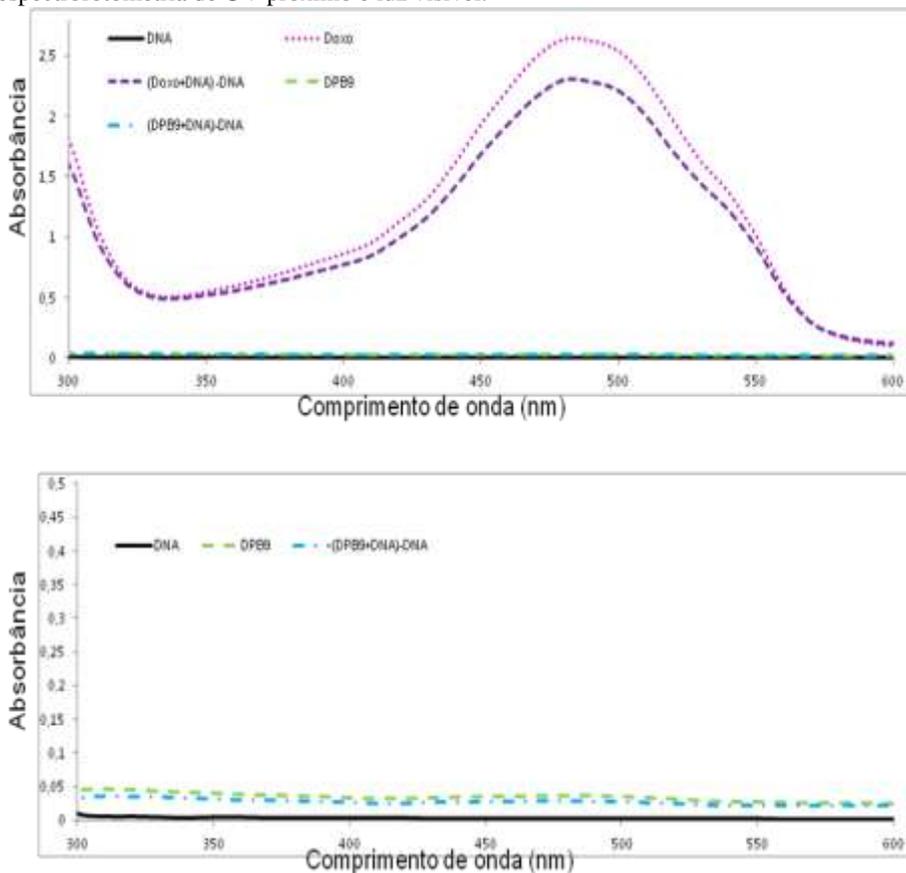


Figura 14I. Interação do DNA de timo de vitelo com DPB9 (20 μ M) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.



A intercalação traduz-se espectroscopicamente em uma diminuição da intensidade de uma banda espectral (efeito hipocrômico) (PLUMBRIDGE; BROWN, 1977; CHEN et al., 2011), o que pode ser observado neste trabalho para os compostos DPB1, DPB2, DPB3, DPB4, DPB5, DPB6 e DPB8. Corroborando nossos resultados Chen e colaboradores (2011) a fim de determinar a constante de ligação de DNA e plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona) observaram mudanças espectrais através de titulação com CT-DNA, onde demonstraram que

houve uma redução de absorção do composto na região UV, sugerindo que o principal modo de ligação do composto ao DNA é por intercalação. Também esta bem documentado na literatura que a intercalação de empilhamento $\pi - \pi$ dos anéis aromáticos dos complexos com as bases de DNA afeta os dipolos de transição das moléculas e, geralmente, conduz a uma diminuição sua absorbância (CHEN et al., 2011).

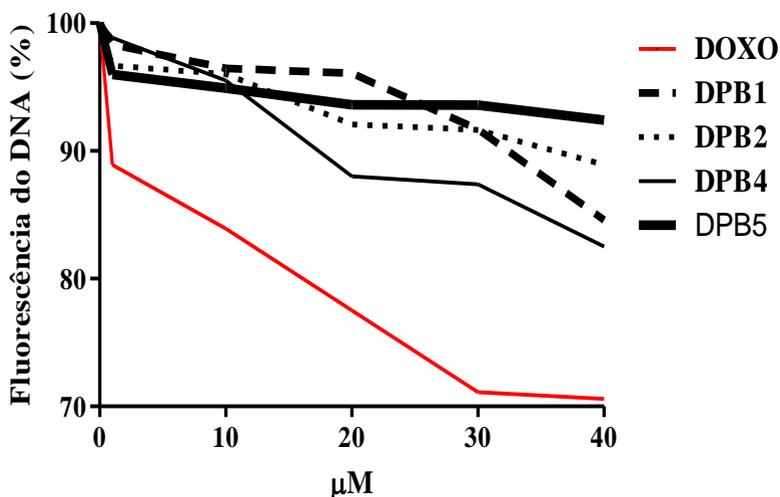
Diante dos resultados obtidos, bem como o ensaio de atividade nucleásica e considerando ainda a literatura, podemos sugerir que os compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5, que apresentaram um efeito hipocrômico quando ligado ao CT-DNA possui uma interação direta com o DNA, podendo promover ações sinérgicas de dano direto e/ou intercalação com o DNA.

4.7 INTERAÇÃO DE 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS/CT-DNA, POR FLUORESCÊNCIA

Brometo de etídeo é um intercalador de DNA bem conhecido, que é fracamente fluorescente, mas cuja fluorescência aumenta quando intercalado entre os pares de bases do DNA (SILVA et al., 2010). Neste sentido, ele pode ser usado para avaliar moléculas intercalantes, porque estas podem deslocá-lo a partir de sítios do DNA que conduzem a diminuição ou mesmo a extinção de fluorescência. Dessa forma, foi avaliado se a interação das 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1, DPB2, DPB3, DPB4 e DPB5) com CT-DNA poderia ser por intercalação, através da intensidade de fluorescência da associação dos compostos ao CT-DNA/Brometo de Etídeo.

Primeiramente, foi realizada a curva de saturação da intensidade de fluorescência obtida da adição de brometo de etídeo ao CT-DNA (20 μM), utilizando a faixa de concentração de 10 a 110 μM . Esta faixa de concentração de brometo de etídeo foi utilizada para determinar o ponto de saturação de moléculas do brometo nos sítios do DNA (30 μM). Após a determinação do ponto de saturação do brometo de etídeo, foi verificado a intensidade de fluorescência com o aumento das concentrações dos derivados de 1,4 naftoquinonas (DPB1, DPB2, DPB3, DPB4, DPB5 - 1, 10, 20, 30 e 40 μM) e da doxorubicina (1, 10, 20, 30 e 40 μM) ao interagir com CT-DNA (20 μM) e brometo de etídeo (30 μM), representado pela Figura 15 e apresentado no artigo aceito de Farias e colaboradores (2013) (ANEXO B).

Figura 15. Efeito da adição das 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1, DPB2, DPB3, DPB4 e DPB5 - 1, 10, 20, 30 e 40 μM) e doxorubicina (1, 10, 20, 30 e 40 μM) na intensidade de fluorescência do Brometo de Etídeo (30 μM) ligado ao DNA (20 μM).



A adição das 1,4-naftoquinonas substituídas selecionados ao CT-DNA e brometo de etídeo promoveu um decaimento significativo na intensidade de fluorescência conforme o aumento da concentração dos compostos, demonstrando que os compostos competem com os sítios de ligação do brometo de etídeo ao DNA, diminuindo a intensidade de fluorescência.

Cabe ressaltar que os compostos DPB4 e DPB1 foram capazes de promover uma maior redução da intensidade fluorescência do brometo de etídeo ligado ao DNA que os outros compostos e este efeito foi dose-dependente. Além disso, sugere-se que o composto DPB4 é mais seletivo que a própria doxorubicina, controle positivo, considerando que um fármaco tão intercalante pode intercalar não só com células tumorais mas também com células saudáveis, perdendo sua seletividade. Assim como demonstrado neste trabalho, alguns estudos (SILVEIRA, 2008; SILVA et al., 2010; CHEN et al., 2011) indicam que os complexos derivados de

quinonas ou metálicos competem com os sítios de ligação do brometo de etídeo pelo DNA, sugerindo que estes compostos interagem com o DNA por intercalação.

Relacionando os resultados deste ensaio com os anteriores de avaliação das 1,4-naftoquinonas substituídas de interação com DNA, observamos uma correlação positiva com os compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5. Os mesmos demonstraram na espectrofotometria UV-Vis um efeito hipocrômico, que demonstra que há um tipo de interação, sendo sugerido que esta interação seja por intercalação, visto que os compostos foram capazes de diminuir significativamente a intensidade de fluorescência, emitida pelo brometo de etídeo ligado ao CT-DNA, ou seja, os compostos competiram pelos sítios do DNA ligado ao brometo, semelhante à doxorubicina, utilizada como controle positivo. Porém não se descarta a hipótese que os compostos possam interagir com o DNA de diferentes formas, assim como a doxorubicina, um agente antitumoral bem descrito na literatura, que além de possuir atividade nucleásica por via oxidativa, também é um agente intercalante não específico de DNA (NEIDLE, 1979; KENNEDY et al., 2011a).

4.8 AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA *IN VITRO* – ENSAIO COMETA

Em incubações com células MCF7 os resultados de índice de dano ao DNA promovido pelas 1,4-naftoquinonas substituídas (Figuras 16 e 17) demonstram que o composto DPB4 apresentou uma maior atividade genotóxica em relação aos demais compostos e de forma dose dependentes. A figura 15 representa as classes de dano ao DNA apresentadas pelos compostos.

Figura 16. Atividade genotóxica das 1,4-naftoquinonas substituídas: DPB1 (CI_{100} - 80 μ M, CI_{75} - 40 μ M e CI_{50} - 20 μ M), DPB2 (CI_{100} - 88 μ M, CI_{75} - 44 μ M e CI_{50} - 22 μ M), DPB4 (CI_{100} - 60 μ M, CI_{75} - 30 μ M e CI_{50} - 15 μ M) e DPB5 (CI_{100} - 96 μ M, CI_{75} - 48 μ M e CI_{50} - 24 μ M) e da doxorubicina 20 μ M como controle positivo em células de câncer de mama humano (células MCF7).

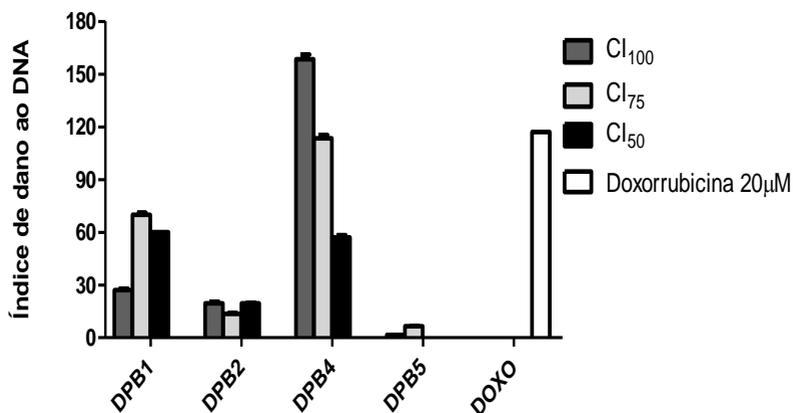
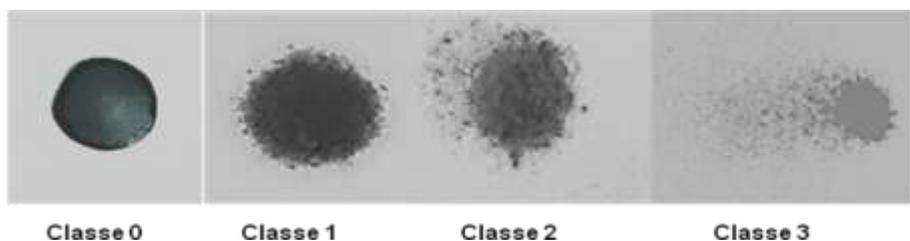


Figura 17. Classes de danos ao DNA apresentadas pelas 1,4-naftoquinonas substituídas em células de câncer de mama humano (células MCF7).



Considerando os ensaios anteriores de dano ao DNA, foi demonstrado mais uma vez que as 1,4-naftoquinonas substituídas possuem uma atividade genotóxica, promovendo dano ao DNA provavelmente através da geração de EROs, culminando com a morte das células tumorais. Portanto sugere-se que os compostos em estudo possuem uma atividade antitumoral importante, visto que um composto que tem a capacidade de

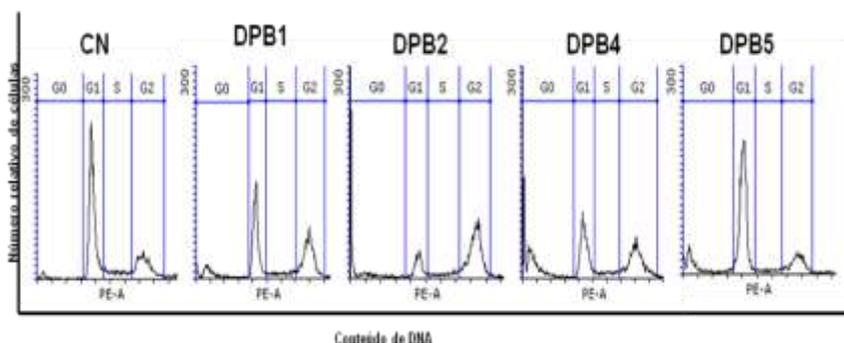
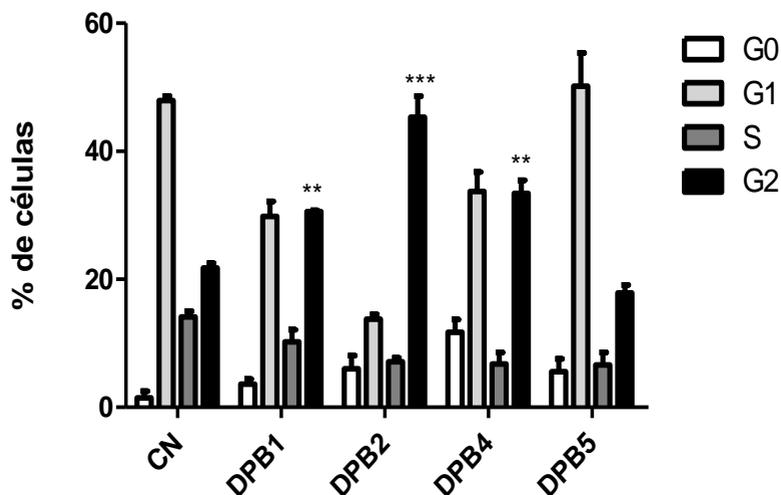
causar dano ao DNA e, assim, dano a integridade reprodutora de células em divisão, pode servir como um bom agente anticancerígeno.

Recentes trabalhos (ANTONY et al., 2007; ZHOU et al., 2007; SMART et al., 2008; ZOU et al., 2009) têm indicado que vários mecanismos são responsáveis pela genotoxicidade, provavelmente por causa de danos no DNA induzida produtos químicos e estes incluem a indução de espécies reativas de oxigênio, inibição da DNA polimerase e inibição da topoisomerase. E corroborando nossos resultados, Kawiak e colaboradores (2007) demonstram que plumbagina, uma 5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona, promoveu dano ao DNA de células HL60 intactas (linhagem de leucemia promielocítica), avaliado através do ensaio Cometa. Além disso, o ensaio Cometa, previamente demonstrado por Salti e colaboradores (2000) e Lothstein e colaboradores (2000), parece ser útil na determinação de danos ao DNA mediada pela inibição da Topoisomerase II. Sugerindo-se dessa forma, que os compostos em estudo interagem com o DNA por intercalação, demonstrado no ensaio de fluorescência, e promovem a quebra das cadeias de DNA, demonstrado pelo ensaio de dano direto ao DNA e pelo ensaio cometa, um efeito típico de inibidores de topoisomerase II. Ressaltamos o composto DPB4, que apresentou maior dano direto ao DNA, bem como uma intercalação com o DNA de forma dose-dependente e promoveu maior dano ao DNA das células MCF7, verificado pelo ensaio cometa.

4.9 EFEITOS DAS 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS SOBRE O CICLO CELULAR

A análise da progressão do ciclo celular foi investigada nas células MCF7 após 24h de incubação com as 1,4-naftoquinonas substituídas (na concentração do CI_{30}) e comparadas ao grupo controle (sem tratamento). Como se pode observar na Figura 18, o tratamento das células MCF7 com os compostos, de maneira geral, causou um bloqueio na fase G2 em comparação ao controle negativo, com exceção do composto DPB5, que não alterou a progressão do ciclo celular.

Figura 18. Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5) sobre as fases do ciclo celular em células de linhagem de câncer de mama humano (MCF7). (**) representa diferença estatística significativa ($p < 0,01$); (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle negativo (CN).



Alterações no ciclo celular e nas proteínas regulatórias são frequentemente associadas à indução de apoptose. Avaliando os resultados apresentados na Figura 18, observamos o percentual de células na fase G2/M apresentados pelos compostos DPB1 (30,6%), DPB2 (45,3%) e

DPB4 (33,4%) bloquearam significativamente o ciclo celular na fase G2/M, destacando-se o composto DPB2, quando comparados ao controle (21,8%). Corroborando nossos resultados Lin e colaboradores (2009) demonstraram que a quinona emodina também induziu a parada na fase G2/M do ciclo celular em células SCC-4 (carcinoma de língua). Matzno e colaboradores (2008) também demonstraram que a vitamina K3 promoveu a parada do ciclo celular na fase G2, e que este bloqueio da fase G2 está relacionada com a inibição da topoisomerase. Este estudo revelou ainda, que vitamina K3 acelerou o turnover da fase S por meio da ativação da ciclina A/cdk2 e induziu a parada na fase G2/M por meio da inibição da formação do complexo ciclina B/cdk1 e como resultado, as células sincronizadas foram acumuladas na fase G2/M e as células foram mais sensíveis à inibição da topoisomerase II (MATZNO et al., 2008)

Além disso, alguns estudos demonstraram que a inibição da proteína chaperona Hsp90 promove perturbações no ciclo celular (acúmulo de células na fase G1, G2, S e/ou G0), dependendo da linhagem celular, da concentração do composto avaliado e do tempo de tratamento (SENJU et al., 2006; LYMAN et al., 2011). Assim podemos sugerir que o bloqueio na fase G2 induzida pelos compostos DPB1, DPB2 e DPB4 em células MCF7 pode envolver o mecanismo de inibição da topoisomerase, mas não através da inibição da proteína Hsp90, considerando que os compostos em estudo não foram capazes de promover a inibição desta proteína chaperona, como demonstrado pelo trabalho de Rios e colaboradores (2012).

4.10 TIPO DE MORTE CELULAR INDUZIDO PELAS 1,4-NAFTOQUINONAS SUBSTITUÍDAS *IN VITRO*

De maneira geral, o tratamento das células MCF-7 com as 1,4-naftoquinonas substituídas, elevaram o percentual de células necróticas e apoptóticas em relação ao grupo controle negativo (Tabela 8 e Figura 19).

Alguns autores (BOUJRAD et al., 2007; ARTUS et al., 2010; BARITAUD et al., 2010) indicam que do ponto de vista bioquímico, o resultado duplo positivo para anexina V/PI é característico de morte celular por necrose programada, pois as proteínas implicadas na necrose programada também estão envolvidas em outra morte celulares programadas caspases dependentes ou independentes. O método mais utilizado para reconhecer a necrose programada é a análise por citometria de fluxo da permeabilidade celular e da exposição exterior da fosfatidilserina (PS) na membrana plasmática através da dupla marcação anexina V / PI. Na apoptose clássica dependente de caspase há um atraso entre a exposição da anexina V e a marcação com PI, permitindo uma

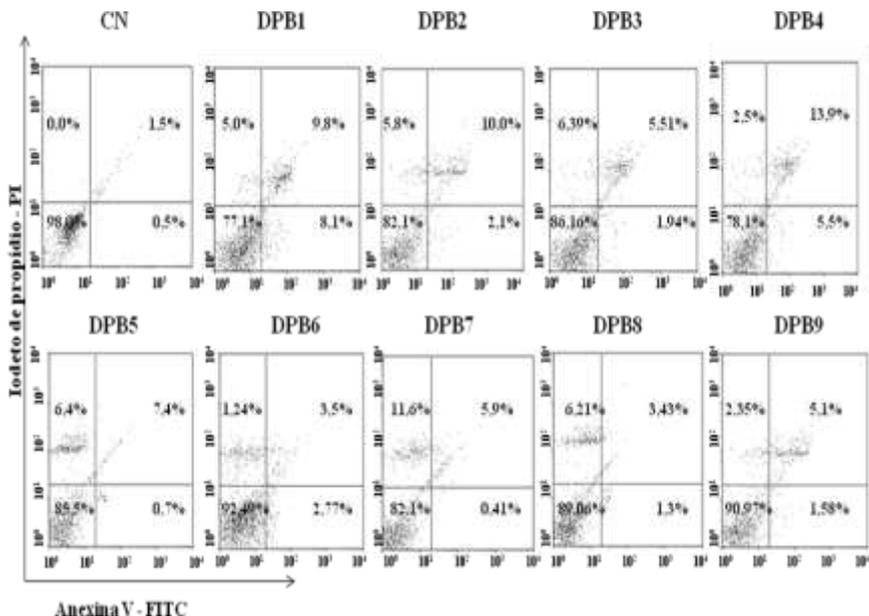
detecção inicial de células anexina V-positiva / PI-negativa (apoptose inicial) antes da detecção de dupla positivo (BOUJRAD et al., 2007; ARTUS et al., 2010; BARITAUD et al., 2010).

Considerando então nossos resultados, observamos que de maneira geral a maioria dos compostos testados elevaram o percentual de células apoptóticas iniciais, com exceção dos compostos DPB5, DPB7, DPB8 e DPB9. Entretanto, pode-se observar claramente que todos os compostos aumentaram o percentual de células em apoptose tardia, principalmente.

Tabela 8. Percentual de células apoptóticas e necróticas obtidas após o tratamento com 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1 a DPB9 – 15 µM) em células de câncer de mama humano (MCF7) sob incubação de 24h.

Tratamentos	% de células viáveis	% de células necróticas	% de células apoptóticas		
			Apoptose inicial	Apoptose tardia	Total de células apoptóticas
CN	98,00	0,00	1,50	0,05	2,00
DPB1	77,10	5,00	8,10	9,80	18,00
DPB2	82,10	5,80	2,10	10,00	12,10
DPB3	86,16	6,39	1,94	5,51	7,45
DPB4	78,10	2,50	5,50	13,90	19,40
DPB5	85,50	6,40	0,70	7,40	8,10
DPB6	92,49	1,24	2,77	3,50	6,27
DPB7	82,10	11,60	0,41	5,90	6,31
DPB8	89,06	6,21	1,30	3,43	4,73
DPB9	90,97	2,35	1,58	5,10	6,68

Figura 19. Tipo de morte celular induzida pelo tratamento de 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1 a DPB9 - 15 μ M) sobre células MCF7. CN – controle negativo tratado com meio + DMSO (0,25%).



Dentre os tratamentos mais efetivos, destacam-se aqueles dos compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5, onde se detectou um percentual de células apoptóticas totais (apoptose inicial + tardia) de 18%, 12,1%, 19,4% e 8,1%, respectivamente. Entretanto, os compostos DPB3, DPB6, DPB7, DPB8 e DPB9 também elevaram o percentual de células apoptóticas em relação ao controle negativo, porém, também promoveram aumento importante do percentual de células necróticas (6,39%, 1,24%, 11,60%, 6,21% e 2,35% respectivamente), quando comparadas ao grupo controle negativo. No entanto, as células necróticas observadas podem corresponder a uma necrose secundária que ocorre posteriormente no processo apoptótico (ARAÚJO et al., 2012) uma vez que as células foram tratadas com estes compostos por 24 hs ou ainda as células marcadas duplamente com anexina V/PI podem ser células que morreram por necrose programada e/ou *necrosis like*.

Sugere-se que a indução do processo apoptótico/necrose programada associados a esses tratamentos pode estar relacionada ao potencial redox

dos compostos, promovido pelos substituintes no núcleo quinóide, levando a uma maior geração de EROs e consequentemente a morte celular. Alguns estudos têm demonstrado que as EROs podem desempenhar um papel crítico durante a indução da apoptose (DEEB et al., 2010; HYUN et al., 2010). Xu e colaboradores (2012) demonstraram que a juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) induziu a morte celular por apoptose em células leucêmicas (HL60) e que este efeito pró-apoptótico foi revertido na presença de N-acetilcisteína e catalase, antioxidantes, indicando o envolvimento de EROs na indução da apoptose pela juglona.

Por outro lado, a literatura também têm descrito que plumbagina e juglona, duas naftoquinonas, induzem a apoptose em células tumorais através da redução da permeabilidade da membrana mitocondrial, que induz alterações nos níveis de Bcl-2, Bax, e citocromo c citossólico, clivagem da PARP-1 e subsequente ativação da caspase 3 (SESHADRI et al., 2011).

Entretanto, evidências também apontam que o estresse oxidativo induzido por quinonas podem levar a morte de células por necrose ou apoptose, dependendo da concentração e do tempo de exposição do agente oxidante, bem como do tipo de célula (VERRAX et al., 2004). Neste contexto, têm sido relatados que o estresse oxidativo induzido por menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) leva à morte celular por necrose ou apoptose, e que 2-aurifuril-3-nitro-1,4-benzoquinona induz a morte de células de hepatoma de murino por necrose, através de um mecanismo redox (HOLLENSWORTH et al., 2000; WARREN et al., 2010).

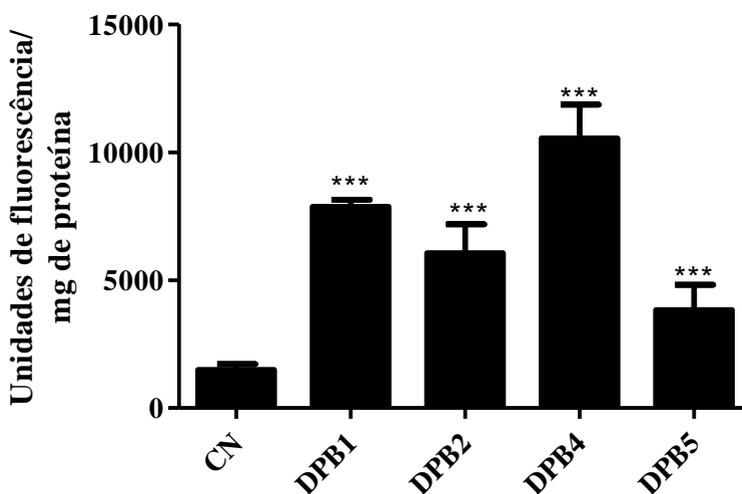
Além disso, o tipo de morte celular induzida pelas quinonas pode ser justificada baseado nos valores dos potenciais de óxido-redução apresentados por estes compostos (RIOS et al., 2012), os quais são considerados relativamente baixos quando comparados ao potencial de outras quinonas, indicando a menor capacidade dos mesmos em serem reduzidos por flavoenzimas levando a uma produção insuficiente de EROs para promoção de necrose, entretanto, compatível para a ativação do processo apoptótico.

Neste sentido, corroborando os resultados apresentados pelos compostos em estudados, Benites e colaboradores (2008a e 2008b) demonstraram que 2-aurifuril-3-nitro-1,4-benzoquinona, por possuir um alto potencial redox, seria mais susceptível ao processo de biorredução, mediando dessa forma, uma alta geração de EROs e levando consequentemente, ao desencadeamento da necrose. Enquanto que 2-aurifurilbenzoquinona, que possui um potencial redox relativamente baixo, induziu o processo apoptótico.

4.11 CONTEÚDO INTRACELULAR DE EROS

Considerando que a literatura tem sugerido que o efeito citotóxico e citostático, bem como a indução de morte celular por apoptose/necrose pode estar relacionada a uma maior geração de EROs por compostos com núcleo quinóide, foi determinado o conteúdo intracelular de EROs das 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 - 15 μ M). Os resultados (Figura 20) demonstraram de maneira geral um aumento significativo no conteúdo de EROs em relação ao controle negativo. Destacando-se os compostos DPB4 e DPB1, onde as células expostas a estes compostos apresentaram um conteúdo de EROs 10 e 8 vezes maiores, respectivamente, que o controle negativo, sugerindo um possível envolvimento do ciclo redox na atividade citotóxica, antitumoral e pró-apoptótica exercido pelas 1,4-naftoquinonas substituídas estudadas (FARIAS et al., 2013 – ANEXO B).

Figura 20. Conteúdo intracelular de EROs mensurados após o tratamento de células MCF7 pelo período de 2 horas com as 1,4-naftoquinonas substituídas: DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 - 15 μ M.



Nota: Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

De acordo com os resultados apresentados, os compostos em estudo, principalmente o DPB4, promoveram elevação do conteúdo intracelular de EROs em relação ao controle negativo. Sugere-se, portanto, que o composto DPB4 pode apresentar forte efeito antitumoral, por inibir a proliferação das células tumorais. Além disso, as EROs geradas pelos compostos podem atacar o DNA causando sua clivagem e estes eventos finalmente combinados culminam num aumento dos níveis de apoptose e necrose e estariam envolvidos no mecanismo subjacente a citotoxicidade de toda esta série de 1,4-naftoquinonas substituídas.

Com base nestes resultados, podemos ainda ponderar que os compostos em estudo (DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5) possuem um potencial redox relativamente baixo (-578,6; -596,5; -578,3 e -609,2 mV, respectivamente) quando comparados aos de outras quinonas cujo principal mecanismo de ação antitumoral envolve a biorredução destes compostos (RIOS et al., 2012). Dessa forma, DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 são menos susceptíveis à biorredução catalizada pelas flavoenzimas, levando a uma produção de EROs menor, quando comparadas as outras quinonas, entretanto tal produção de espécies reativas foi suficiente para promover os efeitos citotóxico e antiproliferativo destes compostos, bem como induzir a morte de células tumorais por apoptose. Autores como Verrax et al. (2005), sugerem que o potencial dos derivados de quinona capazes de induzir a geração de ROS celular deve depender do seu potencial redox. Além disso, Vásquez e colaboradores (2011), afirmam que quinonas que apresentam um alto potencial redox são mais susceptíveis à biorredução catalisada por enzimas flavinas (ex. NADPH citocromo P-450 redutase, NADPH citocromo b5 redutase ou NADPH ubiquinona oxidoreductase), do que aquelas que apresentam baixo potencial redox.

Além disso, estudos (SCHRAMEK et al., 2011; RAJ et al., 2012; ARRABAL et al., 2013) têm demonstrado que EROs pode ativar a via de sinalização JNK, uma via que envolve uma resposta antitumoral, mediando a morte celular por apoptose controlada pela proteína p53. Bem como, o aumento da geração de EROs pode favorecer a senescência celular, através da ativação constitutiva das proteínas MAPK. Assim, a produção de H₂O₂ poderia induzir a senescência por bloqueio do ciclo celular na fase G1, que é acompanhada por um aumento na regulação do supressor tumoral p53 e do seu alvo transcricional a p21. Portanto, o aumento dos níveis de EROs podem atuar como mediadores na transformação celular, no bloqueio do ciclo celular, na apoptose, e na senescência celular (ARRABAL et al., 2013).

Corroborando estudos descritos acima, os dados obtidos demonstraram que as 1,4-naftoquinonas substituídas em estudo são capazes de elevar a concentração intracelular de EROs significativamente em relação ao controle negativo, o que indica o envolvimento do estresse oxidativo nas atividades citotóxica, antiproliferativa e pró-apoptótica induzida por estes compostos.

4.12 ENSAIO DE IMUNOELETROFORESE

4.12.1 Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas sobre a expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular

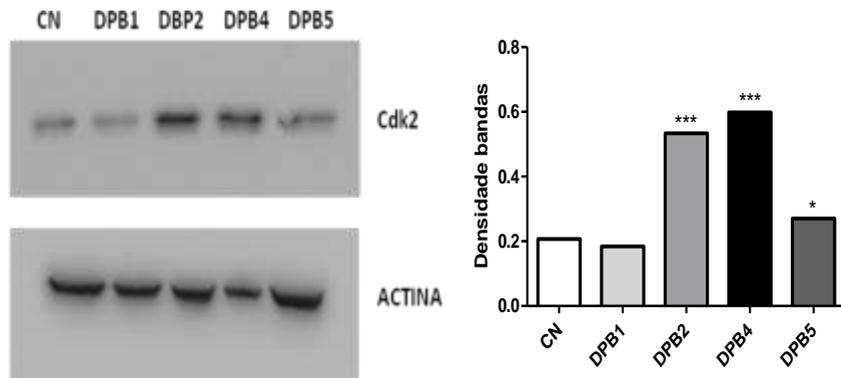
Recentes avanços na compreensão do ciclo celular têm revelado vários pontos de regulação que asseguram a ordem dos eventos, bem como processos integrados de reparo que permitem sua progressão. Etapas de verificação, conhecidas como “pontos de checagem”, asseguram a fidelidade da replicação e separação cromossomal, permitindo a manutenção da estabilidade genética. Portanto, falhas nestes pontos de checagem podem determinar a progressão da célula tumoral.

A progressão no ciclo celular é basicamente regulada por duas classes de proteínas: as ciclinas e as cinases dependentes de ciclinas (cdks). Em G1, o ponto de restrição é coordenado por duas famílias de ciclinas, D (D1, D2 e D3) e E (E1 e E2). As ciclinas tipo D interagem com as cdks 4 e 6 e as ciclinas E1 e E2 com a cdk2. A regulação da transição G2/M e entrada em mitose depende da correta ativação do complexo ciclina B/cdk-1 e sua localização subcelular. A ciclina B é citoplasmática até G2, quando inicia o acúmulo no núcleo (MOLINARI, 2000; SMITS; MEDEMA, 2001).

As ciclinas e cinases dependentes de ciclina (CDK) são frequentemente desreguladas no câncer, e a superexpressão de ciclina D1 (CD1) ocorre em aproximadamente 50% dos cânceres da mama (JUNK et al., 2013). Alterações no ciclo celular e nas proteínas regulatórias são frequentemente associadas à indução de apoptose (TANNER et al., 2000).

Diante disso, foi avaliado o efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas sobre a expressão da proteína cdk2 (Figura 21), uma cinase dependente de ciclina, que interage com a ciclina E regulando o ponto de checagem na fase G1.

Figura 21. Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas (CI₃₀ - 12 µM; 13,2 µM; 9 µM e 14,4 µM, respectivamente) sobre a expressão da proteína cdk2 em células MCF7 avaliadas por imunoeletrforese, sob incubação de 24h.



Nota: Os resultados foram representados como bandas, resultantes de três experimentos separados. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=3$. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

Verificou-se que os compostos em estudo não inibiu a expressão da proteína cdk2, o que poderia ser devido ao fato desta cinase dependente de ciclina estar particularmente envolvida na regulação do ciclo celular na fase G1. E como verificado da progressão do ciclo celular por citometria, os compostos em estudo foram capazes de inibir a fase G2, o que corrobora os resultados apresentados pela imunoeletrforese.

Portanto, sugere-se que outras proteínas reguladoras podem estar envolvidas no efeito citotóxico e/ou antiproliferativos das 1,4-naftoquinonas substituídas, como cdk1, ciclina B1, ciclina E ou a proteína supressora de tumor Rb, que no seu estado fosforilado é crucial no controle da sua atividade repressiva. Além disso, a ativação seqüencial das ciclinas D/cdk-4 ou -6 seguidas pela ciclina E/cdk-2, parece ser necessária para a fosforilação do Rb e ativação dos genes dependentes de E2F (JOHNSON; WALKER, 1999; SWANTON, 2004). A família das ciclinas E (E1 e E2) são reguladas pela atividade da ciclina D/cdk de duas maneiras. Primeiro, a inativação parcial do efeito supressor do Rb, permite que o fator de transcrição E2F inicie a transcrição da ciclina E; segundo, como dito anteriormente, complexos ciclina D/cdk seqüestram o inibidor p27Kip1 dos

complexos previamente inativos ciclina E/cdk2/p27 (STROHMAIER et al., 2001).

Na transição G2/M, o complexo ciclina B/cdk-1 é conhecido por ser um mediador chave em todas as células eucarióticas. Esta cinase mitótica (também denominada MPF – mitosis promoting factor) é regulada em vários níveis, dentre eles: 1) a formação do complexo ciclina B/cdk-1 depende da disponibilidade da ciclina B, que inicia sua produção no final da fase S, acumula na mitose e é rapidamente degradada, preparando a célula para entrar na fase G1; 2) a localização subcelular da ciclina B e a regulação do MPF pelo estado fosforilativo. Neste processo, fosfatases como cdc25B e cdc25C são responsáveis pela ativação e as proteínas cinases wee1 e myt-1 são responsáveis por inativar o complexo (MOLINARI, 2000).

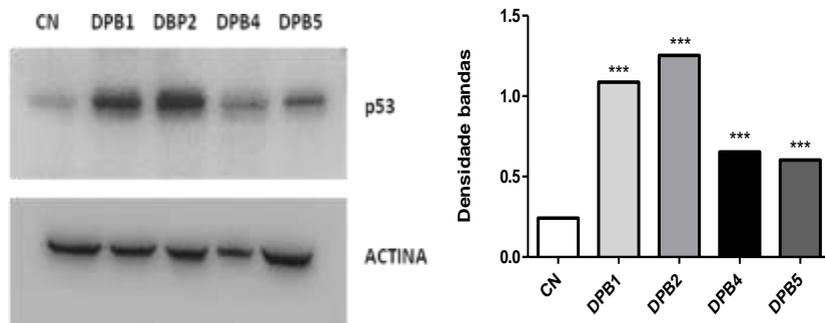
Muitos fármacos antitumorais exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, como os antineoplásicos antimetabólitos (metotrexato, 5-fluorouracil, citarabina) que bloqueiam a fase S do ciclo celular, ou como o etoposide e bleomicina, específicos pelo bloqueio na fase G2, ou mesmo como a vimblastina, vincristina e paclitaxel que bloqueiam na mitose (ALMEIDA et al., 2005). Além disso, alguns fármacos tem a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G0 (ALMEIDA et al., 2005). Neste sentido, nossos resultados demonstraram que os compostos não foram capazes de inibir a cdk2, porém poderia se especular que outras proteínas da fase G2 do ciclo celular possam estar envolvidas, considerando que os 1,4-naftoquinonas substituídas bloquearam a fase G2.

4.12.2 Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas sobre a expressão de proteínas envolvidas na apoptose – PARP e p53

Com intuito de confirmar se o tipo de morte celular induzida pelos 1,4-naftoquinonas substituídas foi por apoptose, foi avaliada a expressão da proteína p53, que atua como um sensor de danos no DNA e auxilia o sistema de reparo, utilizando os pontos de checagem para paralisar o ciclo celular ou induzir a apoptose (ARRUDA et al., 2008).

A figura 22 apresenta o efeito dos compostos sobre a proteína p53, demonstrando que os compostos em estudo foram capazes de aumentar a expressão dessa proteína envolvida na morte celular por apoptose.

Figura 22. Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas (CI₃₀ - 12 μ M; 13,2 μ M; 9 μ M e 14,4 μ M, respectivamente) sobre a expressão da proteína p53 em células MCF7 avaliadas por imunoeletrforese, sob incubação de 24h.



Nota: Os resultados foram representados como bandas, resultantes de três experimentos separados. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=3$. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

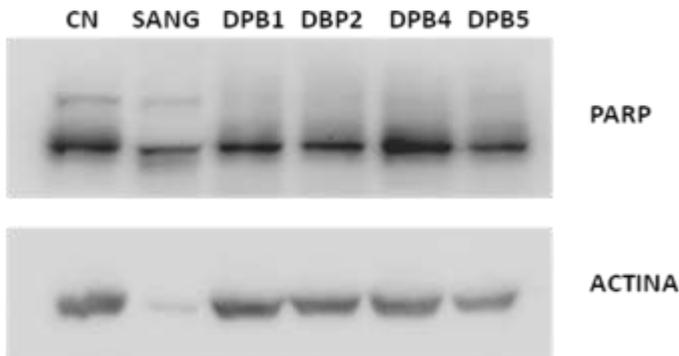
De fato, hoje se sabe que a proteína p53 sinaliza o mecanismo de morte celular por apoptose, induzindo a expressão de diversos genes pró-apoptóticos, que participam não só da via extrínseca e intrínseca da apoptose, mas também da via do retículo endoplasmático (GUPTA, 2006). Diante disso, podemos sugerir que as 1,4-naftoquinonas substituídas em estudo induzem apoptose p53-independente ou promovem a morte celular por necrose programada, pois conforme pode ser visualizado na figura 22, os compostos foram capazes de aumentar a expressão da proteína p53.

Srinivas e colaboradores (2011) demonstraram que a plumbagina (hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona) promoveu a inibição da expressão da p53, porém quando este composto foi modificado quimicamente, esta inibição não foi observada. Os autores sugerem que embora a inibição da proteína p53 não tenha sido observada, fato este que pode ser devido a redução de grupos hidroxilas da plumbagina possa ter prejudicado suas propriedades eletrofílicas e consequentemente sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio, a plumbagina modificada pode ter induzido apoptose independente de p53.

Semelhante aos nossos resultados, Fortini e colaboradores (2012) demonstraram ainda uma relação entre o dano ao DNA e a morte celular independente de caspase. Especificamente, este estudo mostra que quebras simples da cadeia de DNA promovida por indutores de H₂O₂ como metil metanosulfonato (agente alquilante) e camptotecina (inibidor de topoisomerase I) induz um bloqueio da sinalização *downstream* da p53, resultando na morte celular independente de caspase. Pois, conforme demonstrado neste trabalho, os compostos em estudo, induziram dano direto ao DNA, principalmente causando quebra de cadeia simples, resultando na morte celular por apoptose independente de caspase (figura 20).

Para confirmar se a morte celular induzida pelos compostos é independente de caspases, foi avaliada a expressão da proteína PARP, que é um substrato específico de caspase-3, e a sua fragmentação é um marcador conhecido de a morte celular por apoptose (NICHOLSON et al., 1997; VALDERRAMA et al., 2009). Considerando o efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas sobre a expressão da proteína PARP, demonstrado na figura 23, não foi observada a clivagem da PARP, evidenciando mais uma vez, a inatividade das caspases durante o processo de morte induzido por estes tratamentos. Como controle positivo, foi utilizada a sanguinarina, que induz a liberação do citocromo c resultando na ativação de caspase-9 e caspase-3 e na clivagem poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), levando à indução de apoptose dependente de caspase (HUSSAIN et al., 2007).

Figura 23. Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas (CI₃₀ - 12 μ M; 13,2 μ M; 9 μ M e 14,4 μ M, respectivamente) sobre a expressão da proteína p53 em células MCF7 avaliadas por imunoeletroforese, sob incubação de 24h.



Nota: Os resultados foram representados como bandas, resultantes de três experimentos separados. CN – controle negativo.

A PARP é uma enzima nuclear, que em condições fisiológicas, desempenha papel homeostático e em condições patológicas, também está associada a reparação do DNA observada após a geração um dano. Ocorrido uma quebra, a PARP liga-se rapidamente à fita acometida do DNA pelo seu domínio ligante N-terminal e utiliza NAD⁺ para sintetizar poli (ADP-ribose) sobre uma variedade de proteínas nucleares envolvidas no metabolismo e reparo do DNA. Quando o dano ao DNA é limitado, o DNA fragmentado é reparado, e as células sobrevivem e os níveis de NAD⁺ celular são restaurados através da reciclagem de nicotinamida por duas moléculas de ATP. Se o reparo do DNA não é completamente alcançado, as células sofrem apoptose através de um mecanismo dependente da caspase. Quando o dano ao DNA é extenso, células não podem reparar a lesão. Neste caso, ativação desproporcional de PARP- 1 esgota as piscinas celulares de NAD⁺ e ATP, levando a célula a um tipo de necrose morte celular programada (BARITAUD et al., 2010).

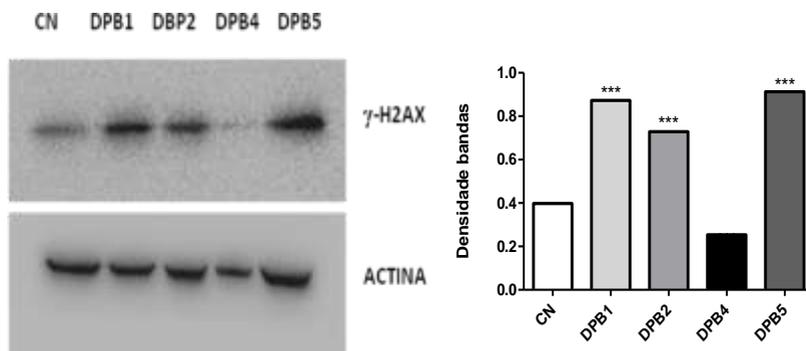
Corroborando nossos resultados, Verrax e colaboradores (2006) demonstraram que a associação ascorbato/menadiona induziu a morte celular independente de caspase, conclusão esta baseada no fato desta associação não ter clivado a proteína PARP e não ter ativado a expressão da pro-caspase 3. Neste estudo, ainda sugerem que a associação ascorbato/menadiona induz a morte celular por necrose programada e/ou *necrosis like*, devido esta associação ter sido marcada duplamente com anexina V/PI, análise por citometria de fluxo, bem como ter provocado dano direto ao DNA, o que se assemelha muito aos nossos dados. Kwiecinski e colaboradores (2012) também demonstraram que a juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) isolada e em associação ao ascorbato não induziu a clivagem da proteína PARP e nem a ativação da caspase 3, sugerindo que esta naftoquinona promove morte celular por *necrosis like*.

4.12.3 Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas sobre a expressão de γ H2Ax- histona

As quebras de cadeia simples e/ou quebras de cadeia dupla são ativadores poderosos da sinalização em cascata conhecida como resposta ao dano do DNA, recrutando e ativando proteínas quinases no local da lesão do DNA, induzindo a fosforilação local da histona γ H2Ax (BONNER et al., 2008; SMITH et al., 2010). Assim, a gama-H2Ax tem sido considerada a

principal proteína sinalizadora envolvida na resposta ao dano sobre o DNA. E considerando que as 1,4-naftoquinonas substituídas demonstraram que promovem dano ao DNA, principalmente quebras simples da cadeia e possuem interação com o DNA, provavelmente por intercalação, nos ensaios anteriores, foi avaliado o efeitos destes compostos sobre a expressão da proteína γ H2Ax – histona, conforme pode ser visualizado na figura 24.

Figura 24. Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas (CI₃₀ - 12 μ M; 13,2 μ M; 9 μ M e 14,4 μ M, respectivamente) sobre a expressão da proteína γ H2Ax em células MCF7 avaliadas por imunoeletróforese, sob incubação de 24h.



Nota: Os resultados foram representados como bandas, resultantes de três experimentos separados. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN).

Como ilustrado na figura 24, os compostos DPB1, DPB2 e DPB5 promoveram a fosforilação da histona γ H2Ax, resultando no dano ao DNA, confirmando os ensaios anteriores. Já o composto DPB4, não promoveu nenhum efeito sobre a histona γ H2Ax, o que contradiz com os ensaios anteriores, sendo que este composto foi o mais efetivo em induzir dano ao DNA de células MCF7, visualizado pelo ensaio cometa, bem como em interagir com o DNA por intercalação.

Li e colaboradores (2010) demonstraram que a emodina, uma antraquinona, promoveu dano ao DNA, visualizado pelo ensaio cometa, e aumentou a fosforilação da histona γ H2Ax, semelhante aos nossos resultados. Corroborando ainda nossos resultados Beck e colaboradores (2009) e Dejeans e colaboradores (2010), demonstraram que a menadiona

isolada ou em associação ao ascorbato induziu à fosforilação de γ H2Ax em células K562 e MCF-7, respectivamente. Recentemente, Kwiecinski e colaboradores (2012) também demonstraram que a juglona isolada e em associação ao ascorbato promoveram a fosforilação da histona γ H2Ax, resultando em dano ao DNA.

Diante destes resultados, pode-se considerar que as 1,4-naftoquinonas substituídas DPB1, DPB2 e DPB5 promovem dano ao DNA, visualizado nos ensaios de eletroforese (dano direto ao DNA), ensaio cometa, ensaio da medida de fluorescência (intercalação) e imunoeletroforese (expressão γ H2Ax), e embora o composto DPB4 não tenha induzido a fosforilação da histona γ H2Ax, o mesmo foi o composto mais efetivo nos outros ensaios de avaliação do dano ao DNA.

4.13 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo*

4.13.1 Avaliações morfológicas (variação do peso e da medida circunferência, inibição crescimento tumoral abdominal) e histocitológicas (volume de células compactadas)

Para validar a atividade antitumoral demonstrada *in vitro* foi realizado o ensaio *in vivo*, utilizando o modelo experimental do TAE. O TAE caracteriza-se por ser um carcinoma de comportamento agressivo, que cresce rapidamente, e que vem sendo utilizado amplamente nas pesquisas científicas para avaliar a atividade antitumoral de candidatos a novos agentes terapêuticos (RAJESHKUMAR et al, 2002; MELO et al, 2004).

Para este ensaio foram escolhidos os compostos que apresentaram os resultados mais promissores a partir dos resultados de citotoxicidade, dano ao DNA plasmidial e de interação das 1,4-naftoquinonas substituídas com CT-DNA: DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5.

Os valores dos parâmetros morfofisiológicos e histocitológicos avaliados até o momento estão apresentados na Tabela 9, após o tratamento dos animais com DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5, doxorubicina e solução salina (veículo de diluição das quinonas – controle negativo).

Diante disto, os resultados (Tabela 9) *in vivo* após o tratamento dos animais com os compostos, demonstraram que os compostos DPB1 e DPB5 não foram capazes de reduzir significativamente a variação do peso corporal, quando comparados aos animais não tratados. Entretanto, os compostos DPB2 e DPB4, foram capazes de reduzir significativamente a variação de peso corporal (32,33% e 84%, respectivamente).

Quando à redução do volume das células compactadas apenas o composto DPB4 promoveu a redução do volume de células compactadas significativamente, em torno de 62%. E uma vez que a mensuração do volume de células compactadas pode servir no sentido de indicar o tamanho real do tumor (KVIECISNKI, 2011), sugere-se que a 1,4-naftoquinona substituída, DPB4, reduziu significativamente o tamanho do tumor. Já em relação a proporção de células inviáveis/células viáveis, foi observado que os compostos DPB1, DPB2 e DPB5, aumentaram significativamente esta proporção (100%, 150% e 162,5%, respectivamente) em relação ao controle negativo.

Tabela 9. Efeito das 1,4-naftoquinonas substituídas DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 (0,5Mm/kg/dia) em camundongos inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich sobre os parâmetros morfológicos dos animais.

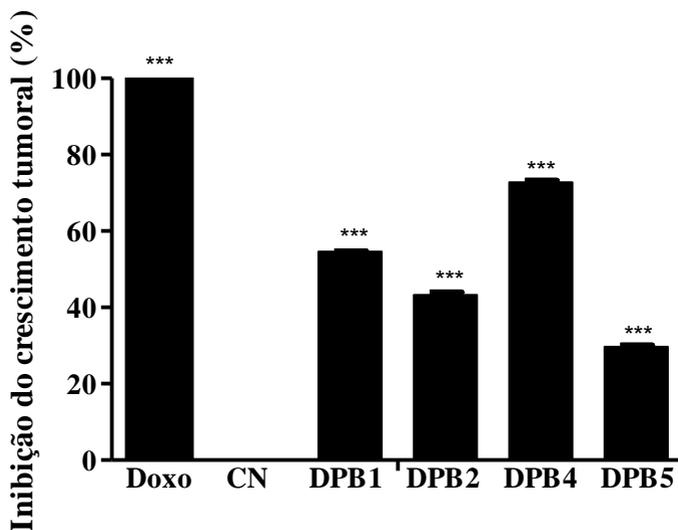
Parâmetro	CN	CP	Derivados 1,4 naftoquinonas			
			DPB1	DPB2	DPB4	DPB5
Variação do peso corporal (g)	10,03±	-0,12±	8,20 ±	6,97±	1,60±	10,32±
	0,29	0,35***	1,65	0,70**	1,36***	1,59
Vol. de células compactadas (MI)	4,40±	-	4,30 ±	4,33±	1,66±	5,60 ±
	1,14	-	0,67	0,76	0,76***	0,55
Células inviáveis / células viáveis	0,008	-	0,016*	0,020*	0,012	0,021**
			**	**		*

Nota: Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n = 6. (***, ** e *) representam diferença estatística ($p < 0,001$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$; respectivamente) nos grupos tratados com 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 na concentração de 0,5 mM/kg/dia) em relação ao controle negativo tratado somente com solução salina. CP: grupo controle positivo tratado com doxorrubicina (1,2 mg/kg).

O principal parâmetro capaz de indicar quão eficaz foi o tratamento com os compostos em estudo com respeito ao efeito antitumoral, é a inibição do crescimento do tumor demonstrada na Figura 25. O crescimento tumoral foi avaliado através da redução da circunferência abdominal, uma vez que este parametro está diretamente relacionada ao tamanho de tumor existente (KVIECISNKI, 2011). Os resultados evidenciam que os

compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 induziram a inibição do crescimento tumoral significativamente (55%, 43%, 73% e 30%, respectivamente).

Figura 25. Inibição do crescimento tumoral induzido pelos tratamentos com 1,4-naftoquinonas substituídas (DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 na concentração de 0,5 mM/kg/dia) administrados em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich, com base na variação da circunferência abdominal.



Nota: (***) representam diferença estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN). Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=6$.

Salienta-se que a atividade antitumoral *in vivo* observada neste estudo e apresentadas no artigo aceito para publicação de Farias et al. (2013) (ANEXO B), corrobora dados da literatura, onde tem sido evidenciado que quinonas de origem natural e sintética são capazes de mediar o efeito antitumoral nos mais diferentes tipos de tumores.

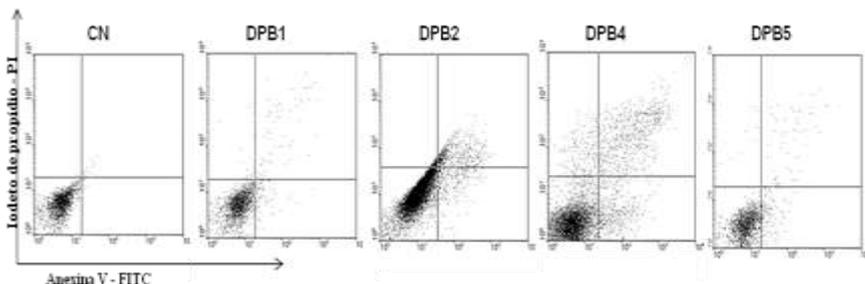
Choudhury e colaboradores (2011) demonstraram que MT81, um derivado de antraquinona, diminuiu o volume tumoral dos camundongos inoculados com TAE, o número de células viáveis bem como o volume de células compactadas, apresentando desta forma, importante atividade

antitumoral. Em um trabalho realizado por Brondani e colaboradores (2007) com primina, um derivado de benzoquinona, obtido a partir de *Primula obconica* (Primulaceae), também demonstraram uma importante redução do crescimento tumoral no carcinoma de Ehrlich.

4.13.2 Tipo de morte celular induzida pelas 1,4-naftoquinonas substituídas *in vivo*

Considerando que os tratamentos foram capazes de promover a inibição do crescimento tumoral, foi avaliado o tipo de morte celular *in vivo* induzido pelo tratamento dos animais com os compostos, conforme pode ser visualizado na Figura 26 e Tabela 10. Os dados revelaram que os tratamentos com os compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 elevaram o percentual de células apoptóticas (iniciais + tardias) quando comparados ao grupo controle negativo, em torno de 6,5; 8,0; 15,0 e 8,0 vezes, respectivamente. Estes resultados sugerem o envolvimento da apoptose no efeito citotóxico e antitumoral no TAE induzidos por essas 1,4-naftoquinonas substituídas.

Figura 26. Tipo de morte celular induzida pelo tratamento de DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 (0,05mM/kg/dia) em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich.



Nota: CN – controle negativo tratado somente com solução salina, n=6.

Tabela 10. Percentual de células apoptóticas e necróticas obtidas após o tratamento com 1,4-naftoquinonas substituídas DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 administrados em camundongos isogênicos Balb-C inoculados com TAE.

Tratamentos	% de células viáveis	% de células necróticas	% de células apoptóticas		
			Apoptos e Inicial	Apoptos e Tardia	Total de células Apoptóticas
Controle Negativo	98,69	0,15	0,44	0,71	1,15
DPB1 0,5 mM/kg/dia	92,27	0,98*	3,98***	2,76**	6,74***
DPB2 0,5 mM/kg/dia	89,10	2,46**	2,85**	5,59***	8,44***
DPB4 0,5 mM/kg/dia	84,17	0,58	7,75***	7,49***	15,24***
DPB5 0,5 mM/kg/dia	90,95	0,45	6,05***	2,55**	8,06***

A literatura descreve que níveis elevados de EROs podem causar lesões extensas no DNA, hiperativação da PARP1 e uma depleção grave de NAD(+)/ATP que estimulam a necrose dependente de Ca^{+2} (HUANG et al, 2012). Além disso, Fruehauf e Meyskens (2007), bem como Trachootham e colaboradores (2009) relatam que baixas concentrações de EROs podem promover a proliferação celular e ter efeitos mutagênicos e carcinogênicos, enquanto concentrações intermediárias induzem a apoptose e em altas concentrações induzem a necrose.

Além disso, tem sido relatado na literatura que quinonas podem mediar o efeito antitumoral através do desencadeamento tanto de necrose, como de apoptose. Benites e colaboradores (2008b) demonstraram que a 2-eurifuril-3-nitro-1,4-benzoquinona e a 2-eurifurilbenzoquinona induzem morte celular por necrose e apoptose, respectivamente, em hepatoma

murino. Os resultados são justificados pelos autores baseados nos valores dos potenciais de óxido-redução apresentados por estes compostos, onde a 2-urifuril-3-nitro-1,4-benzoquinona, por possuir um alto potencial redox, seria mais susceptível ao processo de biorredução, mediando dessa forma, uma alta geração de EROs e consequentemente induzindo a necrose. Já a 2-urifurilbenzoquinona, por possuir um baixo potencial redox, seria menos susceptível à biorredução, levando a uma baixa geração de EROs e ao desencadeamento da apoptose, corroborando os resultados apresentados neste trabalho, bem como com as características químicas apresentadas pelos compostos em estudo.

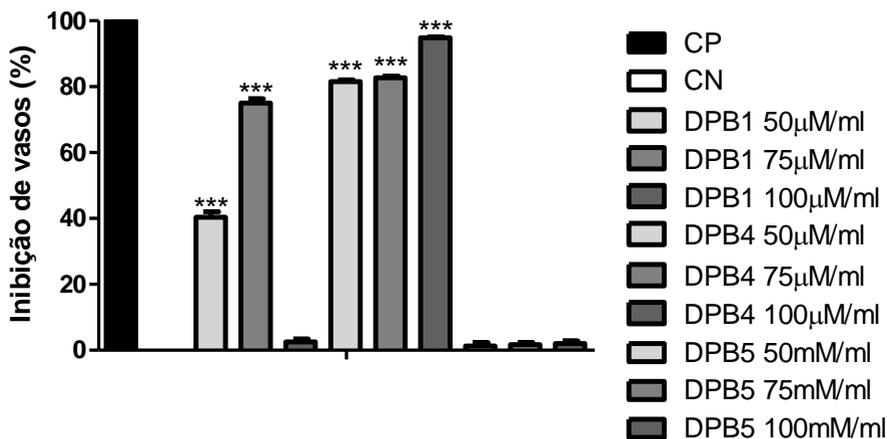
Neste sentido, observa-se que o composto DPB4 apresenta maior potencial redox ($E_{1/2}^I$ 578,30) (Tabela 1) que os demais compostos, o que pode justificar o fato deste composto ter promovido um aumento significativo do percentual de células em apoptose inicial e em apoptose tardia e/ou *necrosis like*.

4.14 ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA *IN VIVO*

Outro processo celular frequentemente associado ao câncer é a angiogênese, ou seja, a formação de novos vasos, que são necessários para dar aporte nutricional ao tumor, bem como esta associada ao processo de metástase, que constitui a principal causa de mortalidade associada ao câncer (FIDLER, 2002; LAI et al., 2011). Desta forma a regulação do crescimento dos vasos sanguíneos é uma importante estratégia no tratamento de câncer.

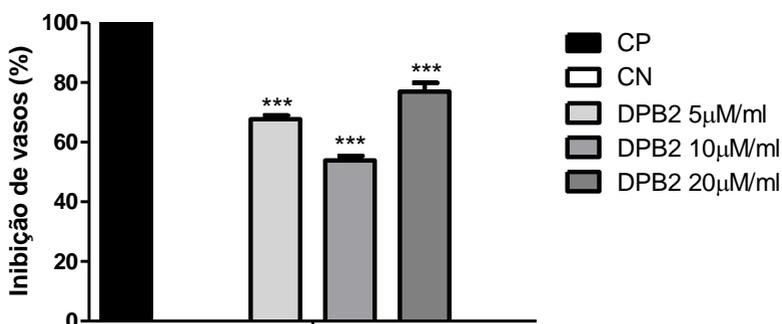
Os resultados obtidos sobre a atividade antiangiogênica estão representados nas Figuras 27 e 28. Como se pode observar, o composto DPB1 apresentou atividade antiangiogênica significativa, uma vez que tratamentos realizados com este derivado de 3-acil-2-fenilamino-1,4-naftoquinona nas concentrações de 50 e 75 μM foram capazes de reduzir o percentual de vasos em torno de 40 e 75%, respectivamente. Bem como o composto DPB4, que demonstrou importante efeito angiointerbitório de forma dose dependente (81%, 82% e 94%). O composto DPB5 em todas as concentrações avaliadas não demonstrou efeito angiointerbitório. O composto DPB2 nas concentrações de 50, 75 e 100 μM promoveu a morte do embrião. Curiosamente, quando este composto foi avaliado em menores concentrações, 5, 10 e 20 μM , como demonstrado na Figura 26, inibiu significativamente a formação de novos vasos (68%, 54% e 77%, respectivamente).

Figura 27. Atividade antiangiogênica apresentada pelas 1,4-naftoquinonas substituídas DPB1 e DPB5 (50, 75 e 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$).



Nota: Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (***) representam diferença estatística significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) em relação ao grupo controle negativo (CN). CP – controle positivo – tratamento com ácido retinóico.

Figura 28. Atividade antiangiogênica apresentada pela 1,4-naftoquinona substituída DPB2 (5, 10 e 20 $\mu\text{M}/\text{ml}$).



Nota: Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (***) representam diferença estatística significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,001$,

respectivamente) em relação ao grupo controle negativo (CN). CP – controle positivo – tratamento com ácido retinóico.

Em acordo com este trabalho, Lai e colaboradores (2011) demonstraram que plumbagina apresentou atividade antiangiogênica *in vitro*, em células HUVEC, células endoteliais de cordão umbilical, através do ensaio de migração, bem como o composto também foi capaz de inibir a angiogênese *in vivo*, através do ensaio de CAM (membrana corioalantóica). A atividade angiointibitória da plumbagina nas células endoteliais deveu-se ao bloqueio da VEGF mediada pelas vias de sinalização Ras/Rac/Confilin e Ras/MAPK. Outra quinona estudada, inclusive pelo nosso grupo de pesquisa, a juglona, também demonstrou atividade anti-metastática ao bloquear a proliferação, a migração e a angiogênese *in vivo* (KVICINSKI, 2011).

Em relação aos mecanismos pelos quais as quinonas exercem atividade antiangiogênica, tem sido relatado que esses compostos são capazes de inibir a atividade da proteína de choque Hsp90 induzindo a degradação de suas proteínas clientes, como NF-Kb, levando a supressão da expressão de proteínas envolvidas na metástase, como metaloproteinases (particularmente a metaloproteinase 9) e o fator endotelial vascular (VEGF), embora os compostos em estudo não tenham inibido a proteína Hsp90 em células K562, conforme demonstrado por Rios e colaboradores (2012) (LIU et al., 2011; TAN et al., 2011). Por fim, cabe ressaltar que EROs podem atuar promovendo a fosforilação e ativação de p53, via p38MAPK, culminando na inibição da fosforilação de IκB e impedindo a translocação de NF-Kb para o núcleo, diminuindo a expressão de proteínas metastáticas (ADHIKARY et al., 2010).

Dessa forma, sugere-se que as EROs gerados via ciclo redox do composto DPB1, DPB2 e DPB4 podem estar bloqueando a ativação do NF-Kb e conseqüentemente induzido os efeitos angiointibitórios promovidos por estes compostos. Ademais, tem sido demonstrado que inibidores da topoisomerase II também são capazes de promover efeito anti-metastático através do bloqueio da angiogênese, mediada pela inibição da expressão de VEGF (PARADZIEJ-ŁUKOWICZ et al., 2011). Este estudo corrobora nossos resultados, uma vez que os compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 demonstraram forte interação e uma capacidade de intercalar com DNA, e a fotoativação por UV promoveu um aumento do dano direto ao DNA, portanto, estas interações podem mediar a inibição da topoisomerase II, o que resultou na inibição da angiogênese observada (Figuras 25 e 26).

Em resumo, dentre as 1,4- naftoquinonas substituídas em estudo que demonstraram atividade citotóxica, antiproliferativa, nucleásica, genotóxica e angiointibitória, bem como a capacidade de intercalação com o DNA, destacam-se os compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5, que também apresentaram uma atividade antitumoral *in vivo* importante, principalmente o composto DPB4. Além disso, verificou-se que a fotoativação dos compostos potencializou a indução de dano direto ao DNA, e que este dano provavelmente seja por intercalação. Dentro deste contexto, foi observado ainda que os compostos DPB1, DPB2 e DPB5 foram capazes de induzir a fosforilação da histona γ H2Ax, confirmando o papel destes compostos no dano ao DNA. Adicionalmente, as 1,4-naftoquinonas substituídas induziram a parada do ciclo celular na fase G2, sendo confirmado pela avaliação das proteínas reguladoras dos pontos de checagem do ciclo. Podemos observar também, que os compostos promoveram a morte celular predominantemente por apoptose independente de caspase e/ou necrose programada tanto *in vivo* quanto *in vitro*. O que foi confirmado pelo aumento da expressão da proteína p53 e a não clivagem da proteína substrato de caspase, PARP. Diante desses resultados, sugere-se que os compostos possam ter promovido a morte celular por apoptose independente de caspase e/ou necrose programada ou *necrosis like*. Os compostos foram capazes de inibir significativamente o crescimento tumoral *in vivo*, destacando-se o composto DPB4. Ademais, os compostos também promoveram a inibição da formação de novos vasos sanguíneos, atividade angiointibitória, com destaque o composto DPB2.

Por fim, sugere-se que os efeitos mediados pelas 1,4-naftoquinonas substituídas em estudo se devam ao sinergismo de três mecanismos: ciclo redox, pelo aumento da geração de EROs, intercalação ao DNA e/ou inibição da topoisomerase II, que consequentemente induz a morte das células tumorais.

5 CONCLUSÕES

O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar o potencial citotóxico, antiproliferativo e antitumoral bem como o mecanismo de ação das 1,4-naftoquinonas substituídas. E de forma geral os resultados obtidos no presente trabalho nos permitem concluir que:

- As 1,4-naftoquinonas substituídas apresentaram atividade citotóxica destacando-se os compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5, e esta atividade pode estar relacionada a lipofilicidade em conjunto com a capacidade redox de cada composto, que pode facilitar interações com os alvos biológicos envolvidos no efeito citotóxico;

- Os compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 apresentaram atividade antiproliferativa;

- Entre os possíveis mecanismos pelos quais os compostos avaliados promovem a citotoxicidade sugerimos o dano direto ao DNA ou a interação por intercalação com o DNA;

- O dano ao DNA foi confirmado pela fosforilação da histona γ H2Ax induzida pelas 1,4-naftoquinonas substituídas, com exceção do composto DPB4;

- De maneira geral os compostos estudados, causaram um bloqueio somente na fase G2 do ciclo celular uma vez que não houve inibição da expressão da proteína cdk2, envolvida na fase G1;

- Sugere-se que os compostos possam ter promovido a morte celular por apoptose independente de caspase e/ou necrose programada ou *necrosis like*, uma vez que os mesmos aumentaram o percentual de células em apoptose tardia e/ou necrose tanto *in vivo* quanto *in vitro*, aumentaram a expressão da proteína p53 e não promoveram a clivagem da PARP;

- Sugere-se também que o aumento do conteúdo intracelular de EROs promovido pelos compostos em estudo possa estar relacionado a uma maior atividade citotóxica, nucleásica, citostática e antitumoral exercido por estes compostos;

- Além disso os compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 apresentaram efeito antitumoral *in vivo* sobre o tumor ascítico de Ehrlich, e sugere-se que o mecanismo da atividade antitumoral *in vivo* estaria associado a indução de estresse oxidativo;

- As 1,4-naftoquinonas substituídas apresentaram atividade angiointibitória, destacando-se o composto DPB2;

- E por fim, sugere-se que os efeitos citotóxicos e antiproliferativo *in vitro*, bem como antitumoral e angioinibitório *in vivo* mediados pelos compostos DPB1, DPB2, DPB4 e DPB5 se devam ao sinergismo de três mecanismos: ciclo redox, intercalação ao DNA e/ou inibição da topoisomerase II.

6 PERSPECTIVAS

A eficácia das 1,4-naftoquinonas substituídas continuará a ser avaliada no LABIOEX como parte de projetos de outros alunos de pós-graduação, tendo como propostas:

- Avaliar a atividade citotóxica dos compostos sobre outras linhagens celulares tumorais, bem como sobre em células normais, para determinação da especificidade dos compostos, através da execução do ensaio do MTT;
- Avaliar a atividade das 1,4-naftoquinonas substituídas sobre a topoisomerase I e II;
- Avaliar a atividade anti-invasiva *in vitro* através da avaliação da migração celular e da caracterização da expressão de VEGF, em células tumorais tratadas com as 1,4-naftoquinonas substituídas;
- Avaliar a interferência do tratamento à base das 1,4-naftoquinonas substituídas sobre a expressão de genes e a ativação de intermediários das vias de sinalização das cinases ativadas por mitogênio, fosfoinositol 3 cinase-Akt-mTOR e JAK-STAT;
- Avaliar a expressão de proteínas envolvidas nas vias de sinalização da morte celular por necrose programada, como RIP1 e RP3;
- Avaliar a expressão de proteínas inflamatórias envolvidas no processo de morte celular, como TNF α ;
- Avaliar o efeito citotóxico, citostático e genotóxico dos compostos em associação a quimioterápicos padrões, como doxorrubicina, cisplatina, 5-fluorouracil, tamoxifeno, ironetecam sobre linhagens de células tumorais e normais;
- E por fim, estudar a atividade antitumoral e angiainibitória das 1,4-naftoquinonas substituídas *in vivo*, avaliando riscos e benefícios, sobretudo em nível cardiovascular, avaliando a eficácia e a segurança dos princípios ativos, usando a doxorrubicina como elemento de comparação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. C. et al. Some applications of electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the correlation of electrochemical and bioactive properties. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 1. P. 19-35, 2002.

ADHIKARY, A. et al. Theaflavins retard human breast cancer cell migration by inhibiting NF-kappaB via p53-ROS cross-talk. **FEBS Letters**. V.584, p.7-14, 2010.

ADORNO, G. L. A. R. **Angiogênese em carcinomas de mama: análise de expressão de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e suas correlações com outros fatores prognósticos**. 2008. 118 f. Dissertação – Mestrado em Ciências da Saúde –Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

AGUILERA, A.; GOMEZ-GONZALEZ, B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 204–217, 2008.

AITHAL, B.K. et al. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. **Cell Biology International**, v. 33, 1039-49, 2009.

ALI, H.; VAN-LIER, J. E. Metal complexes as photo and radiosensitizers. **Chemical Reviews**, v. 99 , n. 9, p. 2379-2450, 1999.

ALMEIDA, V.L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ANAZETTI, M.C; MELO, P.S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, São Paulo, v. 1, n. 1, p.37-58, 2007.

ANTONY, S. et al. Novel indenoisoquinolines NSC 725776 and NSC 724998 produce persistent topoisomerase I cleavage complexes and overcome multidrug resistance. **Cancer Research**, v. 67, p. 10397–10405, 2007.

ARAÚJO, A. J. et al. Growth inhibitory effects of 30-nitro-3-phenylamino nor-beta-lapachone against HL-60: A redox-dependent mechanism. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 585–594, 2012.

ARRABAL, S. R. et al. Involvement of free radicals in breast cancer. **Springerplus**, v. 4, p. 404, 2013.

ARTUS. C. et al. AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. **Journal EMBO**, v. 29, p. 1585-99, 2010.

ARRUDA, J. T. et al. Proteína p53 e o câncer: controvérsias e esperanças. **Estudos Góiania**, v. 35, p; 123-41, 2008.

AUDIC, Y.; HARTLEY, R. S. Post-transcriptional regulation in cancer – Review. **Biology of the Cell**, v. 96, p. 479–498, 2004.

BALDINI, M. et al. Cu(II) complexes with heterocyclic substituted thiosemicarbazones: the case of 5-formyluracil. Synthesis, characterization, X-ray structures, DNA interaction studies, and biological activity. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 2049-2055, 2003.

BARITAUD, M. et al. Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. **Cell Cycle**, v. 16, p. 3166–3173, 2010.

BATISTA, L.F.Z. **Um estudo sobre o papel da p53 na resitência de células de glioma a agentes quimioterápicos**. São Paulo, 2008, 159f. Tese de doutorado- Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação Ciência Biomédicas, São Paulo, 2008.

BDPHARMIGEN. Technical Data Sheet- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I. Disponível em http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/cell_bio/live/web_enabled/6693KK_556547.pdf Acesso em 15 de maio de 2012.

BECK, R. et al. Menadione reduction by pharmacological doses of ascorbate induces an oxidative stress that kills breast cancer cells. **International Journal of Toxicology**, v.28. p. 33-42, 2009.

BENADIBA, M. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Análise de expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão e migração de células C6 in vitro e in vivo, após o tratamento com ácido γ -linolênico (GLA) e com um novo complexo dirutênico contendo ibuprofeno (Ru-Ibp).** São Paulo, 2008, 166f. Tese de doutorado- Universidade de São Paulo, Instituto de ciências Biomédicas, São Pulo, 2008.

BENITES, J. et al. Studies on quinine . Part 42: Synthesis of furylquinone and hydroquinones with antiproliferative activity against human tumor cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16 , p. 862–868, 2008a.

BENITES, J. et al. Part 1: Effect of vitamin C on the biological activity of two euryfurylbenzoquinones on TLT, a murine hepatoma cell line. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43 , p.1813e1817, 2008b.

BENITES, J. et al. Part 2: Influence of 2-euryfuryl-1,4-naphthoquinone and its peri-hydroxy derivatives on both cell death and metabolism of TLT cells, a murine hepatoma cell line. Modulation of cytotoxicity by vitamin C. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. 57: 615-619, 2009.

BENITES, J. et al. Biological evaluation of donor-acceptor aminonaphthoquinones as antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p.6052-6057, 2010.

BENITES, J. et al. The solar-chemical-Friedel-Crafts heteroacylation of 1,4-quinones. **Tetrahedron Letters**, v. 52, p. 609-611, 2011.

BERG, T. A. **Iron Catalyzed Oxidation Chemistry from C-H bond Activation to DNA Cleavage.** Tese de Doutorado. Faculdade de Matemática e Ciências Naturais, Universidade de Groningen, 2008.

BISCHOFF, G; HOFFMANN, S. DNA-binding of drugs used in medicinal therapies. **Current Medicinal Chemistry**, v.9, n.3, p.321–348, 2002.

BISO, F. I. **Avaliação da atividade mutagênica e fitoestrogênica das plantas Davilla nítida Vahl e Davilla elliptica St. Hil (Dilleniaceae),** 2008, 164f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicadas a Farmácia)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

BONNET, R. **Chemical Aspects of Photodynamic Therapy**, Gordon & Breach: London, U.K., 2000.

BONNER, W. M. et al. H2AX and cancer. **Nature Review Cancer**, v. 8, p. 957–967, 2008.

BORMAN, S. Target-promoted DNA alkylation. New technique may be applicable to many other reagents and targets in addition to DNA. **Chemical & Engineering News**, v.82, n.5, p.25, 2004.

BORTOLOTTI, T. et al. Evaluation of the toxic and genotoxic potential of landfill leachates using bioassays. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 288-93, 2009.

BOUJRAD, H. et al. AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. **Cell Cycle**, v. 6, p. 2612-9, 2007.

BRONDANI, D.J. et al. Síntese, Avaliação da Atividade Citotóxica e Toxicidade Aguda de Análogos da Primina 3 e 6 Alquil-Substituídas. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.25, p. 248-251, 2007.

CHAE, J-I. et al. Phosphoinositol 3-kinase, a novel target molecule for the inhibitory effects of juglone on TPA-induced cell transformation. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, p. 8-14, 2012.

CHAMPOUX, J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p.369-413, 2001.

CHANG, F., et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. **Leukemia**, v. 17, p. 590-603, 2003.

CHEN, Z-F. et al. Synthesis, characterization and preliminary cytotoxicity evaluation of five Lanthanide(III)–Plumbagin complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 426–434, 2011.

CHIPUK, J.E.; GREEN, D.R. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? **Nature Reviews**, v.6, p.268-275, 2005.

CHOUDHURY, S.M. et al. Antineoplastic activities of MT81 and its structural analogue in ehrlich ascites carcinoma-bearing swiss albino mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, p.61-70, 2011.

CHRISTOFFERSEN T. et al. Cancer therapy targeted at cellular signal transduction mechanisms: strategies, clinical results, and unresolved issues. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p. 6–22, 2009.

COLLINS, I.; GARRETT, M. D. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. **Current Opinion Pharmacology**, v.5, p. 366–373, 2005.

COLMAN, M.S. et al. Regulation of p53 and activity in response to genotoxic stress. **Mutation Research**, v. 462, p.179-188, 2000.

CORTÉS-FUNES H.; CORONADO C. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. **Cardiovascular Toxicology**, v. 7, p. 4, 2007.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews**, v.2, p.647-656, 2002.

CORY, S. et al. The Bcl2 family: roles in cell survival and oncogenesis. **Oncogene**, v. 22, n. 53, p. 8590-607, 2003.

COZZI, P. The discovery of a new potential anticancer drug: a case history. **Il Farmaco**. V.58, n.3, p. 213-220, 2003.

CRANE, E.L.; BÖTTGER, M. Plasma membrane redox systems. **Protoplasma**, v.217, p.1-2, 2001.

DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S.J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-219, 2004.

DA SILVA, M.N. et al. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, p. 407-416, 2003.

DAL BEN, D. et al. DNA topoisomerase II structures and anthracycline activity: insight into ternary complex formation. **Current Pharmacetical Design**, v. 13, p. 2766–2780, 2007.

DAS, B. R.; NAGPAL, J. K. P53 codon 72 polymorphism and susceptibility to development of human papiloma virus-associated cervical cancer in Indian woman. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, n. 12, p. 943-948, 2002.

DE ALMEIDA, V.L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quimica Nova**, v.28, p. 118-129, 2005.

DEEB, D. et al. Oleanane triterpenoid CDDO-Me inhibits growth and induces apoptosis in prostate cancer cells through a ROS-dependent mechanism. **Biochememistry and Pharmacology**, v. 79, p. 350–360, 2010.

DEJEANS, N. et al. Endoplasmic reticulum calcium release potentiates the ER stress and cell death caused by an oxidative stress in MCF-7 cells. **Biochememistry and Pharmacology**, v.79, n.9, 1221-30, 2010.

DICKANCAITÉ, E. et al. Toxicity of Daunorubicin and naphthoquinones to HL-60 cells: an involvement of oxidative stress. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.41, n.5, p.987-994, 1997.

DUESBERG, P.; RASNICK, D. Aneuploidy, the Somatic Mutation That Makes Cancer a Species of Its Own. **Cell Mot. Cytosk**, v.47, p.81-107, 2000.

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

EMADI, A. et al. Metabolic and electrochemical mechanisms of dimeric naphthoquinones cytotoxicity in breast cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 7057–7062, 2011.

FANG, F.; NEWPORT, J. W. Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. **Cell**, v. 66, n. 4, p. 731-42, 1991.

FIANDALO, M. P.; KYPRIANOU, N. Caspase control: protagonists of cancer cell Apoptosis. **Experimental oncology**, v. 34, n. 3, p. 165-175, 2012.

FIDLER, I.J. Critical determinants of metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v.12, p.89–96, 2002.

FORTINI, P. et al. DNA damage response by single-strand breaks in terminally differentiated muscle cells and the control of muscle integrity. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 1741–1749, 2012.

FRUEHAUF, J. P.; MEYSKENS, J. L. Jr. Reactive oxygen species: a breath of life or death? **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 3, p. 789-94, 2007.

GALEA, C. A. et al. Regulation of Cell Division by Intrinsically Unstructured Proteins; Intrinsic Flexibility, Modularity and Signaling Conduits. **Biochemistry**, v.47, n. 29, p. 7598-7609, 2008.

GANEM, N. J.; PELLMAN, D. Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. **Journal of Cell Biology**, v. 199, n. 6, p. 871-881, 2012.

GARUTI, L. et al. Differential antiproliferative activity of new benzimidazole-4,7-diones. **Il Farmaco**, v.59, p. 663–668, 2004.

GHOBRAL, I.M. et al. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v.55, p. 178-194, 2005.

GHOLIVAND, M.B. et al. DNA-binding, DNA cleavage and cytotoxicity studies of two anthraquinone derivatives. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 87, p. 232-240, 2012.

GLORIEUX, C. et al. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. **Biochemistry and Pharmacology**, v. 82, n. 10, p. 1384-90, 2011.

GOGVADZE, V. et al. Mitochondria as targets for chemotherapy. **Apoptosis**, v. 14, p.624-640, 2009.

GONG, J.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. A Selective Procedure for DNA Extraction from Apoptotic Cells Applicable for Gel Electrophoresis and Flow Cytometry. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 2, p. 314-319, 1994.

GUIMARÃES, C.A.; LINDEN, R. Programmed cell death: apoptosis and alternative death styles. **Europe Journal Biochemistry**, v. 271, p. 1638-1650, 2004.

GUPTA, S. et al. A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. **Immun Ageing**, v. 19, p. 3-5, 2006.

GUTIERREZ, P. L. The metabolism of urine-containing alkylating agents: free radical production and measurement. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.629-38, 2000.

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

HOLLENSWORTH, S. B. et al. Glial cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1161-1174, 2000.

HOSHIDA, T. et al. Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor- C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications, **Cancer Research**, v. 66, n. 16, p. 8065-8075, 2006.

HUANG, X. et al. An NQO1 substrate with potent antitumor activity that selectively kills by PARP1-induced programmed necrosis. **Cancer Research**, v. 72, n. 12, p. 3038-3047, 2012.

HUSSAIN, A. R. et al. Sanguinarine-Dependent induction of apoptosis in primary effusion lymphoma cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 8, p. 3888-97, 2007.

HUSSAIN, A. et al. Photocytotoxic lanthanum (III) and gadolinium (III) complexes of phenanthroline bases showing light-induced DNA cleavage activity. **Inorganic Chemistry**, v. 49, p. 4036-4045, 2010.

HYUN, M.S. et al. BBR induces apoptosis in HepG2 cell through an Akt-ASK1-ROS-p38MAPKs-linked cascade. **Journal of Cell and Biochemistry**, v. 109, p. 329–338, 2010.

INCA. Disponível em:
<http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em 15 de junho de 2012.

INCA. Disponível em:
<http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em 20 de janeiro de 2014.

INJAC, R.; STRUKELJ, B. Revert advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. **Technology in cancer research & treatment**, v.7, n. 6, p. 497-516, 2008.

JAKÓBISIAK, M. et al. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunology Letters**, v. 90, n. 2-3, p. 103-22, 2003.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v.61, p.69–90, 2011.

JOHNSON, D.G.; WALKER, C.L. Cyclins and the cell cycle checkpoints. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, p. 295-312, 1999.

JORDAN, M.A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Review Cancer**. v.4, p. 253-65, 2004.

JUNK, D. J. et al. Constitutive CCND1/CDK2 Activity Substitutes for p53 Loss, or MYC or Oncogenic RAS Expression in the Transformation of Human Mammary Epithelial Cells. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e53776, 2013.

KAMB, A. Cell-cycle regulators and cancer. **Anesthesia**, v.55, p.1081-1093, 2000.

KAWIAK, A. et al. Induction of apoptosis by plumbagin through reactive oxygen species-mediated inhibition of topoisomerase II. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 223, p. 267–276, 2007.

KELLY, J.M. et al. A study of the interactions of some polypyridylruthenium(I) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. **Nucleic Acids Research**, v. 13, p. 6017-6034, 1985.

KENNEDY, S. et al. Topoisomerase I inactivation by a novel thiol reactive naphthoquinone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 410, p. 152–158, 2011a.

KENNEDY, S. et al. Topoisomerase I/II inhibition by a novel naphthoquinone containing a modified anthracycline ring system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 408, p. 94–98, 2011b.

KERR, J. F. R. et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p.239-257, 1972.

KROEMER, G. et al. Mitochondrial membrane permeabilisation in cell death. **Physiology Review**, v. 87, n. 1, p. 99-163, 2007.

KUDO, Y. et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous B-catenin. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 5455-63, 2004.

KUMAGAI, Y. et al. The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 52, p. 221–47, 2011.

KUNG, G. et al. Programmed Necrosis, Not Apoptosis, in the Heart. **Circulation Research**, v. 108, p. 1017-1036, 2011.

KUMAR, V. et al. **Pathology basis of disease**. 7ed. China:WB Saunders, 2003, 1552p.

KUMAR, M. R. S. et al. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 242–250, 2009.

KURPIEWSKI, M. R. et al. Mechanisms of coupling between DNA recognition and catalysis in EcoRI endonucleases. **Structure**, v. 12, p. 1775–1788, 2004.

KVIECINSKI, M.R. et al. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.117, p. 69–75, 2008.

KVIECINSKI, M. R. et al. SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetilenes with uinine activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2011a.

KVIECINSKI, M.R. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Atividade antitumoral e mecanismos de ação de extratos de *Bidens pilosa* ricos em poliacetilenos e de Juglona associada ao Ascorbato**. Florianópolis, 2011, 81f. Qualificação de doutorado-Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2011b.

KVIECINSKI, M.R. et al. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human prostate-derived T24 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 421, p. 268-273, 2012.

LAI, L. et al. Plumbagin inhibits tumour angiogenesis and tumour growth through the Ras pathway following activation of the VEGF receptor-2. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, p. 1084-1096, 2011.

LARSEN, A.K. et al. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology Therapy**. v. 99, p. 167–181, 2003.

LEE, S. J.: PARK, J-W. Enhancement of UVB radiation-mediated apoptosis by knockdown of cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase in HaCaT cells. **Biochemistry a Molecular Biology Report**, doi:p11: 2406. [Epub ahead of print], 2013.

LI, N. et al. Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. **Biophysical Chemistry**, v. 116, p. 199–205, 2005.

LI, Y. et al. Emodin Triggers DNA Double-Strand Breaks by Stabilizing Topoisomerase II-DNA Cleavage Complexes and by Inhibiting ATP Hydrolysis of Topoisomerase II. **Toxicological Sciences**, v. 118, p. 435–443, 2010.

LIN, S-W. et al. Emodin Induces Apoptosis of Human Tongue Squamous Cancer SCC-4 Cells through Reactive Oxygen Species and Mitochondria-dependent Pathways. **Anticancer Research**, v. 29, p. 327–336, 2009.

LIOTTA, L. A. et al. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, v. 64, p. 327–336, 1991.

LIU, X.D. et al. The Yeast Hsp110 Family Member, Sse1, Is an Hsp90 Cochaperone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 26654–26660, 1999.

LIU, A. et al. Antiproliferative and antimetastatic effects of emodin on human pancreatic cancer. **Oncology Reports**, v.26, p.81–89, 2011.

LYMAN, S. K. et al. High-Content, High-Throughput Analysis of Cell Cycle Perturbations Induced by the HSP90 Inhibitor XL888. **PLoS One**, v. 6, n. 3, e17692, 2011.

LODISH, H. et al. **Molecular Cell Biology**. 4 ed. New York, 2000.

LOTHSTEIN, L. et al. Catalytic inhibition of DNA topoisomerase II by N-benzyladriamycin (AD 288). **Biochemistry and Pharmacology**, v. 60, n. 11, p. 1621–8, 2000.

LU, Y. et al. Interaction of an anthracycline disaccharide with ctDNA: Investigation by spectroscopic technique and modeling studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 75, p. 1511–1515, 2010.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Review Cancer**, v. 9, p.153–66, 2009.

MANCIN, F. et al. Artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, p. 2540–2548, 2005.

MATZNO, S. et al. An Attempt to Evaluate the Effect of Vitamin K3 Using as an Enhancer of Anticancer Agents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 6, p. 1270-73, 2008.

MAZZOCCA A. et al. A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor–stromal interactions. **Cancer Research**, v. 65, p. 4728–38, 2005.

MCCAWLEY, L.; MATRISIAN, L. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. **Molecular Medicine Today**, v.6, p.149-156, 2000.

MELO, P. S. et al. Natural Killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives. **European Journal of Pharmacology**, v. 487, p. 47-54, 2004.

MINOTTI, G. et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v.56, n. 2, p.185–229, 2004.

MOFFAT, J. et al. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascite tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3- action. **Carcinogenesis**, v.21 (12), p. 2151-2157, 2000.

MOLINARI M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Proliferation**, v. 33, p. 261-274, 2000.

MONKS, T.J. et al. Quinone chemistry and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.112, n.1, p.2–16, 1992.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55–63, 1983.

NAKAJIMA, K. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Avaliação do ciclo celular de células tronco/progenitoras hemopoiéticas da medula óssea de camundongos submetidos a desnutrição proteica.** São Paulo, 2010, 172f. Tese de doutorado- Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Pulo, 2010.

NAVARRO, M. et al. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against Leishmania uinine of $[Cu(dppz)_2]BF_4$. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, n. 4, p. 364-369, 2003.

NEIDLE, S. The molecular basis for the action of some DNA-binding drugs. **Progress in Medicinal Chemistry**, v.16, p. 151–221, 1979.

NELSON, D.: COX, M., M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**, 3a edição. Editora: Worth Publishers, 2000.

NGUYEN, M. et al. Quantitation of Angiogenesis and Antiangiogenesis in the Chick-Embryo Chorioallantoic Membrane. **Microvascular Research**, v.47 (1), p.31-40. 1994.

NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22 (8), p.299-306, 1997.

O'BRIEN, P.J. Molecular mechanism of uinine cytotoxicity. **Chemico Biological Interactions**, v.80, n.1, p.1-41, 1991. Erratum in **Chemico Biological Interactions**, v.81, n.1-2, p.219, 1992.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, n. 1, p. 1-18, 1997.

ÖLLINGER, K.; BRUNMARK, A. Effect of uinine substituent position on 1,4-naphthoquinone toxicity to rat hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, 266, n.32, 21496-21503, 1991.

OPPENHEIMER S.B. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. **Acta histochemica**, v. 108, p. 327-334, 2006.

OSBORNE, C. et al. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potencial Diagnostic and therapeutic Applications. **The Oncologist**, v. 9, p. 361-377, 2004.

PARADZIEJ-LUKOWICZ, J. et al. Anticancer imidazoacridinone C-1311 inhibits hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis. **Cancer Biology & Therapy**, v.12, p.586-597, 2011.

PARONE, P.A. et al. Mitochondria: regulating the inevitable. **Biochimie**, v. 84, p.105–111, 2002.

PLUMBRIDGE, T.W.; BROWN, J.R. Spectrophotometric and fluorescence polarization studies of the binding of ethidium, daunomycin and mepacrine to DNA and to poly(I · C). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 479, p. 441-449, 1977.

PODGORSKI, I. et al. Cathepsin K in the bone microenvironment: link between obesity and prostate cancer? **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 701-3, 2007.

POLICARPI, E. B. **Síntese, caracterização e estudo de interação com o DNA de novos complexos de cobre(II) com ligantes planares aromáticos**. Florianópolis, 2011, 127f. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2011.

RAJ, L. et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. **Nature**, v. 481, p. 531–534, 2012.

RAJESHKUMAR, N. V. et al. Antitumour and anticarcinogenic activity of Phyllanthus amarus extract, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 17-22, 2002.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

RAVERA, M. et al. DNA-Metallo drugs Interactions Signaled by Electrochemical Biosensors: An Overview. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v.2007, 91078 – 91091, 2007.

REED, J.C. Bcl-2 family proteins. **Oncogene**, v.17, p.3225–3236, 1998.

RIBEIRO, L. R. et al. **Mutagênese Ambiental**. Canoas Ed Ulbra, 356p., 2003.

RIOS, D. et al. Biological Evaluation of 3-Acyl-2-Arylamino-1,4-Naphthoquinones as Inhibitors of Hsp90 Chaperoning Function. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2094-2102, 2012.

ROSS, D. et al. The role of oxidative processes in the cytotoxicity of substituted 1,4-naphthoquinones in isolated hepatocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.248, p. 460-466, 1986.

SALTI, G. I. A novel use for the comet assay: detection of topoisomerase II inhibitors. **Anticancer Research**, v. 20, n. 5A, p. 3189-93, 2000.

SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. et al. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. **Biological of Chemistry**, v. 378, p. 1247-1257, 1997.

SHAPIRO, G. I.: HARPER, W. Anticancer Drug Targets: Cell Cycle and Checkpoint Control. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 12, p. 1645-1653, 1999.

SCHERR, C. J.: McCORMICK, F. The Rb and p53 pathways in cancer. **Cancer cell**, v. 2, p. 103-112, 2002.

SCHNEIDER, P., TSCHOPP, J. Apoptosis induced by death receptors. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 74, n. 2-3, p. 281-6, 2000.

SCHRAMEK, D. et al. The stress kinase MKK7 couples oncogenic stress to p53 stability and tumor suppression. **Nature genetics**, v. 43, n. 3, p. 212–219, 2011.

SCHWARTZ, G. K.; SHAH, M. Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 36, p. 9408-9421, 2005.

SENJU, M. et al. Hsp90 inhibitors cause G2/M arrest associated with the reduction of Cdc25C and Cdc2 in lung cancer cell lines. **Journal of Cancer Research Clinical Oncology**, v. 132, p.150–158, 2006.

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

SILVA, J. et al. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. **Mutation Research**, v. 470, p. 39-41, 2000.

SILVA, M. N. et al. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

SILVA, P. P. et al. Platinum(II) Compounds of Tetracyclines as Potential Anticancer Agents: Cytotoxicity, Uptake and Interactions with DNA. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 7, p. 1237-1246, 2010.

SILVEIRA, V.C. **Investigação da Atividade Biológica de Complexos de Cobre (II) com Ligantes Inspirados em Biomoléculas**. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, 2008.

SIU, W. P. et al. Bax-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), distinct from the mitochondrial permeability transition, is a key mechanism in diclofenac induced hepatocyte injury: Multiple protective roles of cyclosporine A. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 227, p. 451–61, 2008.

SMART, D. J., et al. Assessment of DNA double-strand breaks and gammaH2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone. **Mutation Research**, v. 641, p. 43–47, 2008.

SMITH, J. et al. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. **Advance Cancer Research**, v. 108, p. 73–112, 2010.

SMITS, V.A.: MEDEMA, R.H. Checking out the G(2)/M transition. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1519, n.1-2, p.1-12, 2001.

SREEDHARA A.; COWAN J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.4, p.337-347, 2001.

SRINIVAS, P. et al. Cytotoxicity of naphthoquinones and their capacity to generate reactive oxygen species is quenched when conjugated with gold nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2113-22, 2011.

STROHMAIER, H. et al. Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. **Nature**, v. 413, p. 268-269, 2001.

SWANTON C. Cell-cycle targeted therapies. **Lancet Oncology**, v. 5, p. 27-36, 2004.

TAN, W. et al. Anti-cancer natural products isolated from uinine medicinal herbs. **Chinese Medicine**, p. 6: 27, 2011.

TANNER, F. C. et al. Nitric oxide modulates expression of cell cycle regulatory proteins: a cytostatic strategy for inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation. **Circulation**, v. 101, n. 16, p. 1982-9, 2000.

TAPER, H. S. et al. Inhibition of the development of metastases by dietary vitamin C:K3 combination. **Life Science**, v. 75, p. 955- 967, 2004.

TEDESCHI, G. et al. DT-diaphorase: redox potential, steady-state, and rapid reaction studies. **Journal of Biology and Chemistry**, v.270, p.1198-1204, 1995.

TRACHOOTHAM, D. et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. **Cancer Cell**, v. 10, n. 3, p. 241-252, 2006.

TRACHOOTHAM, D. et al. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nature Reviews**, v. 8, p. 579-591, 2009.

VALDERRAMA, J. A. et al. Studies on quinones. Part 45: novel 7-aminoisoquinoline-5,8-quinone derivatives with antitumor properties on cancer cell lines. **Biorganic Medicine Chemistry**, v. 1, n. 7, p. 2894-2901, 2009.

VALDERRAMA, J. A. et al. Studies on quinones. Part 47. Synthesis of novel phenylaminophenanthridinequinones as potential antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 3398-3409, 2011.

VANLANGENAKKER, N. et al. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 75-86, 2012.

VÁSQUEZ, D.R. et al. Aminopyrimidoisoquinolinequinone (APIQ) redox cycling is potentiated by ascorbate and induces oxidative stress leading to necrotic-like cancer cell death. **Investigational New Drugs**, 2011.

VERRAX, J. et al. Ascorbate potentiates the cytotoxicity of menadione leading to an oxidative stress that kills cancer cells by a non-apoptotic caspase-3 independent form of cell death. **Apoptosis** v. 9, p. 223-233, 2004.

VERRAX, J. et al. Enhancement of uinine redox cycling by ascorbate leads to cancer cell death through a caspase-3 independent pathway. An in vitro comparative study. **Free Radical Research**, 39: 649-657, 2005.

VERAX, J. et al. Oxidative stress by ascorbate/menadione association kills K562 human chronic myelogenous leukaemia cells and inhibits its tumour growth in nude mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 671-680, 2006.

VERRAX, J. et al. Role of glycolysis inhibition and poly(ADP-ribose) polymerase activation in necrotic-like cell death caused by ascorbate/menadione-induced oxidative stress in K562 human chronic

myelogenous leukemic cells. **International Journal of Cancer**. V.120, p.1192–1197, 2007.

VERRAX, J.; CALDERON, P.B. Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p.32-40, 2009a.

VERRAX, J. Et al. In situ modulation of oxidative stress: a novel and efficient strategy to kill cancer cells. **Current Medicine and Chemistry**, v. 16, p. 1821-1830, 2009b.

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

VERRAX, J. et al. Intracellular ATP levels determine cell death fate of cancer cells exposed to both standard and redox chemotherapeutic agents. **Biochemical Pharmacology**, v.82, p.1540-1548, 2011b.

VILLELA, I. V. et al. Bioensaios para Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: **Genética Toxicológica**. SILVA, J. ; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Porto Alegre. Editora Alcance, p. 147-161, 2003.

WANG, S. F. et al. Electrochemical determination of interaction parameters for DNA and mitoxantrone in an irreversible redox process. **Biophysical Chemistry**, v.104, p. 239–248, 2003.

WANG, H.F. et al. Synthesis and characterization of the Zn(II) and Cu(II) piperidinyl isoeuxanthone complexes: DNA-binding and cytotoxic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 4509-4515, 2009.

WANG, X. et al. Selective depletion of mutant p53 by cancer chemopreventive isothiocyanates and their structure-activity relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 809–16, 2011.

WARREN, M. C. et al. Apoptosis inducing activity of vitamin C and vitamin K. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 537–547, 2010.

WEINBERG, R. A. **Uma Célula Renegada: Como o Câncer Começa**. Rio de Janeiro: Rocco, 2000.

WEINBERG, R.A. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WEISS, R.B. "The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?" **Seminars in Oncology**, v.19, n.6, p.670-86, 1992.

WHTIFILELD, M. L. et al. Common markers of proliferation. *Nature Review Cancer*, v. 6, p. 99-106, 2006.

WONG, R.S.Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, p. 87- 101, 2011.

WU, F.Y.; SUN, T.P. Vitamin K3 induces cell cycle arrest and cell death by inhibiting Cdc25 phosphatase. **European Journal of Cancer**, v. 35, p. 1388–1393, 1999.

XU, H. L. et al. Juglone, from *Juglans mandshruica* Maxim, inhibits growth and induces apoptosis in human leukemia cell HL-60 through a reactive oxygen species-dependent mechanism. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 590–596, 2012.

ZHANG, S. et al. A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of 1,10-phenanthroline and lthreonine with DNA nuclease activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 12, p. 2099-2106, 2004.

ZHANG, R. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of a novel series of bisintercalating DNA-binding piperazine-linked bisanthrapyrazole compounds as anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 7023-7032, 2011.

ZHONG, X. et al. Silymarin causes caspases activation and apoptosis in K562 leukemia cells through inactivation of Akt pathway. **Toxicology**, v. 227, 211–216, 2006.

ZHOU, S. F., et al. Metabolic activation of herbal and dietary constituents and its clinical and toxicological implications: an update. **Current Drug Metabolism**, v. 8, p. 526–553, 2007.

ZOU, J., et al. Olaquinox-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in human hepatoma G2 (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 676, p. 27–33, 2009.

ANEXO A – primeira página do artigo publicado no periódico *Current Topics in Medicinal Chemistry*, volume 12, páginas 2094 a 2102, no ano de 2012, sob título de *Biological Evaluation of 3-Acyl-2-Arylamino-1,4-Naphthoquinones as Inhibitors of Hsp90 Chaperoning Function*.

Send Orders of Reprints at bspsa@u-emirates.net.ae

2094

Current Topics in Medicinal Chemistry, 2012, 12, 2094-2102

Biological Evaluation of 3-Acyl-2-Arylamino-1,4-Naphthoquinones as Inhibitors of Hsp90 Chaperoning Function

David Ríos^{a,b}, Julio Benítez^{a,b}, Jaime A. Valderrama^{b,c,e,*}, Mirelle Farias^d, Rozangela C. Pedrosa^d, Julien Verrax^e and Pedro Buc Calderon^{a,b,c,e}

^aFacultad de Ciencias de la Salud, Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile; ^bInstituto de EnoFarmacología (IDE), Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile; ^cFacultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile; ^dLaboratório de Bioquímica Experimental, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ^eToxicology and Cancer Biology Research Group, Louvain Drug Research Institute (LDRI), Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

Abstract: Hsp90 is a chaperone that plays a key function in cancer cells by stabilizing proteins responsible of cell growth and survival. Disruption of the Hsp90 chaperone machinery leads to the proteosomal degradation of its client proteins. Hsp90 appears then as an attractive target for the development of new anticancer molecules. We have shown that ascorbate-driven menadione-redox cycling inhibits Hsp90 activity by provoking an N-terminal cleavage of the protein, inducing the degradation of several of its client proteins. Since this mechanism involves an oxidative stress, we explored the effect of a series of diverse donor-acceptor 3-acyl-2-phenylamino 1,4-naphthoquinones on Hsp90 integrity, in the presence of ascorbate. Results show that quinone-derivatives that bear two electroactive groups (namely quinone and nitro) exhibit the highest inhibitory activity (Hsp90 cleavage and cell death). The biological activity of the series mainly relies on their redox capacity and their lipophilicity, which both modulate the ability of these compounds to induce a cytotoxic effect in K562 cells. As observed with other redox cycling quinones, the protein cleavage is blocked in the presence of N-terminal Hsp90 inhibitors suggesting that the availability or occupancy of nucleotide binding site in the N-terminal pocket of Hsp90 plays a critical role. In addition the survival of cancer cells and their metabolic and redox homeostasis were strongly impaired by the presence of ascorbate. Since these effects were similar to that obtained by ascorbate/menadione and they were blocked by the antioxidant N-acetylcysteine (NAC), it appears that oxidative stress is a major component of this cytotoxicity.

Keywords: Cancer cell death, Hsp90, oxidative stress, protein cleavage, quinones, redox cycling

INTRODUCTION

Hsp90 is a constitutively expressed protein that represents 1-2% of the total protein content of the cell [1]. It is required for the stabilization and activation of numerous proteins referred to as "client proteins". In cancer cells, Hsp90 is expressed 2-10 fold more as compared to their normal counterparts [2]. Thus, by stabilizing and activating diverse client proteins involved in numerous signaling pathways, Hsp90 plays a pivotal role in the acquisition and maintenance of some major capabilities that characterize cancer cells, as nicely described by Hanahan and Weinberg [3]. Upon Hsp90 inhibition its client proteins are subsequently degraded by the proteasome [2]. For this reason, Hsp90 is often referred to as the "cancer chaperone" [4], making it an attractive target for the development of therapeutic inhibitors. By inhibiting Hsp90, several pathways can therefore be targeted with a single inhibitor. This is of importance because a frequent cause of failure of targeted therapy is that the therapies inhibit only one signaling pathway, whereas several may be

dysregulated at the same time in a cancer cell. Since cancer cells are addicted to oncoproteins, the inactivation of a single oncoprotein often leads to the stops of proliferation or death of the cancer cell. This is caused by the fact that cancer cells often inactivate several normal genes while oncogenes are overactivated and perform the functions of several inactivated genes at the same time [5]. In addition, oncoproteins are often expressed as mutant forms, which are more dependent on Hsp90 for their stability than their normal counterparts. Cancer cells are also subjected to more stresses (for example due to acidosis, hypoxia and nutrient deprivation) than normal cells and are consequently more dependent on the activity of the Hsp90 chaperone machinery [6]. Finally, it has been suggested that Hsp90 inhibitors preferentially bind to Hsp90 in cancer cells rather than in normal cells, possibly because Hsp90 would be in an activated complex in cancer cells, having a greater affinity for nucleotides and inhibitors [7].

The understanding of the role of Hsp90 in promoting cellular malignant transformation is mostly derived from studies of Hsp90 inhibitors such as the natural product Geldanamycin [8,9] a benzoquinone ansamycin antibiotic, and the synthetic derivative 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin: 17AAG [10-12] (Fig. 1). Geldanamycin binds

*Address correspondence to these authors at the Vicuña Mackenna 4860, Casilla 306, Santiago, Chile. GFOX 7309, 73 avenue E. Mounier, 1200 Bruxelles, Belgium, Tel: +32-2-7647366, Fax: +32-2-7647359, E-mail: pedro.bucalderon@uclouvain.be and jvalder@ucl.ac

ANEXO B – primeira página do artigo publicado no periódico Molecular Medicine Reports, março 2014, sob título de Substituted 3-acyl-2-phenylamine-1,4-naphthoquinones intercalate into DNA and cause genotoxicity through increased reactive oxygen species generation culminating in cell death.

MOLECULAR MEDICINE REPORTS

Substituted 3-acyl-2-phenylamino-1,4-naphthoquinones intercalate into DNA and cause genotoxicity through the increased generation of reactive oxygen species culminating in cell death

MIRELLE SIFRONI FARIAS¹, CLAUDIUS TRÖGER PICH², MAICON ROBERTO KVICINSKI¹,
NÁDIA CRISTINA FALCÃO BUCKER¹, KARINA BETTEGA FELIPE¹, FÁBIANA OURRIQUE DA SILVA¹,
TÂNIA MARA FISHER GÜNTHER¹, JOÃO FRANCISCO CORREIA¹, DAVID RIOS³, JULIO BENITES³,
JAIME A. VALDERRAMA^{3,4}, PEDRO BUC CALDERÓN^{3,4} and ROZANGELA CURI PEDROSA¹

¹Laboratory of Experimental Biochemistry, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina 88040-900; ²Campus Araranguá, University of Santa Catarina, Araranguá 88900-000, Brazil;

³Faculty of Health Sciences, University of Arturo Prat, Iquique 1100000; ⁴Faculty of Chemistry, Pontificia Católica University of Chile, Santiago 8120000, Chile; ⁵Toxicology and Cancer Biology Research Group, Louvain Drug Research Institute, Université Catholique de Louvain, Brussels 1348, Belgium

Received September 21, 2013; Accepted March 17, 2014

DOI: 10.3892/mmr.2014.2160

Abstract. Naphthoquinones interact with biological systems by generating reactive oxygen species (ROS) that can damage cancer cells. The cytotoxicity and the antitumor activity of 3-acyl-2-phenylamino-1,4-naphthoquinones (DPB1-DPB9) were evaluated in the MCF7 human breast cancer cell line and in male Ehrlich tumor-bearing Balb/c mice. DPB4 was the most cytotoxic derivative against MCF7 cells (EC₅₀ 15 μM) and DPB6 was the least cytotoxic one (EC₅₀ 56 μM). The 1,4-naphthoquinone derivatives were able to cause DNA damage and promote DNA fragmentation as shown by the plasmid DNA cleavage assay (PhiI form). In addition, 1,4-naphthoquinone derivatives possibly interacted with DNA as intercalating agents, which was demonstrated by the changes caused in the fluorescence of the DNA-ethidium bromide complexes. Cell death of MCF7 cells induced by 3-acyl-2-phenylamino-1,4-naphthoquinones was mostly due to apoptosis. The DNA fragmentation and subsequent apoptosis may be correlated to the redox potential of the 1,4-naphthoquinone derivatives that, once present in the cell nucleus, led to the increased generation of ROS. Finally, certain 1,4-naphthoquinone derivatives and particularly DPB4

significantly inhibited the growth of Ehrlich ascites tumors in mice (77%).

Introduction

Cancer is a heterogeneous group of diseases resulting from accumulated genetic changes. Data from the World Health Organization demonstrate that these diseases are the main cause of death in economically developed countries and the second leading cause of death in developing countries (1). Although chemotherapy is currently the most common treatment regimen for the majority of cancers, several chemotherapies exhibit a low therapeutic index, resulting in various side effects (2). For this reason, studies in the field of cancer therapy have led to the development of novel drugs that aim to maximize the effectiveness against cancer, to avoid the side effects and to prevent multidrug resistance (3).

Among numerous natural and synthetic compounds that were investigated for their anticancer potential, compounds containing quinone moieties, including doxorubicin and other anthracyclines, are widely used as efficient anticancer drugs (4). The drugs' main mechanisms of action are thought to involve: i) a direct interaction with DNA; ii) topoisomerase inhibition; and iii) generation of reactive oxygen species (5,6). However, their use is limited by side effects, such as cardiotoxicity (7). Quinones and particularly 1,4-naphthoquinones are abundant in nature and display diverse pharmacological properties, including antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, neurogenic and anticancer activities (8,9). The presence of electron-donating or electron-withdrawing substituents linked to the vinyl double bond of 1,4-naphthoquinones modulates the generation of quinone radical anion species. The redox properties of the radical anion species enable these compounds to undergo a catalytic cycle and in the presence of molecular oxygen they generate reactive oxygen

Correspondence to: Dr Rozangela Curi Pedrosa, Laboratory of Experimental Biochemistry, Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, Santa Catarina 88040-900, Brazil
E-mail: rcuri@ccb.ufsc.br

Key words: 3-acyl-2-phenylamino-1,4-naphthoquinones, reactive oxygen species generation, DNA fragmentation, cytotoxicity, apoptosis, anticancer effect