



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

Fabiana Ourique da Silva

Efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo* de fenilaminonaftoquinonas isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio e estudo da interação entre as proteínas MNT e CCDC6 sobre a proliferação celular

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Prof^a. Orientadora: Dra. Rozangela Curi Pedrosa

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ourique da Silva, Fabiana

Efeito antitumoral in vitro e in vivo de
fenilaminonaftoquinonas isoladas ou em associação ao
ascorbato de sódio e estudo da interação entre as proteínas
MNT e CCDC6 sobre a proliferação celular / Fabiana Ourique
da Silva ; orientadora, Rozangela Curi Pedrosa -
Florianópolis, SC, 2016.

233 p.

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

Inclui referências

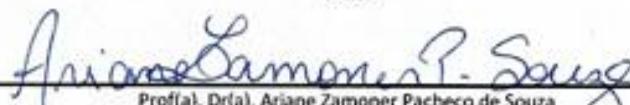
1. Bioquímica. 2. fenilaminonaftoquinonas. 3. ascorbato
de sódio. 4. proteínas MNT e CCDC6. 5. câncer. I. Curi
Pedrosa, Rozangela. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

"Efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo* de fenilaminonaftoquinonas isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio e estudo da interação entre as proteínas MNT e CCDC6 sobre a proliferação celular"

Por

Fabiana Ourique da Silva

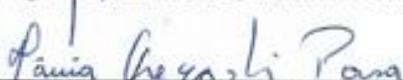
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (17/PPGBQA/2016) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

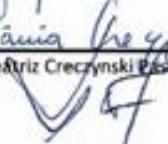

Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:

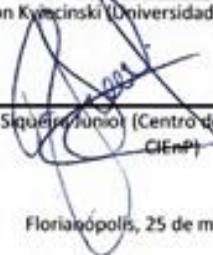

Dr(a) Rozangela Curi Pedrosa (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)


Dr(a) Fátima Regina Tereza Barreto Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr(a) Tania Beatriz Creczynski Pasa (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr(a) Danilo Wilhelm Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr(a) Maicon Kwiecinski (Universidade do Sul de Santa Catarina)


Dr(a) Jarbas Mota Siqueira Junior (Centro de Inovação e Ensaios Pré-clínicos - CIEnP)

Florianópolis, 25 de maio de 2016.

*À minha família, em especial à minha dinda
Jacira Ourique (in memorian)...*

“Todo lo que no tiene un objetivo por alcanzar, un resultado por conquistar, una enigma por resolver, un misterio por penetrar, no me interesa.”

Pablo Picasso

AGRADECIMENTOS

Passaram-se alguns anos, alguns percalços e alguns desafios até a obtenção deste título. No entanto, este caminho só pode ser trilhado com a ajuda, direta ou indireta, e a confiança de algumas pessoas e instituições às quais não poderia deixar de agradecer.

- À Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa, minha orientadora. Muito obrigada pela oportunidade de ingressar no seu grupo de pesquisa há quatro anos e pela confiança em mim depositada para desenvolver este trabalho. Muito obrigada por dar-me a oportunidade de conviver com os seus ensinamentos, com as suas lições e com as suas virtudes, tanto no âmbito profissional quanto pessoal. Muito obrigada por tornar-me Doutora!
- Ao Prof. Dr. Javier León, meu orientador durante o doutorado sanduíche em Santander, Espanha. Muito obrigada pelos desafios a mim impostos durante o período de trabalho em seu laboratório. Desde todo o aprendizado em biologia molecular, até o “*la meeting... in English, please*”. Muito obrigada por me ensinar que “um mês de biblioteca bem feita pode poupar seis meses de bancada”. Muito obrigada por toda a gentileza, paciência e generosidade dedicadas a mim durante esse período de convívio. Foi uma honra, durante um ano, conviver com um grande ser humano, mestre e pesquisador como você.
- Aproveito para agradecer a todos os membros do Grupo de Biologia Molecular do Câncer, coordenado pelo professor Javier. *Chicas*, Ester, Judit, Lorena, Lucía, Maria, Rosa, Profa. Dra Dolores Delgado e, sobretudo à minha “co-diretora” de tese na Espanha, MariCar, muito obrigada por tudo desde o meu primeiro dia no laboratório. Muito obrigada por tornarem o meu período na Espanha leve e alegre. Muito obrigada pela amizade que construímos!
- A todos do Instituto de Biomedicina e Biotecnologia de Cantabria (IBBTEC), muito obrigada pela atenção e receptividade.

- Ao Prof. Dr. Maicon Roberto Kwiecinski, meu colega, parceiro na ciência e, sobretudo, meu amigo. *Mo bem*, tu tens uma grande contribuição nesta minha caminhada. A tua ajuda, disponibilidade e atenção fizeram a diferença nestes últimos quatro anos. Muito obrigada por tudo e que a nossa amizade continue Qualis A1.
- Ao Dr. Pedro Buc Calderon e Dr. Júlio Benites, pela parceria neste trabalho.
- A todos os colegas e amigos do LABIOEX que me acompanharam durante o doutorado: João, Karina, Luiza, Mirelle, Nádia e Valdelúcia, muito obrigada pela ajuda sempre que precisei. Aos meus queridos alunos de iniciação científica, Morgana e Guilherme, meu agradecimento mais que especial... Vocês foram maravilhosos! Esta tese é nossa! Ao meu “culega” e amigo Bene... muito obrigada por estar sempre comigo (o que seria de mim sem ti nos primeiros meses em Santander?). Muito obrigada pelo carinho e preocupação de sempre. A nossa amizade é intercontinental e que assim continue por toda a vida.
- Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFSC, por contribuírem na minha formação.
- Aos atuais funcionários da Secretaria Integrada de Pós-Graduação do CCB, pela atenção e presteza sempre que necessárias.
- Aos servidores do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), pelo auxílio e atenção.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos auxílios e bolsas concedidas.

No entanto, estes agradecimentos não estariam completos sem mencionar aqueles que indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho e são indispensáveis na minha vida...

- Aos meus pais, Fátima e Floriano, obrigada por me ensinarem que desafios são para serem enfrentados e sonhos realizados. E que para isso são necessárias fé, perseverança, paciência e disciplina. Obrigada pelo amor, entendimento, incentivo e motivação nos momentos difíceis que me fizeram calar. À minha irmã Fernanda, pelo exemplo de garra, força e fé, principalmente nestes últimos meses. Nanda, Vinícius, Ana Carolina, Valentina, Helena, muito obrigada pelo carinho e amor. Tias Ci (Anna) e Mara, muito obrigada pelo carinho e atenção de sempre. Família, vocês são o meu porto seguro.
- À Juliana Fabris, minha amiga-irmã, de Santa Maria, para toda uma vida. Obrigada por estar sempre presente, mesmo que distante. Obrigada pelo apoio, ajuda e orientação em todas as minhas decisões. Este mundo seria um lugar muito melhor de se viver se todas as pessoas tivessem uma amiga como você.
- Às minhas amigas e aos meus amigos de perto e de longe, agradeço simplesmente pelo fato de fazerem parte da minha vida e por tornarem a minha caminhada mais leve. Obrigada por fazerem dos nossos encontros e risadas uma fonte inesgotável de energia.
- E por fim, o meu mais especial agradecimento ao principal co-autor desta obra... **DEUS**, “Inteligência suprema. Causa primária de todas as coisas”. Muito obrigada!

Fabiana Curique da Silva

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Metabolismo das espécies reativas de oxigênio e principais moléculas que afetam o balanço redox intracelular.....	36
Figura 2 -	Reações de Fenton e Haber-Weiss.....	37
Figura 3 -	Biossíntese de glutathiona reduzida (GSH).....	39
Figura 4 -	Material genético humano.....	43
Figura 5 -	Importância biológica da fosforilação da histona H2AX.....	44
Figura 6 -	Regulação do p53 pela MDM2.....	48
Figura 7 -	Proteínas envolvidas no controle do ciclo celular.....	50
Figura 8 -	Via da PI3K/pAkt/mTOR.....	52
Figura 9 -	Efeito Warburg.....	55
Figura 10 -	Possíveis vias de atuação da PARP nos processos de morte celular.....	61
Figura 11 -	Formas redox do ácido ascórbico.....	67
Figura 12 -	Proposta para o mecanismo de transporte e acúmulo de ascorbato em células tumorais.....	69
Figura 13 -	Ciclo redox induzido por quinonas.....	72
Figura 14 -	O ascorbato de sódio ativa o ciclo redox da quinona menadiona.....	74
Figura 15 -	Estrutura química das quinonas Q7, Q9 e juglona.....	76
Figura 16 -	Reação de síntese das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9.....	81
Figura 17 -	Índice de dano ao DNA considerado para o teste do Cometa.....	85
Figura 18 -	Células viáveis, em apoptose ou em necrose.....	96
Figura 19 -	Efeitos intercalantes das naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio sobre o CT-DNA em comparação à doxorubicina.....	98
Figura 20 -	Clivagem oxidativa do DNA ocasionada pelas espécies reativas de oxigênio geradas durante o ciclo redox das naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 associadas ao ascorbato de sódio.....	100

Figura 21 -	Conteúdo intracelular de EROs em células MCF-7 determinado após 2 h de tratamento com as naftoquinonas (10 μ M) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (1 mM).....	102
Figura 22 -	Índice de dano ao DNA determinado pelo teste Cometa, em células MCF-7 tratadas com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio.....	105
Figura 23 -	Efeito das naftoquinonas isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio sobre a fosforilação da histona H2AX em células MCF-7.....	106
Figura 24 -	Efeito das naftoquinonas isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio sobre a integridade da proteína PARP em células MCF-7.....	107
Figura 25 -	Efeito antiproliferativo da juglona, Q7 e Q9 associadas ou não ao ascorbato de sódio em células MCF-7, após 24 h de tratamento.....	108
Figura 26 -	Efeito da juglona, Q7 e Q9 associadas ou não ao ascorbato de sódio sobre a fosforilação da Akt.....	109
Figura 27 -	Inibição do crescimento tumoral em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich tratados com juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) em associação ou não ao ascorbato de sódio (100 mg/kg).....	111
Figura 28 -	Tempo de sobrevida dos animais submetidos aos tratamentos com juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) em associação ou não ao ascorbato de sódio (100 mg/kg).....	113
Figura 29 -	Peroxidação lipídica, carbonilação proteica e atividade da glutatona reduzida em células do tumor ascítico de Ehrlich coletadas de animais tratados com juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) associadas ou não ao ascorbato (100 mg/kg).....	115
Figura 30 -	Enzimas de defesa antioxidante em células do TAE, após os animais serem tratados com a juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) associadas ou não ao ascorbato de sódio (100 mg/kg).....	118

Figura 31 - Fragmentação do DNA em células do tumor ascítico de Ehrlich (A) e fosforilação da proteína γ H2AX (B) provocados pelos tratamentos com juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) em associação ou não ao ascorbato de sódio (100 mg/kg) <i>in vivo</i>	121
Figura 32 - Inibição da fosforilação da proteína Akt em células de TAE após o tratamento com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (100 mg/kg).....	123
Figura 33 - Influência dos tratamentos com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) isoladas ou associadas ao ascorbato de sódio (1 mg/kg) nas diferentes fases do ciclo celular em células do tumor ascítico de Ehrlich.....	125
Figura 34 - Efeito dos tratamentos com as naftoquinonas (1 mg/kg) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (100 mg/kg) sobre proteínas envolvidas na progressão e bloqueio do ciclo celular <i>in vivo</i>	127
Figura 35 - Avaliação da presença do fator indutor de hipóxia-1 α (HIF-1 α) e do transportador GLUT1 em células do TAE após o tratamento com juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (100 mg/kg).....	128
Figura 36 - Influência dos tratamentos com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio sobre a captação de glicose em células do tumor ascítico de Ehrlich.....	130
Figura 37 - Tipo de morte celular induzido <i>in vivo</i> pelos tratamentos com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (100 mg/kg).....	132
Figura 38 - Efeito dos tratamentos com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (100 mg/kg) sobre proteínas da via intrínseca da apoptose <i>in vivo</i>	133

Figura 39 - Hipótese para o mecanismo de ação antitumoral <i>in vivo</i> das nafotquinonas juglona e Q7 em associação ao ascorbato de sódio.....	136
Figura 40 - Proteína MNT humana.....	189
Figura 41 - Estruturas de MYC-MAX (esquerda) e MXD1-MAX (direita) ligadas em sequências E-box (5'-CACGTC-3') do DNA.....	190
Figura 42 - Estrutura esquemática da proteína CCDC6 e sua interação com o proto-oncogene RET.....	192
Figura 43 - Desenho esquemático de mutantes de MNT utilizados nesta tese.....	201
Figura 44 - Co-imunoprecipitação de MNT e CCDC6 em células HEK293T.....	209
Figura 45 - Reconhecimento de CCDC6 exógeno pelo anticorpo anti-Myc (9E10).....	211
Figura 46 - Confirmação da presença de HA tag nos diferentes mutantes de MNT.....	211
Figura 47 - Novos mutantes de MNT construídos para esta tese e obtidos por PCR (<i>polymerase chain reaction</i>).....	212
Figura 48 - Confirmação, por imunofluorescência, da expressão das proteínas oriundas dos mutantes de MNT (MNT Δ Nt1-HA, MNT Δ Nt2-HA e Δ Ct2-HA) em células HeLa, usando MNT WT-HA como controle positivo.....	213
Figura 49 - Presença das proteínas expressas pelos novos mutantes de MNT (MNT Δ Nt1-HA, MNT Δ Nt2-HA e MNT Δ Ct2-HA) em células HEK293T.....	216
Figura 50 - Efeito de MNT e CCDC6 sobre a proliferação de células TPC1 e HeLa shCCDC6.....	218
Figura 51 - Efeito do silenciamento de MNT e expressão de CCDC6 sobre a proliferação de células TPC1 e HeLa shCCDC6.....	220
Figura 52 - Níveis de GSH em células TPC1 após o silenciamento de MNT e superexpressão de CCDC6.....	223

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Anticorpos primários e secundários utilizados na primeira parte desta tese.....	80
Tabela 2 -	Citotoxicidade da juglona, Q7 e Q9 isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio sobre células MCF-7 após incubação de 24 h com os respectivos tratamentos.....	101
Tabela 3 -	Linhagens celulares utilizadas na segunda parte desta tese.....	195
Tabela 4 -	Plasmídeos utilizados neste trabalho.....	199
Tabela 5 -	Anticorpos primários e secundários utilizados nos experimentos da segunda parte desta tese....	204

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
AIF	Fator indutor de apoptose
APAF-1	Fator ativador de proteases pró-apoptóticas
APIQ	Aminopirimidoisouquinolinoquinona
Asc	Ascorbato
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
bHLHLZip	<i>Basic-helix-loop-helix-leucine-zipper</i>
BSA	Albumina de soro bovino
BSO	Butionina sulfoximina
BTZ	Bortezomibe
C4	Carbono 4
CAT	Catalase
CCDC6	<i>Coiled Coil Domain Containing 6</i>
¹⁴C-DG	Deoxiglicose marcada com carbono 14
CDK	Cinase dependente de ciclina
CDKs	Cinases dependentes de ciclinas
CDKI	Inibidor de cinase dependente de ciclina
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CI₅₀	Concentração inibitória 50%
CL₅₀	Concentração letal para metade dos indivíduos
CT-DNA	<i>Calf thymus DNA</i>
DCFH-DA	2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
DHA	Ácido deidroascórbico
DMEM	Meio de cultura modificado de Eagle
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA-PK	Proteína cinase dependente de DNA
DNPB	2,4-dinitrofenilhidrazina
DSB	<i>Double-strand breaks</i>
DTNB	5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico)
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
EtdBr	Brometo de etídio
EV	<i>Empty vector</i>
¹⁸F-FDG	¹⁸ F-2-fluoro-2-deoxi-D-glicose
FADD	Proteína adaptadora com domínio de morte associada à FAS
FBS	Soro fetal bovino

FBXW7	<i>F-Box and WD repeat domain containing 7</i> ou <i>E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>
Fe	Íon ferro
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GLUT	Transportador de glicose
GO	Glutaciona oxidase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina)
GSSG	Glutaciona dissulfeto
GST	Glutaciona S-transferase
HBSS	Solução salina tampão de Hank
HDAC	Histona deacetilase
HIF	Fator indutor de hipóxia
HIF-1α	Fator indutor de hipóxia – 1 alfa
HIF-1β	Fator indutor de hipóxia – 1 beta
4-HNE	4-hidroxinonenal
HO\cdot	Radical hidroxila
HO$_2\cdot$	Radical hidroperoxila
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICT	Inibição do crescimento do tumor
IgG	Imunoglobulina
JNK	Proteína cinase ativada por estresse
Jug	Juglona
LB	<i>Luria broth</i>
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MCF-7	Células de adenocarcinoma de mama
MDA	Malondialdeído
MDM2	<i>Murine Double minute-2</i>
MDR	Multiresistência à quimioterapia
Mito ETC	Cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria
Mn	Forma reduzida dos metais de transição
M$^{n+1}$	Forma oxidada dos metais de transição
MNT	<i>Max network transcriptional repressor</i>
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)2,5-difenil-brometo de tetrazólio
NADPH	Dinucleotido de nicotinamida adenina fosfato reduzido
NaOH	Hidróxido de sódio
NOX	Complexo NADPH-oxidase
NP40	<i>Nonidet-P40</i> or <i>octyl phenoxy polyethoxyethanol</i>
O$_2\cdot^-$	Ânion superóxido

8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PAH2	<i>Paired amphipathic helix 2</i>
pb	Pares de base
PBS	Salina tamponada de fosfato
PC	Proteína carbonilada
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDK1	Fosfatidilinositol-3dependente de cinase 1
PEI	Poliétilenimina
PET	Tomografia por emissão de prótons
PHDs	Prolina hidroxilases
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5 bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato
PHD2	Enzima prolil hidroxilase 2
PKB	Proteína cinase B
PKC	Proteína cinase C
PP1	Proteína fosfatase 1
PP4C	Proteína fosfatase 4C
pVHL	Proteína supressora de tumor Von-Hippel-Lindau
Q7	Fenilaminonaftoquinona-7
Q9	Fenilaminonaftoquinona-9
RTECS	<i>Registry of Toxic Effects of Chemical Substances</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SH	Grupo sulfidril
SID	<i>Sin 3-interacting</i>
SOD	Superóxido dismutase
SVCT	Transportadores de vitamina C dependentes de sódio
T24	Células de carcinoma de bexiga
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
Tampão TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
t-BuOOH	Terc-butilhidroperóxido
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Tris-glicina
Thr	Treonina
TNB	Ânion tiolato
TNF	Fator de necrose tumoral

TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral 1
USP7	<i>Ubiquitin-Specific-Processing Protease 7</i>
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
WT	<i>Wild type</i>

SUMÁRIO

PARTE I

1.INTRODUÇÃO	33
1.1 CÂNCER: DEFINIÇÃO GERAL E EPIDEMIOLOGIA.....	33
1.2 BIOLOGIA CELULAR: IMPORTANTES ALVOS TERAPÊUTICOS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER.....	35
1.2.1 Estresse oxidativo intracelular exacerbado e alterações nas defesas antioxidantes	35
1.2.1.1 Peroxidação lipídica.....	37
1.2.1.2 Proteína carbonilada.....	38
1.2.1.3 Glutathiona reduzida (GSH).....	39
1.2.1.4 Enzimas antioxidantes.....	41
1.2.2 DNA como alvo terapêutico para o câncer	42
1.2.3 Ciclo celular	45
1.2.4 Vias de proliferação celular	50
1.2.5 Metabolismo celular	54
1.2.6 Morte celular: Apoptose e Necrose	58
1.3 TERAPIA DO CÂNCER.....	62
1.3.1 Moléculas capazes de induzir o estresse oxidativo intracelular e dano ao DNA	62
1.3.2 Associação quinonas e ascorbato de sódio na terapia antitumoral	66
1.3.2.1 Ascorbato de sódio.....	66
1.3.2.2 Quinonas.....	70
1.3.2.3 Associação quinonas e ascorbato de sódio como terapia eficaz para o tratamento do câncer.....	73
2. JUSTIFICATIVA DA PROPOSTA	77
3. OBJETIVOS	78
3.1 Objetivo geral.....	78
3.2 Objetivos específicos.....	78
4. MATERIAIS E MÉTODOS	79
4.1 Reagentes químicos e anticorpos.....	79
4.2 Síntese das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9.....	80
4.3 Avaliação dos danos diretos das naftoquinonas isoladas ou associadas ao ascorbato de sódio sobre o CT-DNA.....	81
4.3.1 Intercalação ao CT-DNA.....	81
4.3.2 Clivagem oxidativa do CT-DNA.....	82

4.4 Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	82
4.4.1 Cultura de células MCF-7.....	82
4.4.2 Avaliação da viabilidade celular.....	83
4.4.3 Medida do conteúdo intracelular de EROs.....	83
4.4.4 Índice de fragmentação do DNA – Teste Cometa.....	84
4.4.5 Ensaio da formação de colônias.....	85
4.4.6 Ensaio de imunoeletroforese.....	86
4.5 Ensaio biológicos <i>in vivo</i>	87
4.5.1 Animais.....	87
4.5.2 Modelo do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) – Protocolo Experimental.....	87
4.5.3 Inibição do crescimento tumoral e tempo de sobrevivência dos animais.....	88
4.5.4 Marcadores de estresse oxidativo.....	89
4.5.4.1 Peroxidação lipídica.....	89
4.5.4.2 Proteína carbonilada.....	90
4.5.4.3 Conteúdo de GSH.....	90
4.5.4.4 Avaliação da enzima superóxido dismutase (SOD).....	91
4.5.4.5 Avaliação da atividade da enzima catalase (CAT).....	91
4.5.4.6 Enzima glutatona peroxidase (GPx).....	92
4.5.4.7 Enzima glutatona redutase (GR).....	92
4.5.4.8 Glutatona S-transferase.....	93
4.5.5 Índice de fragmentação do DNA – Teste Cometa.....	93
4.5.6 Ciclo celular.....	94
4.5.7 Captação de glicose.....	95
4.5.8 Morte celular.....	95
4.5.9 Ensaio de imunoeletroforese.....	96
4.6 Análise estatística.....	97
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
5.1 Danos diretos das naftoquinonas isoladas ou associadas ao ascorbato de sódio sobre o CT-DNA.....	97
5.1.1 Intercalação ao DNA.....	97
5.1.2 Clivagem oxidativa.....	99
5.2 Efeitos dos tratamentos das naftoquinonas isoladas ou em associação ao ascorbato sobre células MCF-7.....	101
5.2.1 Viabilidade celular.....	101
5.2.2 Conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio..	102
5.2.3 Danos diretos ao DNA.....	104
5.2.4 Inibição da proliferação celular.....	107

5.3 Efeitos dos tratamentos das naftoquinonas isoladas ou em associação ao ascorbato <i>in vivo</i>.....	110
5.3.1 Inibição do crescimento tumoral e tempo de sobrevivência dos animais.....	110
5.3.2 Marcadores de estresse oxidativo.....	114
5.3.3 Dano ao DNA e inibição da via de proliferação celular..	120
5.3.4 Ciclo celular.....	124
5.3.5 Alteração no ambiente de hipóxia e captação de glicose	127
5.3.6 Morte celular.....	131
6. CONCLUSÕES.....	137
7. PERSPECTIVAS.....	139
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	140
PARTE II	
1.INTRODUÇÃO.....	189
1.1 MNT: funções biológicas e câncer.....	189
1.2 CCDC6: funções biológicas e câncer.....	191
2. OBJETIVOS.....	194
2.1 Objetivo geral.....	194
2.2 Objetivos específicos.....	194
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	194
3.1 Cultivos celulares.....	194
3.2 Transformação de bactérias e purificação do DNA plasmidial.....	195
3.3 Clonagem do DNA de novos mutantes de MNT.....	197
3.4 Transfecção.....	199
3.5 Imunoelctroforese de proteínas.....	202
3.6 Imunoprecipitação de proteínas.....	205
3.7 Ensaio de proliferação celular.....	205
3.8 Análise de imunofluorescência.....	206
3.9 Conteúdo de GSH.....	207
3.10 Análise dos dados.....	208
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	208
4.1 Interação entre MNT e CCDC6.....	208
4.2 Construção de novos mutantes de MNT e confirmação da expressão das respectivas proteínas.....	212
4.3 Influência da interação entre MNT e CCDC6 sobre a proliferação celular.....	217
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	224
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	225
ANEXO 1.....	231
ANEXO 2.....	233

PARTE I

**EFEITO ANTITUMORAL DE FENILAMINONAFTOQUINONAS
JUGLONA, FENILAMINONAFTOQUINONA-7 E
FENILAMINONAFTOQUINONA-9 EM ASSOCIAÇÃO AO
ASCORBATO DE SÓDIO *in vitro* E *in vivo***

Desenvolvida sob a orientação da Dra. Rozangela Curi Pedrosa, no Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

RESUMO

Introdução. Evidências indicam um promissor efeito antitumoral das quinonas juglona, fenilaminonaftoquinona-7 (Q7) e fenilaminonaftoquinona-9 (Q9), especialmente quando associadas ao ascorbato. **Objetivo.** Dar continuidade aos estudos sobre o efeito antitumoral das naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 em associação ao ascorbato de sódio, bem como avaliar a melhor associação para o tratamento do câncer a partir dos efeitos obtidos *in vitro* e *in vivo*. **Metodologia.** Foram analisados os efeitos das quinonas juglona, Q7 e Q9 associadas ou não ao ascorbato de sódio sobre o CT-DNA (*Calf Thymus-DNA*). Em células MCF-7 (carcinoma de mama) foram avaliados a viabilidade celular, os níveis de EROs intracelular, os danos ao DNA e a proliferação celular. Proteínas oriundas dos lisados de células MCF-7 foram utilizados para os ensaios de imunoelektroforese para verificar a integridade da proteína poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), gama-H2AX (γ H2AX) e pAkt. A atividade antitumoral *in vivo* das quinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio foi inicialmente analisada através de parâmetros de sobrevida e crescimento tumoral de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich. Posteriormente, amostras do tumor foram coletadas e utilizadas para análise de marcadores de estresse oxidativo como: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteína carbonilada, glutatona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR) e glutatona-S-transferase (GST). Ainda em amostras do tumor ascítico de Ehrlich foram avaliados danos ao DNA, parada do ciclo celular, influência na captação de glicose e tipo de morte celular induzida pelos tratamentos. As mesmas amostras foram utilizadas para a análise de imunoelektroforese de proteínas envolvidas no dano ao DNA e proliferação celular (γ H2AX e pAkt, respectivamente), na progressão do ciclo celular (p53, p16 e ciclina A), na captação de glicose (HIF-1 α e GLUT1) e proteínas envolvidas na sinalização da morte celular (PARP, Bax, Bcl-xL). **Resultados.** As quinonas, quando associadas ao ascorbato, causaram um aumento na intercalação e clivagem oxidativa do CT-DNA. Em células MCF-7, a associação com ascorbato diminuiu significativamente a viabilidade celular. As associações juglona/ascorbato e, principalmente Q7/ascorbato, aumentaram os níveis de EROs intracelulares e os danos ao DNA. As três associações testadas causaram diminuição no número de colônias, porém, juglona/ascorbato e Q7/ascorbato foram capazes de inibir a proteína Akt fosforilada (pAkt). Os resultados *in vitro* foram

reproduzidos *in vivo*. Juglona/ascorbato e Q7/ascorbato inibiram significativamente o desenvolvimento do tumor e aumentaram o tempo de sobrevivência dos animais. Os marcadores de estresse oxidativo foram alterados, indicando uma indução na geração de EROs pelos tratamentos, aumentando assim a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, danificando o DNA das células do tumor ascítico de Ehrlich e promovendo também, a parada do ciclo celular em G1/S, redução da captação de glicose e morte celular por apoptose. **Conclusão.** Os resultados apresentados mostraram que o ascorbato de sódio potencializou o efeito antitumoral das quinonas juglona e, principalmente da Q7, também *in vivo*, evidenciando que estas associações são promissoras agentes para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: 1,4-naftoquinonas, ascorbato de sódio, tratamento antitumoral, estresse oxidativo, dano ao DNA

ABSTRACT

Introduction. Evidences point to the promising antitumor effect of quinones juglone, phenylaminonaphthoquinone-7 (Q7) and phenylaminonaphthoquinone-9 (Q9), especially when associated to ascorbate. **Objective.** To continue the studies on the antitumor effect of naphthoquinones juglone, Q7 and Q9 associated with sodium ascorbate, as well as to evaluate the best association for cancer treatment from the effects obtained *in vivo* and *in vitro*. **Methodology.** The effects of quinones juglone, Q7 and Q9 associated or not to sodium ascorbate on *Calf Thymus-DNA* were analyzed. Cell viability, levels of intracellular ROS, damages on DNA and cell proliferation were evaluated in MCF-7 cells (breast carcinoma). Proteins from MCF-7 cell lysate were used in immunoblotting assays to check the integrity of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), gamma-H2AX (γ H2AX) and pAkt. The *in vivo* antitumor activity of quinones associated or not with sodium ascorbate was firstly analyzed by means of survival parameters and tumor growth of mice carrying Ehrlich ascitic tumor. After that, samples of the tumor were collected and analyzed for oxidative stress markers such as: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), carbonylation of protein, reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione-S-transferase (GST). Also, of Ehrlich ascitic tumor, DNA damages, cellular cycle arrest, influence in glucose capture and type of cell death induced by the treatments were evaluated. The same samples were used in immunoblotting assays of proteins involved in damage to DNA and cell proliferation (γ H2AX and pAkt, respectively), cell cycle progression (p53, p16 and cyclin A) and glucose capture (HIF-1 α and GLUT1) and proteins involved in cell death signaling (PARP, Bax, Bcl-xL). **Results.** When associated to ascorbate, quinones promoted an increase in interleaving and oxidative cleavage of CT-DNA. In MCF-7 cells, the association with ascorbate declined significantly cell viability. The associations juglone/ascorbate and, mainly Q7/ascorbate increased levels of intracellular EROs and damage to DNA. The three assessed associations promoted the decrease in the number of colonies, however, juglone/ascorbate and Q7/ascorbate were able to inhibit the protein pAkt. The *in vitro* results were *in vivo* reproduced. Juglone/ascorbate and Q7/ascorbate significantly inhibited the growth of the tumor and increased survival time of the animals. The oxidative stress markers were altered pointing to an induction in the generation of ROS by these treatments, thereby increasing lipid

peroxidation and protein carbonylation, damaging DNA of cells of Ehrlich ascitic tumor also promoting, cellular cycle arrest in G1/S, reduction of glucose capture and cellular death by apoptosis.

Conclusion. The results presented here showed that the sodium ascorbate potentialized the antitumor effect of juglone, especially Q7, also *in vivo*, evidencing that those associations are promising agents for cancer treatment.

Keywords: 1,4-naphthoquinones, sodium ascorbate, antitumor treatment, oxidative stress, DNA damage

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER: CONCEITOS E EPIDEMIOLOGIA

O câncer é uma doença caracterizada basicamente pela desregulação do ciclo celular, que resulta em perda progressiva dos processos de diferenciação e falhas nos mecanismos de morte celular, culminando em proliferação exacerbada (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Mutações genéticas ou adquiridas ao longo da vida, as quais resultam em perda do controle dos mecanismos homeostáticos que regulam a proliferação e morte celular (HAHN; WEINBERG, 2002), figuram entre os principais mecanismos bioquímicos envolvidos na evolução de uma célula normal em célula tumoral. Essas mutações ocorrem em genes classificados como proto-oncogenes, oncogenes e genes supressores tumorais. Dentre os principais genes mutados em células tumorais citam-se os genes que codificam as proteínas p53, p16, Ras, Myc, família Bcl-2 e ciclinas (WANG; HU, 2012; VAQUÉ et al., 2008; WU et al., 2003). Recentemente, rearranjos moleculares no gene *CCDC6* (*Coiled Coil Domain Containing 6*), têm sido relacionados à proliferação celular e resistência à apoptose em células tumorais (LEONE et al., 2015; CELETTI et al., 2004).

Os proto-oncogenes, em princípio, são inativos em células normais. Porém, quando ativados, estes se transformam em oncogenes, sendo assim responsáveis pela transformação das células normais em células tumorais. As células transformadas podem desprender-se do tumor migrando para outros órgãos ocasionando metástases. Sendo assim, pode-se conceituar câncer como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas e a possível proliferação e invasão de outros tecidos (INCA, 2014).

Do ponto de vista bioquímico, além da resistência à apoptose, as células tumorais têm algumas características notáveis, tais como ativação da angiogênese, capacidade invasiva (HANAHAN; WEIBERG, 2000), altas taxas de glicólise (VERRAX et al., 2009) e baixa atividade de enzimas antioxidantes (VERRAX et al., 2009; VERRAX et al., 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda causa de óbitos no mundo. Estimativas do projeto Globocan, da Agência Internacional para a pesquisa em Câncer (*IARC – International Agency for Research on Cancer*), pertencente à OMS, houve em 2012, em todo o mundo, 14,1 milhões de novos casos de câncer, sendo que destes 8,2 milhões vieram a óbito no mesmo ano (OMS, 2014). Dados

desse mesmo estudo estimam que em 2030, o número total global de novos casos de câncer chegue a 27 milhões e 13,2 milhões de mortes em decorrência da doença.

No Brasil, nos últimos anos, vem ocorrendo mudanças no perfil demográfico do país, em decorrência do processo de urbanização, industrialização e dos avanços da ciência e tecnologia. Une-se a esse novo perfil, novos estilos de vida, a exposição da população a fatores de risco e o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas como o câncer (INCA, 2014).

De acordo com dados do INCA (2014), no Brasil, a estimativa para o ano de 2014, válida para 2015, foi de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer, reforçando a ocorrência da doença como um problema de saúde pública. Os tipos mais incidentes, o câncer de pele do tipo não melanoma como o de maior prevalência na população brasileira (182 mil novos casos), tumores de próstata (~ 69 mil novos casos), mama feminina (~ 57 mil novos casos), cólon e reto (~ 33 mil novos casos), pulmão (~ 27 mil novos casos), estômago (~ 20 mil novos casos) e colo do útero (~ 15 mil novos casos). Do total, ~ 204 mil casos de câncer são para o sexo masculino e ~ 190 mil casos são para o sexo feminino.

Apesar dos grandes avanços das ciências biológicas no último século, o câncer continua configurando como um grande desafio para a comunidade científica (JEMAL et al., 2011), uma vez que o uso da terapia convencional (quimioterapia e radioterapia) é limitado devido aos seus graves efeitos adversos e a multirresistência celular aos quimioterápicos (OCTAVIA et al. 2012). Por isso, é imperativa a busca por novas estratégias terapêuticas com maior seletividade para as células tumorais e menor toxicidade para as células normais, especialmente aquelas terapias que levam em consideração as características bioquímicas e moleculares de uma célula tumoral, conforme descrito por Hanahan e Weinberg (2011).

Neste contexto, o presente trabalho buscou dar continuidade às pesquisas realizadas até o momento pelo Laboratório de Bioquímica Experimental – LABIOEX/UFSC em parceria com o *Toxicology and Cancer Biology Research Group* – GTOX da Université Catholique de Louvain (Bélgica), com fenilaminonaftoquinonas isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio, visando uma possível triagem dos compostos e associações com atividade antitumoral mais promissora.

1.2 BIOLOGIA CELULAR: IMPORTANTES ALVOS MOLECULARES PARA A TERAPIA DO CÂNCER

1.2.1 Estresse oxidativo intracelular exacerbado e alterações nas defesas antioxidantes

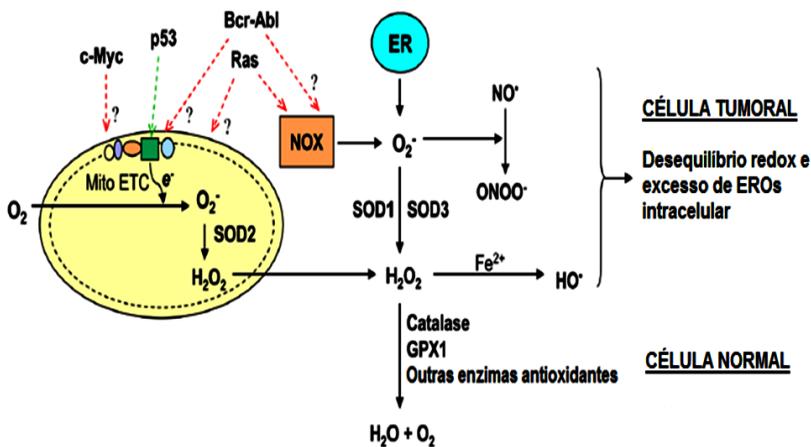
As células cancerígenas apresentam um *status* redox anormal associado a um aumento basal dos níveis de EROs. Tal fato está relacionado a um possível defeito mitocondrial (VERRAX et al., 2011) e frequentes alterações nos sistemas antioxidantes como diminuição da expressão e atividade de enzimas antioxidantes, tais como CAT e SOD (SZATROWSKI; NATHAN, 1991; CULLEN; MITROS; OBERLEY, 2003). Também, baixos níveis de glutathiona peroxidase (GPx) foram observados em cultura de células tumorais (VERRAX et al., 2009). Estes fatores associados estimulam a proliferação celular e promovem instabilidade genética (WONDRAK, 2009; VAFA et al., 2002).

Evidências crescentes sugerem que as células tumorais apresentam um aumento do estresse oxidativo intrínseco devido a estímulos oncogênicos, aumento da atividade metabólica e o mau funcionamento mitocondrial. Os principais locais de produção de EROs são a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (Mito ETC), o sistema retículo endoplasmático e o complexo NADPH-oxidase (NOX). Portanto, a exacerbada geração de EROs nas células tumorais serve como fonte endógena de agentes que causam o mau funcionamento das mitocôndrias e danificam biomoléculas como o DNA ocasionando uma instabilidade genética (PELICANO; CARNEY; HUANG, 2004).

Conforme descrito por Lu e colaboradores (2007), as EROs são geradas a partir do metabolismo celular oxidativo, no qual ocorre a redução incompleta do oxigênio molecular (O_2) em água (H_2O). A redução deste elemento é um dos principais mecanismos para a geração de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), na chamada reação de iniciação de EROs. O ânion superóxido é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima SOD, sendo que na presença de metais de transição o H_2O_2 pode gerar radical hidroxil (HO^{\cdot}), via reação de Fenton. Devido a uma meia-vida extremamente curta ($\sim 10^{-9}$ s) e distância de difusão limitada, os radicais hidroxil causam danos celulares locais. No entanto, o H_2O_2 , por possuir uma meia-vida longa e elevada difusibilidade, pode funcionar como um segundo mensageiro em vias de transdução de sinal, e também causar danos teciduais locais bem como danos ao DNA nuclear.

Sob condições fisiológicas, as EROs são mantidas em níveis apropriados devido ao funcionamento de defesas antioxidantes. Todavia, nas células tumorais há um desequilíbrio no sistema antioxidante, o que propicia o acúmulo de EROs e, por conseguinte um estresse oxidativo exacerbado. Alguns autores sugerem que moléculas oncogênicas como Ras, Bcr-Abl e c-Myc e o gene supressor tumoral p53 podem ter efeitos significativos na geração de EROs na célula tumoral, porém os mecanismos pelos quais tais efeitos acontecem ainda permanecem desconhecidos (VOUSDEN; RYAN, 2009; JONES; THOMSON, 2009; KOPTYRA et al., 2006) (Figura 1).

Figura 1 - Metabolismo das EROs e principais moléculas que afetam o balanço redox intracelular.



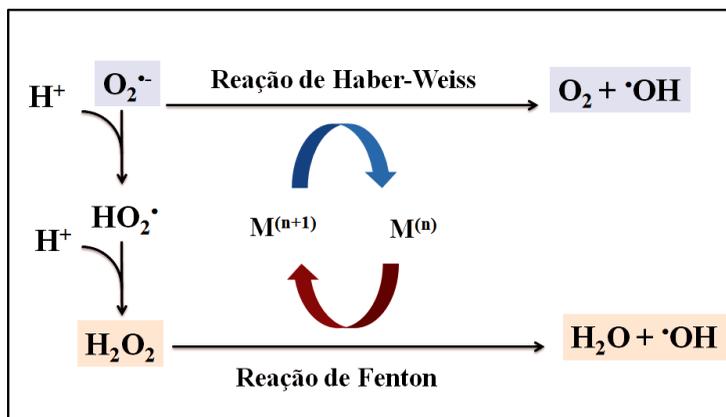
Os principais sítios celulares de geração de EROs incluem a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Mito ETC), o sistema reticular endoplasmático (ER) e o complexo NAD(P)H oxidase (NOX). Moléculas oncogênicas (Ras, Bcr-Abl, c-Myc) e a proteína supressora de tumor p53 têm significante efeito na geração de EROs. O ponto de interrogação (?) apresentado na figura, indica os mecanismos de geração de EROs que ainda não estão totalmente elucidados. Fonte: Adaptado de LU; OGASAWARA; HUANG, 2007.

1.2.1.1 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é descrita como um processo no qual agentes oxidantes, como as EROs, atacam lipídios que contêm duplas ligações carbono-carbono, especialmente ácidos graxos poliinsaturados. De uma forma geral, a lipoperoxidação compreende a abstração de hidrogênio de um carbono, com a inserção de oxigênio resultando em radical peroxil e hidroperóxidos (YIN; XU; PORTER, 2011).

As principais EROs que atacam os lipídios de membrana são o radical hidroxil (HO^\bullet) e o hidroperoxil (HO_2^\bullet). O radical hidroxil é pequeno, altamente móvel, solúvel em água e uma das mais reativas espécies ativas de oxigênio, podendo ser produzido a partir do metabolismo do oxigênio e sob condições de estresse (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). O radical hidroperoxil desempenha um importante papel na química da peroxidação lipídica. Esta forma protonada do ânion superóxido produz peróxido de hidrogênio, que pode reagir com metais de transição como o ferro e o cobre para gerar radical hidroxil através das reações de Fenton e Haber-Weiss (Figura 2). O radical hidroperoxil é um potente oxidante, sendo por si só o responsável pela iniciação da oxidação da cadeia dos fosfolipídios poliinsaturados, ocasionando o comprometimento da função da membrana celular (BROWNE; ARMSTRONG, 2000).

Figura 2 - Reações de Fenton e Haber-Weiss.



A forma reduzida dos metais de transição (M^n) reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da reação de Fenton, ocasionando a geração de radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$). O ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pode também reagir com a forma oxidada dos metais de transição (M^{n+1}) durante a reação de Haber-Weiss, ocasionando a

produção de M^n , que redireciona o ciclo de reações. Fonte: Adaptado de AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014.

As membranas celulares e as membranas de organelas são um dos principais alvos da peroxidação lipídica, resultando em alteração na integridade, fluidez e permeabilidade das mesmas. Quando os índices de peroxidação lipídica são elevados, ou seja, quando o dano oxidativo ultrapassa a capacidade de reparação, as células são direcionadas para a morte por necrose ou apoptose, a partir da liberação de enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA) (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014).

1.2.1.2 Carbonilação proteica

A oxidação é um dos fatores mais deletérios às proteínas celulares, sendo que a quantidade de proteínas oxidadas reflete o balanço entre as atividades antioxidantes e pró-oxidantes de um organismo (TRNKOVA; DRSA; BOUSOVA, 2015).

Espécies reativas de oxigênio podem atacar diretamente o esqueleto polipeptídico das proteínas. Cetonas e aldeídos são compostos altamente reativos derivados da carbonilação de proteínas em resíduos de lisina, arginina, prolina e treonina (REQUEMA; LEVINE; STADTMAN, 2003). A reação entre o radical hidroxil e as proteínas leva à abstração de átomos de hidrogênio da cadeia polipeptídica, culminando com a formação de hidroperóxidos proteicos (TRNKOVA; DRSA; BOUSOVA, 2015). Os hidroperóxidos proteicos desempenham um papel importante nos processos oxidativos, uma vez que podem iniciar futuras reações de oxidação (HAMPTON; MORGAN; DAVIES, 2002), que afetam não somente proteínas, mas outras biomoléculas como lipídios e DNA (LOPEZ-ALARCON et al., 2014; RAHMANTO et al., 2010).

As proteínas podem não ser atacadas apenas por EROs mas também por produtos da peroxidação lipídica, como o 4-hidroxinonal (HNE) e o MDA (TRNKOVA; DRSA; BOUSOVA, 2015). Esses produtos também são capazes de provocar a oxidação de moléculas de DNA e RNA, e as mesmas, quando oxidadas e não reparadas, podem levar a erros de transcrição e translação direcionando para a síntese de proteínas anormais que são propensas à oxidação por EROs (HOHN et al., 2011; STADTMAN, 2004).

O dano oxidativo em proteínas afeta a função de receptores e proteínas de transporte, bem como a inativação de enzimas de reparação

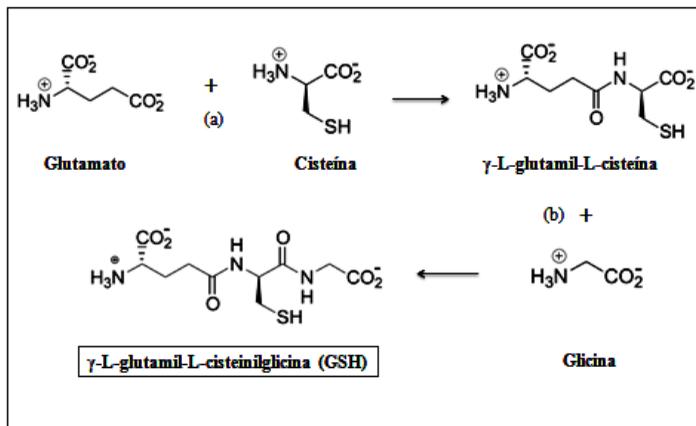
do DNA e perda da ativação da DNA polimerase, que atua durante a replicação celular (HALLIWELL, 2001).

1.2.1.3 Glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona reduzida (GSH, L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina) está presente na maioria das células e possui papel central na defesa contra o estresse oxidativo. O grupo sulfidríla (-SH) da GSH torna a molécula um ótimo nucleófilo em reações com compostos eletrofílicos. A capacidade de doar elétrons faz da GSH um excelente agente redutor (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008). Sendo assim, o grupo sulfidríla é o responsável pela maioria das reações que envolvem a GSH.

A biossíntese de GSH ocorre no meio intracelular a partir da ação consecutiva de duas enzimas (Figura 3). Na primeira reação, catalisada pela enzima γ -glutamilcisteína sintetase, é formada a ligação peptídica entre os aminoácidos glutamato e cisteína, tendo como produto a γ -L-glutamil-L-cisteína. O dipeptídeo é ligado à glicina pela ação da enzima glutathiona sintetase. As duas etapas da formação da GSH requerem ATP e magnésio (Mg^{2+}) (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008).

Figura 3 - Biossíntese de glutathiona reduzida (GSH).



Duas reações consecutivas, com consumo de ATP, são requeridas para a biossíntese de GSH. A primeira reação ocorre entre o glutamato e a cisteína na presença da enzima γ -glutamilcisteína sintetase (a). O produto desta reação, γ -L-glutamil-L-cisteína, reage com a glicina a partir da ação da enzima glutathiona sintetase (b), tendo como produto final a GSH. Fonte: Do Autor, adaptado de HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008.

A atividade antioxidante da GSH ocorre a partir da redução das EROs e consequente oxidação da GSH à glutatona dissulfeto (GSSG). Porém, para que tal reação ocorra é necessário que a GSH seja constantemente regenerada através do ciclo catalítico. O ciclo compreende a oxidação da GSH à GSSG catalisada pelas enzimas glutatona oxidase (GO) e glutatona peroxidase (GPx), seguido pela regeneração da GSH na presença de dinucleotídeo de nicotinamida adenina fosfato reduzido (NADPH), catalisada pela enzima glutatona redutase (GR) (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008).

Níveis elevados de GSH podem ser observados em alguns tipos de tumores e estão relacionados à resistência das células neoplásicas à quimioterapia (ESTRELA; ORTEGA; OBRADOR, 2006), à proliferação celular e à progressão do ciclo celular (MESSINA; LAWRENCE, 1989). Entretanto, o mecanismo molecular envolvido na modulação do ciclo celular pela GSH permanece desconhecido. A GSH possui também um importante papel durante a síntese do DNA, uma vez que mantém reduzida a enzima glutarredoxina, a qual é requerida para a atividade da ribonucleotídeo redutase, enzima de síntese de DNA (HOLMGREN, 1981). Os altos níveis de GSH apresentam ainda uma correlação direta com a atividade metastática das células tumorais (CARRETERO et al., 1999).

Estudos revelam que o estresse oxidativo exacerbado pode ocasionar a depleção de GSH, assim favorecendo a ação oxidante das EROs (MORRIS et al., 2012). Conforme Meister (1991), algumas linhagens de células tumorais com baixos níveis de GSH mostraram-se mais sensíveis à quimioterapia do que células normais. A depleção da GSH pela butionina sulfoximina (BSO), um inibidor irreversível da γ -glutamilcisteína sintetase, é uma alternativa de tratamento para o câncer quando associado com alguns agentes quimioterápicos (WONDRAK, 2009; REBER et al., 1998). A depleção de GSH parece direcionar para danos ao DNA e apoptose via produção de EROs e ativação da via PKC- δ (MARENCO et al., 2011).

Tendo em vista o supracitado, terapias antitumorais capazes de diminuir os níveis de GSH são interessantes alvos de estudo para a intervenção médica contra a progressão do câncer e quimiorresistência (TRAVERSO et al., 2013).

1.2.1.4 Enzimas antioxidantes

A superóxido dismutase (SOD) é uma proteína homodimérica que pode ser expressa de duas formas diferentes. A forma citosólica (SOD1 ou Cu/Zn-SOD) que contém íons zinco (Zn^{2+}) e íons cobre (Cu^{2+}), importantes para a estabilidade e atividade catalítica (LIN et al., 2015), respectivamente. A outra forma (SOD2 ou Mn-SOD) contém o íon manganês (Mn^{2+}) e está localizada na mitocôndria. A SOD é um membro importante do sistema antioxidante intracelular (McCORD; FRIDOVICH, 1969), uma vez que é responsável por catalizar a conversão de ânions superóxido a oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio na cadeia respiratório mitocondrial.

A catalase (CAT) foi uma das primeiras enzimas investigadas dentro da família das peroxidases (ZUO et al., 2015). Contém um grupamento heme e quatro subunidades proteicas idênticas. Apesar de possuir uma elevada capacidade catalítica, o mecanismo catalítico exato da CAT ainda permanece desconhecido. No entanto, sabe-se que esta enzima utiliza o íon ferro (Fe^{2+}) para converter H_2O_2 em H_2O e O_2 em duas etapas (ZAMOCKY; FURTMULLER; OBINGER, 2008). Na primeira etapa, ocorre a oxidação do Fe^{3+} (III) no centro do grupo heme em H_2O_2 gerando intermediários [$Fe(IV)-enzyme=O+H_2O$]. A segunda etapa compreende uma redução na qual outra molécula de H_2O_2 recupera a catalase com a produção de H_2O e O_2 (ZAMOCKY; FURTMULLER; OBINGER, 2008).

A CAT é encontrada na mitocôndria e principalmente na matriz dos peroxissomas, porém nos eritrócitos é encontrada no citoplasma. A função metabólica normal dos peroxissomas é a participação em processos oxidativos e a remoção de átomos de hidrogênio de compostos orgânicos, sendo que tais processos geram uma quantidade significativa de H_2O_2 no interior do peroxissoma (RHEE et al., 2005). No entanto, a catalase atua evitando a acumulação e distribuição de H_2O_2 , consequentemente protegendo outras organelas celulares.

As glutationas peroxidases (GPxs) são uma família de proteínas envolvidas no controle dos níveis de peróxido de hidrogênio. Em mamíferos as GPx1-4 são selenoproteínas com uma selenocisteína no centro catalítico, a GPx6 é uma selenoproteína presente somente em humanos (FLOHÉ; MAIORINO, 2013). A função principal das GPxs é catalisar a redução do H_2O_2 ou hidroperóxidos orgânicos em água e seus alcoóis correspondentes, respectivamente, usando GSH como redutor e formando GSSG (LUBOS et al., 2010).

Conforme explicado anteriormente, a oxidação da GSH pelo agente oxidante gera GSSG. A reciclagem da GSH é de responsabilidade da enzima glutathione redutase (GR), dependente de NADPH. Esta reação de regeneração da GSH é essencial para proteção celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

A enzima glutathione S-transferase (GST) desempenha as funções de remoção de xenobióticos tóxicos e regeneração de S-tiolatos proteicos gerados em consequência do estresse oxidativo, catálise de reações em vias metabólicas e detoxificação de xenobióticos (SHEEHAN et al., 2001).

1.2.2 DNA como alvo terapêutico para o câncer

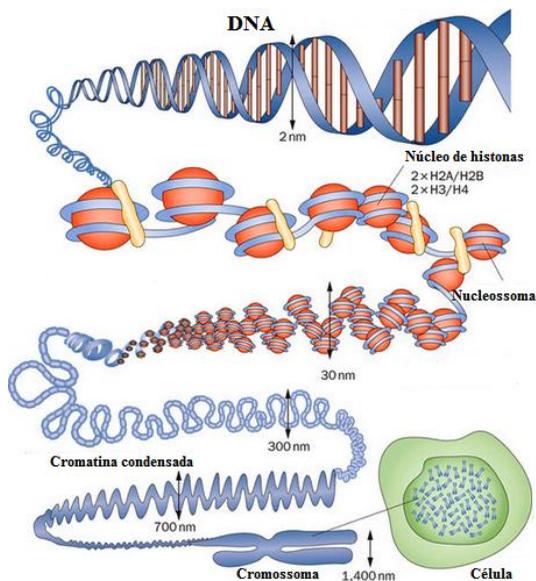
O DNA apresenta estrutura em dupla hélice, sendo que as duas fitas enrolam-se em torno do eixo das hélices. As desoxirriboses estão voltadas para a parte externa enquanto as bases nitrogenadas para a parte interna da dupla hélice, sendo estas responsáveis por manter a estrutura em dupla fita do DNA. As ligações glicosídicas entre as desoxirriboses e as bases nitrogenadas, por não estarem diretamente opostas na dupla-hélice, acabam gerando duas cavidades desiguais, denominadas *grooves*.

Os danos às moléculas de DNA podem ser classificados como endógenos ou exógenos. Danos endógenos são causados pelo metabolismo da própria célula, como os danos oxidativos ocasionados pelas EROs. Já os danos exógenos ocorrem quando as células são expostas a agentes físicos (radiação) ou agentes químicos (compostos citotóxicos) (KUO; YANG, 2008). Ambas as causas de dano podem levar à quebra na dupla fita do DNA, ocasionando a inibição da síntese de proteínas importantes e instabilidade do material genético.

Em células tumorais, genes específicos envolvidos na resposta de dano ao DNA, tais como BRCA 1/2 e p53 estão mutados, ao passo que genes envolvidos na sinalização oncogênica como Akt e c-Myc estão ativados favorecendo a instabilidade genômica, a replicação e a proliferação das células cancerígenas (KARANIKI et al., 2014).

O DNA é normalmente ancorado por proteínas protetoras e reparadoras de dano denominadas histonas, formando o nucleossoma (Figura 4). As histonas podem ser divididas em quatro proteínas diferenciadas: H2A, H2B, H3 e H4 (FOSTER; DOWNS, 2005). A família de proteínas H2A têm um maior número de variantes incluindo H2A1, H2A2, H2AX e H2AZ (AUSIO; ABBOTT, 2002). Estas variantes diferem em alguns resíduos, porém, a proteína H2AX é a única encontrada somente em eucariontes.

Figura 4 – Material genético humano.

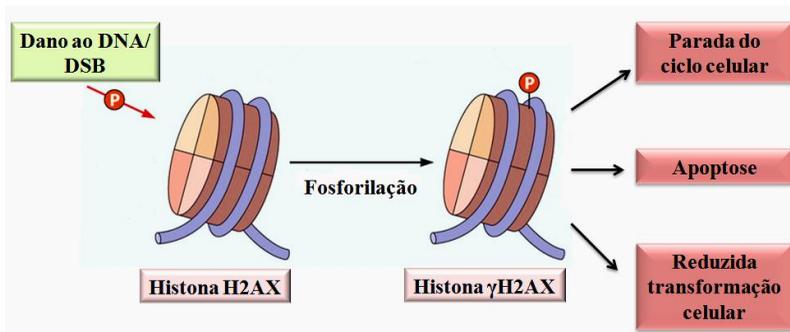


Rede orgânica do material genético humano. O DNA é ancorado em proteínas nucleares denominadas histonas (H2A, H2B, H3 e H4), formando o nucleossoma e condensado no núcleo celular na forma de cromossoma. Fonte: Adaptado de TONNA et al., 2010.

A H2AX pode ser fosforilada em Ser 1, acetilada em Lys 5 e ubiquitinada em Lys 119, porém, na presença de danos ao DNA é fosforilada em Ser 139 (ROGAKOU et al., 1998). A proteína H2AX fosforilada é denominada γ H2AX (ROGAKOU et al., 1999) e o aumento da expressão da γ H2AX é indicio de que o DNA celular foi danificado. Após os mecanismos de reparo do DNA, em células normais, essa proteína é desfosforilada, sendo as proteínas fosfatases PP2A e PP4C responsáveis pela regulação dos níveis de γ H2AX em células humanas saudáveis (CHOWDURY et al., 2005). Alguns estudos demonstram a relação entre a diminuição da expressão da forma fosforilada da histona H2AX e potencial de indução do reparo ao dano ao DNA ocasionado por algumas moléculas. Também, a análise da expressão da γ H2AX é biologicamente importante pelo fato da mesma estar relacionada à regulação de processos de morte e parada do ciclo

celular, como apresentado na figura 5 (BOUQUET; MULLER; SALLES, 2006).

Figura 5 – Importância biológica da fosforilação da histona H2AX.



Danos à molécula de DNA e consequente quebras da dupla fita ocasionam a fosforilação da histona H2AX na Ser 139, que uma vez fosforilada, passa a ser denominada γ H2AX. A γ H2AX é responsável pela sinalização de vias de parada do ciclo celular, redução da transformação celular proveniente de mutações e morte celular por apoptose. Fonte: Adaptado de BANERJEE; CHAKRAVARTI, 2011.

Wang e colaboradores (2014) relatam que a fosforilação da histona H2AX é um indicio de fragmentação do DNA. Essa fragmentação está diretamente relacionada à ocorrência de DSBs (*Double-strand breaks*), que nada mais são do que danos à dupla fita do DNA. Um reparo ineficiente nas DSBs pode ocasionar instabilidade genômica (ILIAKIS et al., 2004). Por conseguinte, essas DSBs ocasionam a fosforilação da histona H2AX e o aumento dos níveis da γ H2AX é um indicativo de quebra na dupla fita do DNA (PODHORECKA; SKLADANOWSKI; BOZKO, 2011). Existem claras evidências de que, se as DSBs não são reparadas eficientemente, poderá ocorrer uma instabilidade genômica que é transmitida para células filhas através do ciclo celular (SONODA et al., 2006). A ocorrência de DSBs inclui fatores endógenos, associados a processos fisiológicos e fatores exógenos (TANAKA et al., 2007a).

O DNA celular está sujeito a constantes danos oxidativos ocasionados pelas EROs oriundas dos processos metabólicos (TANAKA et al., 2007a; VILENCHIK; KNUDSON, 2003). Estima-se que ao final de um ciclo celular possa ocorrer até ~ 5000 quebras simples em uma fita de DNA como resultados do ataque de EROs

(PODHORECKA; SKLADANOWSKI; BOZKO, 2011). Destas quebras simples 1% são convertidas em DSBs e 99% são reparados. O acúmulo de danos ao DNA induzidos por EROs leva ao envelhecimento celular e pode também ser responsável pelo aparecimento de neoplasias (TAKAHASHI; OHNISHI, 2005). Um dos principais fatores exógenos que induzem DSBs são as radiações ionizantes, como por exemplo, os raios X e a radiação UV, capazes de causar alterações na integridade genômica, evoluindo para o surgimento de um tumor (TANAKA et al., 2007b).

Por fim, a avaliação da fosforilação da H2AX como um indicativo de dano ao DNA pode ser usada clinicamente. A mais importante aplicação clínica da medida da expressão da γ H2AX é o monitoramento da eficácia do tratamento pela radio e quimioterapia (DOWNS, 2007), no qual um aumento na expressão dessa proteína é indício de dano ao DNA das células tumorais ocasionado pelo tratamento ao qual o indivíduo está sendo submetido. Os níveis de DSBs em células normais induzidas pelo tratamento antitumoral também pode ser um indicativo de toxicidade do tratamento.

1.2.3 Ciclo Celular

A divisão da maioria das células consiste em um processo extremamente ordenado em um ciclo de quatro fases: crescimento celular, replicação do DNA, distribuição dos cromossomos duplicados em células filhas e divisão celular.

O ciclo celular é dividido em duas partes principais: mitose e interfase. A mitose, processo no qual ocorre a divisão nuclear, é o mais dramático estágio do ciclo, correspondendo à separação dos cromossomos das células-filhas e finalizando com a divisão celular, processo conhecido como citocinese. O período entre as mitoses celulares é conhecido como interfase (COOPER, 2000).

A célula diferenciada, que não está se replicando, encontra-se na fase G0 do ciclo celular. Nesta fase, o DNA está superenovelado com baixa atividade nuclear. Na passagem da fase G0 para a fase G1 há a preparação da célula para a multiplicação, com a produção de vários constituintes celulares e a preparação para a síntese de DNA. A fase G1 (*gap 1*) é seguida pela fase S, na qual ocorrerá a replicação do DNA. A conclusão da síntese do DNA é seguida pela fase G2 (*gap 2*) do ciclo celular, durante a qual o crescimento celular continua e proteínas são sintetizadas em preparação para a mitose, ou seja, a divisão celular com a manutenção do número de cromossomos específicos da espécie. Logo

após a divisão do material nuclear ocorre a citocinese (separação da célula-mãe, formando as duas células-filhas com suas organelas e demais constituintes celulares), desta forma finalizando o ciclo celular, retornando à fase G₀ (SHERR, 1996).

A progressão do ciclo celular pode ser regulada por sinais extracelulares como os fatores de crescimento ativos durante a proliferação celular. Além disso, eventos que ocorrem durante as diferentes fases do ciclo podem ser coordenados uns com os outros, de modo que ocorram na ordem apropriada. As cinases dependentes de ciclinas (CDKs) são enzimas da família serina/treonina que estão altamente relacionadas à regulação do ciclo celular (HERRERO-RUIZ et al., 2014). A progressão normal do ciclo é determinada por fosforilações de enzimas específicas para cada fase do ciclo celular, sendo que este processo envolve as ciclinas e suas parceiras catalíticas, as CDKs (MAKAREVIC et al., 2014).

Em células eucarióticas, o ciclo celular é controlado através de uma ativação sequencial e inativação de CDKs (MORGAN, 1997), que dirigem a progressão do ciclo celular através da fosforilação/desfosforilação de fatores regulatórios (SCHNERCH et al., 2012; PAVLETICH, 1999). A atividade das CDKs é controlada pela sua acumulação durante a progressão do ciclo celular e subsequente degradação proteolítica de subunidades de ciclinas, fosforilação de subunidades de CDK, bem como através de interações com inibidores de CDK (MURRAY, 2004). A união ciclina A/CDK2 está envolvida na replicação celular (PARK et al., 2014; COPELAND et al., 2010), na progressão do ciclo celular e mitose (FUNG; MA; POON, 2007; GONG et al., 2007).

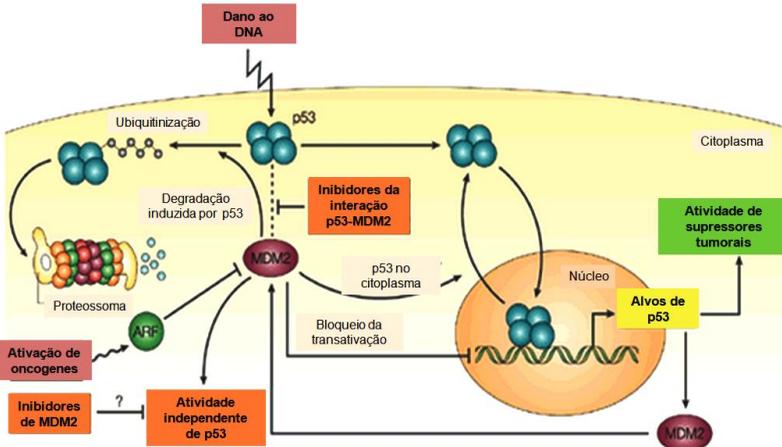
Um potencial replicativo ilimitado é uma das características adquiridas pelas células cancerígenas durante o desenvolvimento do tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Sabe-se que a célula tumoral não finaliza o ciclo de replicação, passando diretamente da fase M para a fase G₁, sem passar pela fase G₀. Portanto, a parada do ciclo celular representa uma importante barreira ao crescimento da célula cancerígena, evitando a sua proliferação.

Caso ocorra alguma anormalidade durante as diferentes fases do ciclo, existem inibidores cuja função é evitar a transmissão da anomalia para as células filhas e conduzir as células à apoptose. As proteínas p15 e p16 atuam bloqueando as CDKs e ciclinas, impedindo o avanço do ciclo da fase G₁ para a fase S (GUO et al., 2000). O inibidor p21, que está associado ao proto-oncogene Ras, e o p53 estão diretamente relacionados ao controle da normalidade e integridade dos componentes

celulares (ELBENDARY et al., 1996). Possíveis mutações no conteúdo genético das células, que alterem a saúde celular, podem contribuir para a carcinogênese. Tem-se como um dos principais exemplos o p53 mutado, frequente em vários tipos de tumores. Este gene não irá sinalizar a célula danificada para a apoptose, ocasionando uma proliferação de células mutadas através do ciclo celular.

Já está bem descrito na literatura o papel da proteína p53 na supressão do tumor (IANNETTI et al., 2014; XIAO et al., 2014). De acordo com vários autores, essa proteína participa diretamente na manutenção da integridade do genoma, pois é a responsável por sinalizar para reparos ao DNA e remoção das células danificadas através da apoptose. Quando ocorrem danos no DNA, este evento sinaliza para a expressão da p53, resultando em parada do ciclo celular em G1, iniciando o reparo do DNA. Após o reparo, a p53 associa-se à MDM2 (*murine double minute*), revertendo o bloqueio celular e possibilitando o avanço para a fase S do ciclo celular (SHERR, 2000). Tal evento ocorre porque a proteína MDM2, que serve como substrato para caspase, liga-se à p53, mantendo-a no citoplasma (Figura 6). Ao ser clivada pelas caspases, a MDM2 libera a p53 a qual se transloca para o núcleo, ativando genes pró-apoptóticos como o Bax (SCHULER; MAURER; GOLDSTEIN, 2003). No entanto, células tumorais apresentam um metabolismo aberrante, com disfunção mitocondrial e perda da função do p53 (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009). Em células cancerígenas, que possuem mutações em p53, ocorre um descontrole em G1, o que possibilita que as células com material genético alterado progridam para a fase S sem reparar as lesões, ou entrar em apoptose (AGARWAL et al., 1998).

Figura 6 – Regulação da p53 pela MDM2.



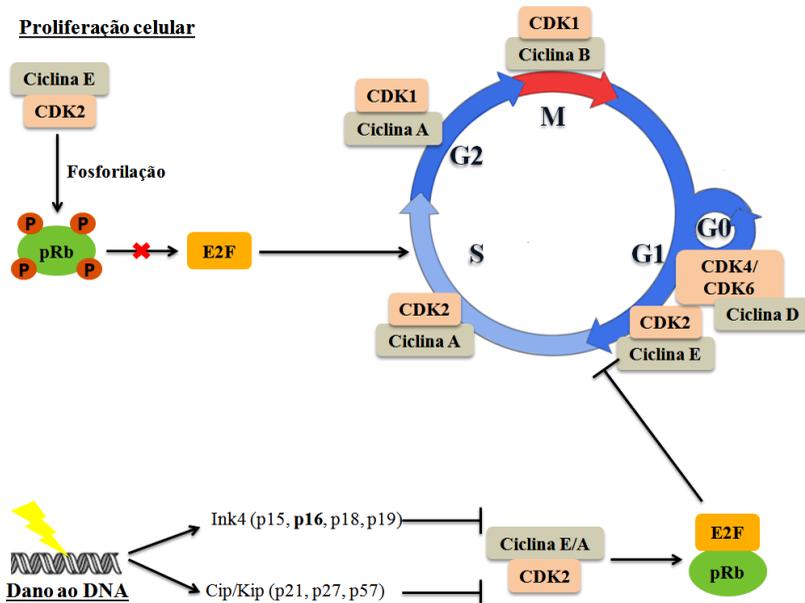
Mecanismo autorregulatório de p53-MDM2. A proteína p53 estimula a expressão de MDM2. MDM2 atua inibindo a atividade de p53 através dos seguintes mecanismos: bloqueio da atividade transcricional, favorecimento da expressão citoplasmática de p53 e estímulo da degradação desta proteína. A proteína p53 é ativada por diferentes sinais celulares, como danos ao DNA e ativação de oncogenes. Danos ao DNA favorecem a fosforilação de p53, impedindo sua associação ao MDM2. A ativação de oncogenes é responsável pela ativação da proteína ARF, que impede a degradação de p53 mediada por MDM2. Fonte: Adaptado de CHÈNE, 2003.

A proteína p16 atua como um regulador negativo da proliferação celular pela inibição da fosforilação da proteína Rb pelas CDKs (KIM; SHARPLESS, 2008; SANO et al., 1998). Algumas moléculas têm a capacidade de ativar um estado de senescência celular pelo aumento do estresse oxidativo, levando ao aumento da expressão de p16 e consequente manutenção da Rb em um estado hipofosforilado, induzindo a parada do ciclo celular em G1 (KIM; SHARPLESS, 2008). Já está bem descrito na literatura que a diminuição da expressão de p16 sinaliza para a fosforilação de pRB por cinases, permitindo a entrada das células na fase S do ciclo (SANO et al., 1998), ocasionando a proliferação celular e consequente progressão do câncer (HERSCHKOWITZ et al., 2008; GAUTHIER et al., 2007). A fosforilação da proteína Rb é controlada entre as fases G1 e S do ciclo celular por complexos ciclinas/CDKs (TAYA, 1997). A hiperfosforilação da proteína Rb conduz à dissociação do fator de

transcrição E2F, o qual ativa a transcrição de componentes importantes para a replicação do DNA durante a fase S do ciclo celular.

No estado hipofosforilado, a proteína Rb liga-se ao fator de transcrição E2F. Esta ligação inibe os efeitos de Rb na expressão gênica prevenindo a ligação de co-ativadores transcripcionais e recrutamento de histonas deacetilases (HDACs), ATPases e DNA metiltransferases (GIACINTI; GIORDANO, 2006; GRANA; GARRIGA; MAYOL, 1998). O fator de transcrição E2F regula a expressão de múltiplos genes envolvidos na progressão das fases G1 e S do ciclo celular, no metabolismo do DNA e na proliferação celular (SACHDEVA; O'BRIEN, 2012). Portanto, quando a proteína Rb está hiperfosforilada, age como um regulador da expressão de genes, influenciando em múltiplos processos celulares necessários para o crescimento e desenvolvimento embrionário. Estes processos incluem proliferação, senescência, apoptose, diferenciação e remodelação da cromatina (BURKHART; SAGE, 2008; WEINBERG, 1995). A fosforilação inapropriada da proteína Rb contribui para o desenvolvimento de alguns tipos de tumores, incluindo adenomas de paratireoide, linfoma de células B e carcinoma de células escamosas (GIACINTI; GIORDANO, 2006). A desfosforilação e ativação da proteína Rb é controlada por fosfatases e inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CDKIs) como os Ink4 (p15, p16, p18 e p19) e Cip/Kip (p21, p27 e p57) (SHERR; ROBERTS, 1999). CDKIs respondem a vários sinais antiproliferativos incluindo dano ao DNA, senescência e sinais de diferenciação (SACHDEVA; O'BRIEN, 2012). Sendo assim, a perda das funções da proteína Rb pode induzir a desregulação do ciclo celular e propiciar o surgimento do tumor (Figura 7).

Figura 7 – Proteínas envolvidas no controle do ciclo celular.



A iniciação e progressão do ciclo celular dependem da ativação dos complexos ciclina/CDK. Os complexos ciclina D/CDK4 e CDK6 controlam a entrada do ciclo celular em G1. Células que estão em processo de proliferação exacerbada, como no caso das células tumorais, o complexo ciclina E/CDK2 promove a hiperfosforilação da proteína Rb, impedindo a ligação desta com o fator E2F. O fator de transcrição E2F ativo conduzirá a transcrição de genes essenciais para a síntese de DNA, como c-Myc, tornando possível a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. Danos ao DNA bem como o estado de senescência celular conduzem a ativação de inibidores de cinases dependentes de ciclina (Ink4 e Cip/Kip), os quais inibem os complexos ciclina E-A/CDK2, proporcionando a ligação de pRb com o fator de transcrição E2F, o que ocasiona a parada do ciclo celular entre G1 e S. Fonte: Do autor.

1.2.4 Vias de proliferação celular

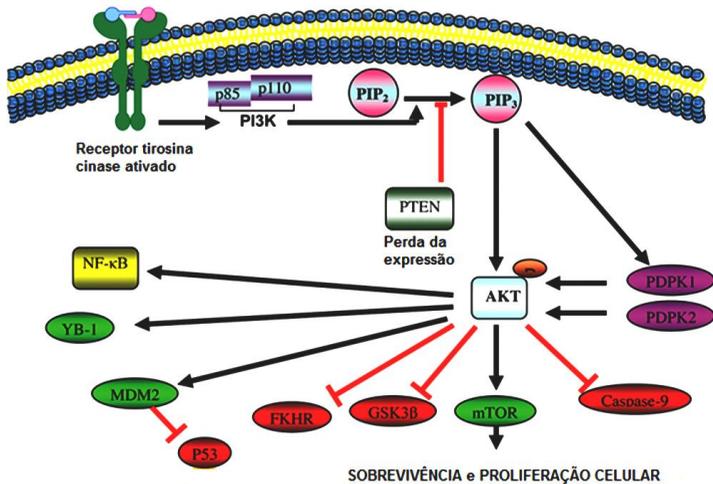
Células de tecidos normais possuem vias de sinalização bem reguladas para o crescimento e proliferação celular, desta maneira mantendo a homeostase celular e a arquitetura normal do tecido (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Já nas células tumorais, as vias de sinalização para a proliferação estão altamente desajustadas, devido à desregulação de fatores de crescimento que se ligam em receptores na

membrana celular com domínios intracelulares de tirosina cinase (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Como exemplo, destaca-se o fator de crescimento endotelial (VEGF), um potente mitógeno envolvido na angiogênese tumoral. O VEGF atua através da ligação a receptores específicos do tipo tirosina cinase, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares que sinalizarão para a proliferação celular.

A ocorrência de mutações pontuais nos genes que codificam a família de proteínas Ras contribui para o surgimento de um vasto número de tumores (PRIOR; LEWIS; MATTOS, 2012). Esta mutação relaciona-se ao fato de que a ativação da sinalização de oncoproteínas como Ras, Myc e Raf pode inibir a apoptose e induzir a senescência celular (COLLADO; SERRANO, 2010; DAVIES; SAMUELS, 2010), que nada mais é que uma resposta celular ao estresse, na qual ocorre o bloqueio irreversível da proliferação celular e consequente perda da habilidade das células retornarem ao ciclo celular normal (GU et al., 2013; HANHAN; WEINBERG, 2011).

Da mesma forma, mutações em subunidades catalíticas da fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K) são detectadas em vários tipos de tumores. Este evento acaba sinalizando para a ativação da via da Akt, ponto-chave para a proliferação celular (JIANG; LIU, 2009; YUAN; CANTLEY, 2008). A proteína Akt faz parte de uma das principais vias de sinalização responsáveis pela proliferação celular ativa em células tumorais, que é a via da PI3K/Akt/mTOR (Figura 8).

Figura 8 - Via da PI3K/pAkt/mTOR.



Fatores de crescimento ligam-se a receptores de membrana com domínios intracelulares de tirosina cinase ocasionando a ativação da fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K). A PI3K ativada converte o lipídeo de membrana fosfatidilinositol-4,5 bifosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol-3, 4, 5 trifosfato (PIP₃). A PIP₃ liga-se à proteína cinase B (PKB ou Akt), que é fosforilada e ativada por outra proteína cinase, a PDK1. Uma vez fosforilada (ativa), a Akt ativa várias proteínas envolvidas na sinalização para a sobrevivência e proliferação celular, principalmente a proteína mTOR. Fonte: Adaptado de ALMHANNA; STROSBURG; MALAFA, 2011.

A Akt é uma serina/treonina cinase que controla processos fisiológicos importantes, tais como crescimento celular, proliferação, sobrevivência e motilidade (DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999). A desregulação da via da Akt é bem descrita no câncer (VIVANCO; SAWYERS, 2002) e está relacionada com o processo de tumorigênese e resistência aos quimioterápicos (WITTIG-BLAICH et al., 2011; FRASER et al., 2003).

Vários estudos relatam que a geração de EROs intracelular induzida por algumas moléculas inibe a via da Akt. De acordo com Woo e colaboradores (2003) o mecanismo pelo qual a curcumina leva à citotoxicidade em células de carcinoma renal (Caki) envolve a geração de EROs, induzindo a liberação de citocromo *c* e inibição da via da Akt. Resultado semelhante foi obtido por Yang e colaboradores (2011), ao estudarem o efeito da vitaferina A, uma lactona esteroidal derivada da

planta medicinal *Withania somnifera*, em células Caki. Weir e colaboradores (2007), ao analisarem o efeito da curcumina em uma linhagem celular de câncer ovariano resistente à cisplatina, observaram que a curcumina induz a parada do ciclo celular em G2/M, elevação dos níveis de EROs intracelulares e consequente inibição da via da Akt. A proteína cinase C (PKC) desempenha papel importante na morte celular induzida por H₂O₂ através da regulação da via PI3K/Akt (ZHOU et al., 2005; ZHANG et al., 2001).

A ativação da Akt envolve um receptor tirosina cinase e o recrutamento PI3K, que conduz a conversão de fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP2) para fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) na membrana celular (KANDEL; HAY, 1999). A Akt é ativada por fosforilação em dois resíduos chaves: serina 473 (Ser 473) e treonina 308 (Thr 308) (VIVANCO; SAWYERS, 2002). A fosforilação da Thr 308 é realizada pela fosfatidilinositol-3 dependente de cinase 1 (PDK1) (CARNERO, 2010). A fosforilação em Ser 473 pode ocorrer mediada por proteína cinase dependente de DNA (DNA-PK), sendo que este evento ocorre após um dano ao DNA celular (STRONACH et al., 2011; BOZULIC et al., 2008).

A ativação da proteína Akt estimula a progressão do ciclo celular, sobrevivência celular, metabolismo e migração através da fosforilação de alguns substratos fisiológicos (JIANG; LIU, 2009; YUAN; CANTLEY, 2008), como o p21 e p27, que são importantes inibidores do ciclo celular (VIGLIETTO et al., 2002). Pode-se inferir também que a Akt exerce efeito anti-apoptótico, a partir da fosforilação de Bad, que é sequestrado no citosol impedindo a interação com proteínas pró-apoptóticas como Bcl-2/Bcl-xl (ALESSI; COHEN, 1998), e a liberação do citocromo *c* ao citosol (KENNEDY et al., 1999).

A fosfatase PTEN é o alvo primário do fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), produto da fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K) (MAEHAMA; DIXON, 1998). A via PTEN/PI3K está amplamente envolvida no desenvolvimento do câncer, uma vez que a atividade de PTEN é perdida na maioria dos tumores (BADER; KANG; VOGT, 2006; PARSONS et al., 2005; SAMUELS et al., 2004).

Por fim, a proteína cinase mTOR é responsável pelo crescimento, sobrevivência e proliferação celular e está relacionada com a ativação da via PI3K. Efeitos anti-proliferativos estão relacionados à inibição da mTOR (SUDARSANAM; JOHNSON, 2010).

Evidências indicam que a via da PTEN/PI3K/Akt é um alvo promissor na terapia do câncer. Sendo assim, inúmeros estudos são conduzidos com o intuito de inibir esta via em diferentes pontos, tais

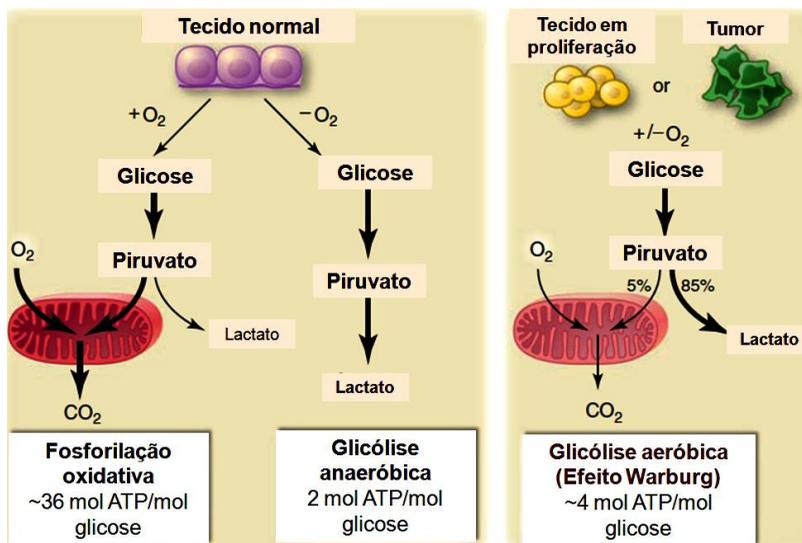
como PI3K, PDK1, Akt e mTOR (STAUFFER; HOLZER; GARCIA-ECHEVERRIA, 2005).

1.2.5 Metabolismo celular

A glicose é a principal fonte de energia e átomos de carbono para as células, provendo não somente energia na forma de ATP, mas também fonte de intermediários para vias metabólicas (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). É captada por transportadores específicos e metabolizada a piruvato no citosol. Em células quiescentes (normais), o piruvato derivado da glicólise é predominantemente importado para o interior da matriz mitocondrial e oxidado a acetil-coenzima A (acetil-CoA) pelo complexo da piruvato desidrogenase (LU; TAN; CAI, 2015). A acetil-CoA é então introduzida no ciclo do ácido tricarboxílico seguida pela fosforilação oxidativa com alta geração de ATP. Como o oxigênio é requerido como o receptor final de elétron para oxidar completamente a glicose, ele é essencial para este processo. A oxidação total de uma molécula de glicose produz 38 moléculas de ATP (incluindo 2 moléculas de ATP geradas pela glicólise e 36 mitocondriais). Quando o oxigênio é limitado, as células podem redirecionar o piruvato da fosforilação oxidativa na mitocôndria para a geração de lactato (glicólise anaeróbica). Tal processo gera uma quantidade menor de ATP quando comparado com a fosforilação oxidativa.

Otto Warburg, em 1924, observou que as células cancerosas tendem a converter uma maior quantidade de glicose a lactato, independentemente da presença de oxigênio (WARBURG, 1956; WARBURG; POSENER; NEGELEIN, 1924), o que pode ocorrer também em tecidos normais que estejam em processo de proliferação. Tal fenômeno metabólico em que a glicose é convertida em lactato na presença de oxigênio no citoplasma é conhecido como glicólise aeróbica ou efeito Warburg (Figura 9), sendo menos eficiente que a fosforilação oxidativa para a geração de ATP.

Figura 9 – Efeito Warburg.



Na presença de oxigênio, as células diferenciadas metabolizam a glicose em piruvato através da glicólise e, então, o piruvato é completamente oxidado na mitocôndria durante o processo de fosforilação oxidativa, tendo como produto final a geração de dióxido de carbono (CO₂), H₂O e energia na forma de ATP. Quando o oxigênio é limitado, as células direcionam o piruvato para a geração de lactato, através do processo de glicólise anaeróbica, o qual resulta em uma produção mínima de ATP. Células em estado de proliferação exacerbada, como as células cancerígenas, maior parte da glicose absorvida pelas células é convertida em lactato, mesmo na presença de oxigênio, caracterizando o Efeito Warburg. Fonte: Adaptado de HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009.

O metabolismo glicolítico, nas células tumorais, produz intermediários metabólicos que servem de precursores para vias anabólicas como a via da pentose fosfato, via da síntese de serina e triacilglicerol para síntese *de novo* de nucleotídeos, aminoácidos e lipídios (LUNT; VANDER HEIDEN, 2011). Oncogenes e supressores tumorais, tais como fator indutor de hipóxia (HIF), Akt, Myc e p53, exercem impacto direto no metabolismo celular e notavelmente na captação de glicose e glicólise (LEVINE; PUZIO-KUTER, 2010; VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). Mutações no supressor de tumor p53 ocorrem na maioria dos tumores humanos. Conforme descrito na literatura, o p53 controla a glicólise, a fosforilação oxidativa e a oxidação de ácidos graxos (BERKERS et al., 2013;

LEVINE; PUZIO-KUTER, 2010). Já foi demonstrado que células deficientes em p53, como no caso das células cancerígenas, exibem altas taxas de glicólise, aumento da produção de lactato e diminuição da respiração mitocondrial (MATOBA et al., 2006).

Hipóxia é a diminuição dos níveis normais de oxigênio no meio intracelular e desempenha um papel vital na carcinogênese (KÖHL; ZHOU; BRÜNE, 2006), pois é responsável pela ativação de genes que são importantes na adaptação celular e tecidual em baixas condições de oxigênio (TSAI; WU, 2012; SONNA et al., 2003). Estes genes compreendem transportadores de glicose, enzimas da via glicolítica e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (KÖHL; ZHOU; BRÜNE, 2006). Porém, o HIF-1 é o principal fator transcricional envolvido na resposta fisiológica à hipóxia. É composto por duas subunidades: HIF-1 α e HIF-1 β . Enquanto a subunidade HIF-1 β é constitutivamente expressa, HIF-1 α é alvo constante de ubiquitinação pela proteína supressora de tumor Von Hippel-Lindau (pVHL) e é degradada por proteossoma (KÖHL; ZHOU; BRÜNE, 2006). Há indícios de que as EROs facilitam a interação entre HIF-1 α e pVHL resultando em um aumento da degradação de HIF-1 α (WANG et al., 2002).

Alguns tipos de câncer são caracterizados pela superexpressão de HIF-1 α quando comparados a tecidos normais (ZHONG et al., 1999). Sob condições de hipóxia no microambiente tumoral, o fator HIF-1 α está envolvido no metabolismo glicolítico, uma vez que regula a expressão e atividade dos transportadores de glicose GLUT-1 e GLUT-3, bem como controla a angiogênese, a diferenciação celular, a migração e a indução de metástase (BRAHIMI-HORN; BELLOT; POUSSÉGUR, 2011; SEMENZA, 2003).

A desregulação da atividade de fatores de crescimento ocasiona a ativação da via de proliferação celular PI3K/Akt/mTOR (McCARTY; BARROSO-ARANDA; CONTRERAS, 2010). A mTOR uma vez ativa, acelera a translação de mRNA para HIF-1 α (GARCIA-MACEIRA; MATEO, 2009). Agentes antitumorais que inibem a mTOR, como a rapamicina, impedem a expressão de HIF-1 α em nível translacional (McCARTY; BARROSO-ARANDA; CONTRERAS, 2010). Também, o NF-kappaB quando ativo, dirige a transcrição do gene de HIF-1 α (GARCIA-MACEIRA; MATEO, 2009; RIUS et al., 2008). NF-kappaB e HIF-1 α exercem funções homólogas, promovendo a invasão celular pelo aumento da produção e ativação de proteases extracelulares, indução da angiogênese pelo aumento da expressão de fatores angiogênicos como o VEGF e, ainda, estão relacionados com a

quimiorresistência através da indução da expressão de proteínas anti-apoptóticas (NAKANISHI; TOI, 2005; AGGARWAL, 2004).

Em tecidos saudáveis os níveis de HIF-1 α são extremamente baixos, pois as quantidades suficientes de oxigênio facilitam a rápida degradação proteossomal.

O ascorbato de sódio desempenha um papel fundamental na regulação indireta da expressão e degradação do HIF-1 α . Carcamo e colaboradores (2002) descrevem que o ascorbato de sódio em concentrações farmacológicas pode impedir a via de sinalização desencadeada por cinase que ativa a NF-kappa B. Desta forma, elevadas concentrações intracelulares de ascorbato podem inibir a expressão de HIF-1 α via inibição da NF-kappaB (McCARTY, 2013).

Ainda, a degradação do HIF-1 α ocorre principalmente por hidroxilação mediada por enzimas prolil hidroxilases (PHD2), que são dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato e regulam o catabolismo e a atividade transcricional de HIF-1 α (KUIPER et al., 2014). Na maioria dos tipos de câncer a atividade das HIF-1 hidroxilases está diminuída, principalmente devido à oxidação dos átomos de ferro presentes no seu centro catalítico (PAGE et al., 2008; PAN et al., 2007). Um dos fatores que ocasionam esta oxidação são os elevados níveis intracelulares de piruvato gerados devido ao metabolismo glicolítico exacerbado das células tumorais (McCARTY, 2013).

As PHD2 necessitam de ascorbato como cofator para desempenhar uma atividade ótima (OZER; BRUICK, 2007). Portanto, a degradação de HIF-1 α é dependente de níveis adequados de ascorbato intracelular (McCARTY, 2013). Neste sentido, vários estudos têm demonstrado que, em células tumorais, concentrações farmacológicas de ascorbato são capazes de ativar as PHD2, promovendo a degradação do HIF-1 α (FLASHMAN et al., 2010; VISSERS et al., 2007; KNOWLES et al., 2003). A degradação de HIF-1 α nestas células tem como consequência a diminuição da expressão de transportadores de glicose, inibição de enzimas glicolíticas e inibição da transcrição de genes indispensáveis para a proliferação do tumor (McCARTY, BARROSO-ARANDA, CONTRERAS, 2010; SEMENZA, 2007; ROBEY et al., 2005).

Lee e colaboradores (2009) relatam que quinonas da classe das antraciclinas, quando em concentrações de até 0,2 μ M, são capazes de inibir em até 50% a atividade transcricional de HIF-1 α em células tumorais. Doses diárias entre 0,5 e 1,5 mg/kg de doxorrubicina ou daunorrubicina mostraram inibir significativamente o crescimento do tumor em camundongos de até 20 g, devido à ação direta desses

compostos sobre a expressão de mRNA de genes alvos de HIF-1 α como o VEGF.

1.2.6 Morte celular: Apoptose e Necrose

Estímulos intra ou extracelulares são capazes de induzir a morte celular em organismos multicelulares de forma programada (HENGARTNER, 2000). Porém, entre as principais habilidades adquiridas pelas células cancerígenas, durante a progressão do tumor, a resistência à apoptose (importante tipo de morte celular programada), destaca-se como uma de suas principais características (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

A apoptose caracteriza-se pela ativação de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos extremamente regulados (ADAMS; CORY, 2007; LOWE; CEPERO; EVAN, 2004). Geralmente, a apoptose é efetuada por caspases que são proteínas da família das cisteíno-proteases com papel central nesse processo. As caspases iniciadoras estão envolvidas na ativação da cascata proteolítica. Já as caspases efetoras são responsáveis pela clivagem de substratos e, por conseguinte, efetivação da apoptose (RUPNARAIN et al., 2004). Por fim, a ativação dessas proteínas desencadeia os eventos de condensação e fragmentação nuclear e externalização de fosfolipídeos de membrana que irão sinalizar os macrófagos. Os macrófagos, por sua vez, irão fagocitar os fragmentos celulares resultantes do processo (BOATRIGT; SALVESEN, 2003).

A apoptose pode ser ativada pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial) (GALLUZZI et al., 2012). A via extrínseca é iniciada, principalmente, pela ativação de receptores de morte da membrana, que pertencem à superfamília TNF (fator de necrose tumoral) e são denominados: Fas, TNFR1 (receptor de fator de necrose tumoral 1), DR4 e DR5 (LAVRIK; KRAMMER, 2012; CABAL; LAZO, 2012; MAHALINGAM et al. 2009). Tais receptores possuem um domínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que reconheçam seus ligantes, ativando receptores de morte. Depois de ativados esses receptores, através de domínios de morte, interagem com moléculas como FADD/MORT-1. Essas moléculas recrutam a caspase-8 que ativa a caspase-3, executando a morte celular por apoptose (DANIEL et al., 2001).

Por outro lado, as mitocôndrias são as organelas celulares com papel fundamental na vida e morte celular, uma vez que, através da fosforilação oxidativa, geram a maior quantidade de energia na forma de

ATP, regulam o fluxo de cálcio e desencadeiam a apoptose através da liberação de proteínas pró-apoptóticas como o citocromo *c* e o fator indutor de apoptose (AIF) para o citoplasma. A via intrínseca da apoptose é ativada por diversos fatores, entre eles os danos ao DNA. Os diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e liberação de citocromo *c* e proteínas ativadoras de apoptose para o citosol (GUPTA, 2003). No citosol, o citocromo *c* liga-se ao fator ativador de proteases pró-apoptóticas (APAF-1), à pró-caspase-9 e ao ATP, formando um complexo denominado apoptossomo (REUBOLD; ESCHENBURG, 2012). A partir de então, ocorre a ativação da caspase-3, que irá sinalizar para a apoptose (RUPNARAIN et al., 2004). A via intrínseca é diretamente regulada por proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w e Mcl-1, ou proteínas pró-apoptóticas Bax, Bid, Bak, Bad e Bim (HENGARTNER, 2000). Essas proteínas atuam facilitando ou inibindo a formação de poros na membrana mitocondrial e, conseqüentemente, ativando ou impedindo a liberação do citocromo *c* (BORNER, 2003).

A família de proteínas Bcl-2 desempenha um papel central na regulação da apoptose e inclui proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Bfl-1 e Mcl-1) e pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-xs, Bid, Bik, Bim e Hrk). Qualquer alteração no equilíbrio dinâmico destas proteínas irá afetar diretamente o processo de morte celular (CHIPUK; GREEN, 2008; HUANG, 2000). A proteína Bax é essencial para a iniciação da apoptose pela via intrínseca (WEI et al., 2001). Evidências indicam que após o estresse, a Bax citosólica pode integrar-se totalmente à membrana mitocondrial externa, formando poros que facilitam a liberação de citocromo *c* e outros ativadores pró-apoptóticos da mitocôndria (ANTONSSON et al., 2001; GROSS et al., 1998). Alguns estudos sugerem que a clivagem proteolítica da Bax e consequente ativação da via intrínseca da apoptose ocorre em células tumorais tratadas com agentes quimioterápicos geradores de EROS (YEO et al., 2002; ITOH et al., 2000).

A apoptose também pode ser desencadeada por um mecanismo independente de caspase. Neste caso, ocorre a participação de uma flavoproteína conhecida como Fator Indutor de Apoptose (AIF). Após um estímulo para a apoptose, a AIF migra da mitocôndria para o núcleo, induzindo a condensação da cromatina e fragmentação do DNA (BRÖKER; KRUYT; GIACCONE, 2005).

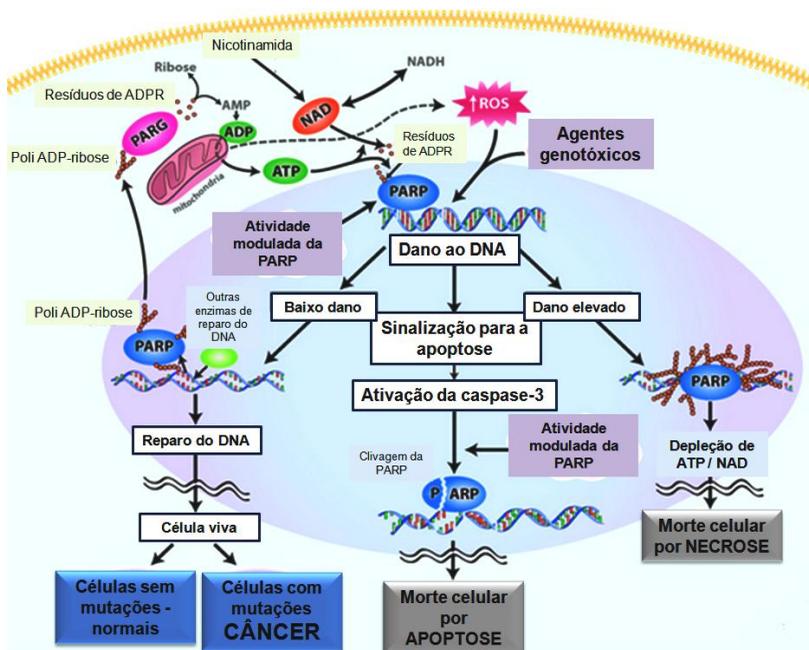
Os eventos finais da apoptose ativada por via intrínseca ocorrerem quando as caspases ativam a maquinaria de degradação do

DNA. Ou seja, as caspases irão clivar as enzimas PARP [poli (ADP-ribose) polimerase] e a DNA-PK, sinalizando para a fragmentação da cromatina (SPAGNOLO et al., 2012).

A PARP desempenha um papel importante no processo de reconhecimento de dano e reparo do DNA, uma vez que executa uma função organizacional da cromatina nuclear (BAI; CANTO, 2012). Ainda, possui relação direta com a morte celular mediada por p53, porém tal mecanismo não está totalmente elucidado (KRISHNAKUMAR; KRAUS, 2010).

A ativação da PARP em resposta aos danos ao DNA pode ter efeitos sobre a morte celular por necrose, uma vez que a atividade prolongada causa depleção de NAD^+ , que é alimentada pelo consumo de ATP (BERGER, 1985; OLEINICK; EVANS, 1985). Como o NAD^+ é um importante cofator para a glicólise, existe uma diminuição na produção de ATP, uma vez que a glicólise é retardada (YING et al., 2005). A depleção do NAD^+ acaba ocasionando a despolarização da membrana mitocondrial e consequente morte celular por necrose (YING et al., 2005; ALANO; YING; SWANSON, 2004). As vias de reparo de dano ao DNA e morte celular nas quais a PARP pode estar atuando estão mostradas na figura 10.

Figura 10 – Possíveis vias de atuação da PARP nos processos de morte celular.



A proteína poli (ADP-ribose) polimerase está envolvida tanto no processo de reparo do DNA quanto de ativação dos processos de morte celular, especialmente a apoptose. Agentes genotóxicos ou EROs, provenientes do metabolismo oxidativo mitocondrial ou de agentes externos, podem causar danos à molécula de DNA. Dependendo do índice de dano a célula irá sinalizar para a reparação do DNA ou ativação da caspase-3, que culminará com a clivagem da PARP e consequente morte celular por apoptose. Em caso de dano elevado, com depleção dos níveis de ATP e NAD, a PARP sinaliza a morte celular por necrose. Fonte: Adaptado de <http://www.rbej.com/content/7/1/143/figure/F3?highres=y>. Acesso eletrônico em 02 de setembro de 2014.

A necrose é um tipo de morte celular desregulada e traumática (EDINGER; THOMPSON, 2004). Neste processo a célula sofre um inchaço citoplasmático e mitocondrial, seguido de ruptura da membrana e liberação do conteúdo para o meio extracelular. Estes eventos ocasionam uma resposta inflamatória em células de tecidos vizinhos. Sendo assim, um grande número de células é afetado, ocorrendo alterações irreversíveis no tecido acometido pela necrose (MORGAN; LIU, 2013).

Nos últimos anos tem-se discutido um novo tipo de morte celular denominado de “necrose programada” (MORGAN; LIU, 2013), a qual é controlada por genes específicos. Apesar dos receptores de morte Fas e TNF- α estarem diretamente ligados à apoptose, discute-se o envolvimento dos mesmos na necrose programada (DEGTEREV et al., 2005). São várias as proteínas e vias envolvidas nesse tipo de morte celular, podendo-se citar: RIP1, RIP3, MLKL, PARP, AIF e envolvimento lisossomal (MORGAN; LIU, 2013).

Uma vez que as células tumorais desenvolvem um mecanismo de resistência à morte celular, principalmente a apoptose, fármacos que atuem diretamente ativando proteínas específicas na via de sinalização para a morte celular, são de extrema importância para a terapia do câncer.

1.3 TERAPIA DO CÂNCER

Atualmente, as principais terapias para o câncer são cirurgia, radioterapia, quimioterapia e a imunoterapia. No entanto, principalmente nos casos dos tumores mais agressivos, pode ocorrer uma ineficácia de cada um dos tratamentos isolados, sendo necessário o tratamento através da terapia combinada (LI; ZHAO; WANG, 2014). Geralmente, a cirurgia e/ou radioterapia são eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase.

A quimioterapia tem como objetivo principal destruir as células neoplásicas, preservando as normais. No entanto, os quimioterápicos em geral atuam de forma não seletiva, ou seja, acabam atacando tanto as células tumorais quanto as normais. Tem-se então, os inúmeros efeitos colaterais descritos para os medicamentos antineoplásicos. Sendo assim, a busca por novos fármacos antitumorais com menor toxicidade e um índice terapêutico mais elevado é de extremo interesse na comunidade científica.

Para o desenvolvimento de terapias inovadoras e mais eficazes, uma das alternativas envolve o aproveitamento das principais características biológicas e bioquímicas das células tumorais.

1.3.1 Moléculas capazes de induzir o estresse oxidativo intracelular e dano ao DNA

São vários os alvos terapêuticos de interesse para o desenvolvimento de novos quimioterápicos. Porém, o DNA é identificado como um dos alvos mais estudados (PALCHAUDHURI;

HERGENROTHER, 2007), uma vez que compostos que interagem com o DNA suprimem a replicação e a transcrição genética, desta forma bloqueando a divisão e resultando em morte celular (NIE et al., 2014; HURLEY, 2002).

Estudos mostram que a ligação de moléculas ao DNA pode ocorrer entre os seus pares de bases (intercalação) (KASHANIAN et al., 2012; WU et al., 2008) e interações com os sulcos menor e maior do DNA (KASHANIAN et al., 2011). Ainda, o acúmulo intracelular de EROs, gerado por agentes exógenos como no caso de alguns quimioterápicos, pode atacar o DNA causando um dano oxidativo capaz de levar à morte celular (YUAN; ADAMSKI; CHEN, 2010). Também, a toxicidade de alguns compostos está envolvida na morte celular via estresse do retículo endoplasmático (DEJEANS et al., 2010).

Lerman (1963) foi o primeiro a propor que moléculas orgânicas com estrutura planar podem ligar-se ao DNA por intercalação. Um dos fatores primordiais para um composto se intercalar ao DNA é que o mesmo contenha grupos planares aromáticos condensados em sua estrutura química (KASHANIAN; ZEIDALI, 2011). O processo de intercalação de uma molécula no DNA produz extensas alterações na cadeia de nucleotídeos, com consequência direta na replicação e transcrição do material genético (BHAKTA; SIVA, 2012). Agentes intercalantes tem sido extensivamente estudados nas últimas décadas e agentes representativos (elipticina, antraciclinas, acridinas e antraquinonas) são rotineiramente usados na clínica médica para o tratamento do câncer (SNYDER et al., 2005). Essas moléculas intercalantes interagem especialmente com as bases nitrogenadas citosina (C) e guanina (G) do DNA, provocando um espaçamento entre os pares de bases. A intercalação acaba resultando numa diminuição na torção helicoidal e alongamento do DNA (SHAHABUDDIN; GOPAL; RAGHAVAN, 2007; SNYDER, 2007).

As antraciclinas, uma classe de importantes compostos quinóides, estão entre os compostos mais efetivos e amplamente utilizados na terapia do câncer. Os principais mecanismos de ação das antraciclinas são: intercalação ao DNA, inibição da topoisomerase e geração de EROs (MINOTTI et al., 2004). No entanto, apesar de sua atividade antitumoral, o uso das antraciclinas é limitado, devido ao desenvolvimento de resistência das células tumorais ao fármaco, sérios problemas cardiovasculares, incluindo a insuficiência cardíaca congestiva (MORANDI et al., 2005).

Carvajal e colaboradores (2011) sintetizaram uma nova naftoquinona denominada TU100, com semelhança estrutural às

antraciclina, com a capacidade de parar o ciclo celular nas fases S e G2/M, seguido por indução da apoptose, porém sem intercalação no DNA. Gholivand; Kashanian; Peyman (2012) verificaram que as antraquinonas quinizarina (1,4-dihidroxi antraquinona) e dantron (1,8-dihidroxi antraquinona) têm a capacidade de intercalação e clivagem do DNA em células K562 (leucemia mieloide crônica), sendo estes mecanismos responsáveis pela citotoxicidade desses compostos.

Outro alvo muito importante na terapia do câncer é a família das enzimas topoisomerases, que possuem um papel essencial na replicação e transcrição gênica. Existem dois tipos principais de topoisomerases, a topoisomerase I e a topoisomerase II. Tais enzimas são importantes alvos para a terapia do câncer, pois compostos inibidores da topoisomerase podem levar a uma inibição da divisão celular e à morte celular (KOU et al., 2012). As antraciclina doxorubicina e daunorubicina, que possuem atividade intercalante no DNA, são quimioterápicos conhecidos também por exercer a atividade antitumoral através da inibição da topoisomerase II (HANDE, 1998).

Moléculas que têm a propriedade de ligar-se ao sulco maior ou menor do DNA, ao contrário da intercalação, não induzem grandes alterações conformacionais nesta molécula (JONATHAN, 1997). Como os intercalantes, as moléculas que se ligam aos sulcos do DNA também são úteis clinicamente, como é o caso da mitomicina, que provoca a alquilação do DNA (BISCHOFF; HOFFMANN, 2002). As antraciclina possuem ambas as atividades: intercalantes e ligantes aos sulcos do DNA.

Conforme citado anteriormente, as células tumorais usualmente exibem baixa atividade de enzimas antioxidantes. Este evento associado a distúrbios metabólicos acaba ocasionando um acúmulo intracelular de EROs (TRACHOOTHAM et al., 2006). É relatado que a manutenção de uma instabilidade genética no interior das células tumorais requer a presença de EROs para induzir modificações irreversíveis nos resíduos de aminoácidos de proteínas e lesões no DNA, levando a mudanças conformacionais e consequente perda da função biológica dessas biomoléculas (OTT, 2007; WU, 2006). Quimioterápicos como daunorubicina, doxorubicina e outras quinonas, como a menadiona, geram ânion superóxido pela redução do oxigênio molecular (VERRAX et al., 2011). Certas moléculas atuam diretamente na cadeia respiratória, inibindo o complexo III e gerando EROs nas mitocôndrias, como é o caso do Adaphostin (LE et al., 2007). Outras têm a capacidade de agir diretamente em moléculas envolvidas nas defesas antioxidantes como, por exemplo, causando a depleção de GSH e inibindo a síntese de

enzimas antioxidantes, como é o caso do isocianato e dos derivados da aziridina (Imexon) (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009).

As EROs intracelulares, principalmente o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, têm a capacidade de causar danos oxidativos na fita dupla do DNA (JIANG et al., 2007; BENITEZ-BRIBIESCA; SANCHEZ-SUAREZ, 1999). Dependendo da eficiência do sistema gerador de H_2O_2 , a molécula de DNA pode ser completamente danificada (CERVANTES-CERVANTES et al., 2005). O radical hidroxil produzido via reação de Fenton-Haber-Weiss, causa a subtração de um átomo de hidrogênio do anel da desoxirribose e um rearranjo no anel do açúcar resulta na quebra da fita do DNA (JIANG et al., 2007).

Um estresse oxidativo exarcebado pode também contribuir para os mecanismos de morte celular, uma vez que as EROs funcionam como mensageiros de sinalização para alguns processos de morte (BYUN et al., 2008; KIM et al., 2007; LIN et al., 2004). A ativação prolongada por EROs da proteína cinase ativada por estresse (JNK) é um importante fator para a morte celular (VENTURA et al., 2006; TOBIUME et al., 2001). Morgan e Kim (2014) relatam que as EROs contribuem para a ativação de JNK, por meio da ativação de MAP3K ASK1, salientado que a sinalização de JNK via EROs geralmente contribui para a morte celular por necrose (MORGAN; LIU, 2013).

Além dos quimioterápicos usados na clínica médica cujo mecanismo de ação é a geração de EROs, outros tantos agentes geradores de EROs estão em fase clínica de experimentação, sendo utilizados sozinhos ou em combinação com outro agente quimioterápico com vistas a uma maior seletividade e menor toxicidade para células normais (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009).

O mecanismo de ação de alguns compostos e agentes citotóxicos está relacionado à geração de EROs e consequente aumento de expressão da γ H2AX. Moléculas inibidoras da topoisomerase II, tais como topotecano, camptotecina e mitoxantrona, induzem danos à dupla fita do DNA e consequente fosforilação da H2AX (HUANG; TRAGANOS; DARZYNKIEWICZ, 2003). Os fármacos doxorrubicina, bleomicina e etoposídeo causam quebra na dupla fita de DNA, sendo este efeito relacionado ao aumento da expressão da γ H2AX (BANATH; MACPHAIL; OLIVE, 2004). Taneja e colaboradores (2004) descreveram que a expressão aumentada de γ H2AX é particularmente importante e utilizada como marcador de dano celular após a radioterapia. Tem-se relatado que a combinação de agentes citotóxicos, como o princípio ativo vorinostat, com a radioterapia pode melhorar o

efeito deste fármaco, aumentando o índice de dano nas células tumorais, observado pela expressão acentuada de γ H2AX (MUNSHI et al., 2006).

Hussain e colaboradores (2011) verificaram que a timoquinona, uma quinona isolada da planta *Nigella sativa*, induz a apoptose e inibe a ativação da via Akt através da geração de EROs, com aumento de Bax/Bcl-2 em modelo de linfoma. Resultados semelhantes foram encontrados por Massaoka e colaboradores (2012) ao estudarem o efeito da benzoquinona jacaranona, extraída da *Pentacalia desidetabilis*, em um modelo de melanoma *in vivo*. Esse trabalho mostrou que a benzoquinona desenvolveu atividade antitumoral a partir da regulação negativa da via Akt mediada pela geração de EROs. Ainda, EROs gerados por outras classes de compostos que não quinonas, como o fitoquímico coumestrol e o anti-helmíntico bitionol, são capazes de induzir a inibição da via da PI3K/Akt em células tumorais (CHO et al., 2014; AYYAGARI; BRARD, 2014).

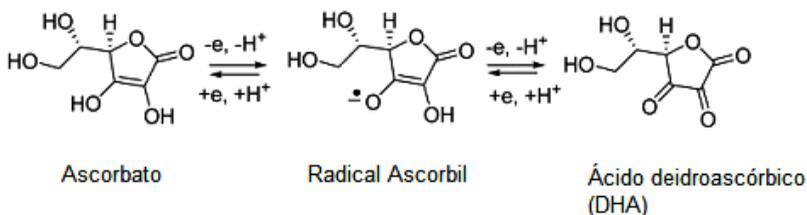
1.3.2 Associação quinonas e ascorbato de sódio na terapia antitumoral

1.3.2.1 Ascorbato de sódio

O ascorbato (Asc), também conhecido como vitamina C ou ácido ascórbico, é uma lactona de fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ e faz parte da classe das vitaminas hidrossolúveis. Foi isolado pela primeira vez em 1928 pelo bioquímico e Prêmio Nobel, Szent-Gyorgyi. A vitamina C é um antioxidante natural facilmente oxidável, cujas duplas ligações podem ser atacadas pelo oxigênio, por bases alcalinas e temperaturas elevadas. Sendo assim, a vitamina C pode existir em duas formas: a reduzida e a oxidada.

O ascorbato é um potente agente redutor, podendo doar um ou dois elétrons em reações redox, produzindo o radical ascorbil e ácido deidroascórbico (DHA), respectivamente (MAY, 1999), como mostrado na figura 11.

Figura 11 – Formas redox do ácido ascórbico.



Em pH fisiológico, o ácido ascórbico encontra-se na sua forma monovalente, ânion ascorbato. O ascorbato pode ser oxidado, ou seja, transferir um elétron para o radical ascorbil, o qual será imediatamente oxidado a ácido deidroascórbico (DHA). Ambos, radical ascorbil e ácido deidroascórbico, podem ser novamente reduzidos a ascorbato, a partir da atividade de enzimas redutases. Fonte: Adaptado de CORTI; CASINI; POMPELLA, 2010.

Os seres humanos, demais mamíferos e a maioria dos vertebrados obtêm a vitamina C apenas de forma exógena, cuja absorção pode ocorrer na mucosa bucal, estômago e notadamente no intestino delgado. Os sistemas de transporte associados à membrana plasmática celular determinam a distribuição da vitamina C entre os fluidos intra e extracelulares. O fluxo desta vitamina para dentro e fora da célula é essencialmente controlado por difusão facilitada e por transporte ativo, os quais são mediados por proteínas de membrana de classes diferentes: os transportadores de glicose (GLUT) e transportadores de vitamina C dependentes de sódio (SVCT – *sodium vitamin C cotransporters*) (LI; SCHELLHORN, 2007; WILSON, 2005).

O ascorbato pode ser diretamente transportado para o interior das células por mecanismos de transporte ativo controlado pelo SVCT. Baseado nos valores de constantes k_m , os SVCT têm maior afinidade para o ascorbato do que os GLUT. Através desse transportador, o ascorbato é transportado por um mecanismo de transporte acoplado ao sódio. Consequentemente, o excesso de sódio intracelular é ativamente exportado por troca de potássio extracelular através da bomba sódio-potássio ATPase. Os SVCT possuem duas isoformas: SVCT1 e SVCT2. Acredita-se que o SVCT2 tenha maior afinidade, porém, menor capacidade de transporte do ascorbato que o SCVT1 (MEREDITH; HARRISON; MAY, 2011). É importante ressaltar que os mecanismos de transporte do ascorbato variam conforme os tipos celulares, nos quais o transporte pode ser alterado conforme a afinidade de ligação ao substrato, a capacidade de translocação de cada transportador ou ao

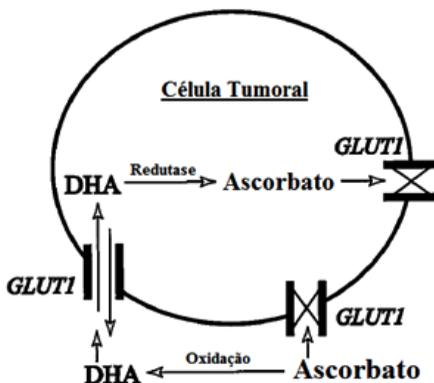
número de proteínas transportadoras presentes na membrana plasmática (RUMSEY; LEVINE, 1998).

Os GLUT são típicos transportadores de glicose. Porém, o DHA também pode transpor a membrana plasmática através de um mecanismo específico de difusão facilitada, transporte a favor do gradiente de concentração, mediado pelos transportadores GLUT. Isto se deve ao fato da estrutura química do DHA ser muito semelhante à estrutura química da glicose. A difusão facilitada é usada indiretamente pela célula para transportar a forma reduzida do ascorbato, para o interior da célula em três etapas: (I) oxidação extracelular do ascorbato com a formação do DHA, (II) transporte do DHA pelos GLUT para o interior da célula e (III) a redução intracelular do DHA em ascorbato. Contudo, verifica-se uma competição entre as moléculas de DHA e glicose pelos GLUT, a qual é dependente do tipo de células em questão e, conseqüentemente, irá interferir na captação de ambas (LI & SCHELLHORN, 2007; WILSON, 2005).

Os transportadores GLUT estão superexpressos em alguns tipos de tumor (MEDINA; OWEN, 2002). O nível de expressão desses transportadores, particularmente do GLUT1, pode ser um marcador adequado para os níveis de hipóxia e o exacerbado metabolismo da glicose nos tumores (AIRLEY et al., 2001). Também, a superexpressão dos transportadores GLUT em células tumorais pode ser de extrema valia nos métodos de diagnósticos do câncer (SZABLEWSKI, 2013), como no caso do uso da PET (tomografia por emissão de pósitron) utilizando o elemento marcado ^{18}F -2-fluoro-2-deoxi-D-glicose (^{18}F -FDG), uma vez que este utiliza o GLUT para penetrar na célula cancerígena e, conseqüentemente, marcá-la.

Os ânions superóxido gerados em excesso no microambiente tumoral oxidam o ascorbato em DHA. O DHA, por sua vez, é acumulado no interior da célula tumoral após a sua redução em ascorbato (Figura 12).

Figura 12 – Proposta para o mecanismo de transporte e acúmulo de ascorbato em células tumorais.



O ácido ascórbico presente no meio extracelular é oxidado a ácido deidroascórbico (DHA) no microambiente tumoral, por exemplo, pelo ânion superóxido. O DHA é então transportado para o interior da célula pelo transportador GLUT1 presente na superfície da membrana da célula tumoral, onde é reduzido a ácido ascórbico, permanecendo no meio intracelular. Fonte: AGUS; VERA; GOLDE, 1999.

A célula do câncer é sensível a altas concentrações de ascorbato, pois a acidez do microambiente tumoral contém altos níveis de metais de transição, que facilitam a reação de Fenton com o ascorbato, gerando ainda mais EROs (ULLAH et al., 2011). A incapacidade das células cancerígenas em neutralizar os radicais livres gerados é reportada como a responsável pelo efeito antitumoral do ascorbato (CASTRO et al., 2014).

Em elevadas concentrações, ou concentrações farmacológicas, o ascorbato apresenta um efeito citotóxico associado à inibição da proliferação celular, sendo este efeito associado à atividade pró-oxidante, ou seja, aumenta o estresse oxidativo intracelular (VERRAX; CALDERON, 2009; PADAYATTY et al., 2004). As EROs geradas pelo ascorbato via reação de Fenton ocasionam a quebra oxidativa do DNA (CARR; FREI, 1999), ativam vias de sinalização que conduzem à parada do ciclo celular e à morte celular em linhagens de células tumorais (McELIGOT; YANG; MEYSKENS, 2005).

O mecanismo de citotoxicidade seletiva do ascorbato ainda não está totalmente elucidado. Porém, tem sido especulado que a seletividade pode estar relacionada a uma maior expressão dos

transportadores de membrana GLUT nas células do câncer, que contribui para a captação de ascorbato e conseqüente incremento das concentrações intracelulares de EROs (VERRAX; CALDERON, 2009; PADAYATTY; LEVINE, 2000).

Estudos *in vitro* com várias linhagens celulares demonstraram que concentrações farmacológicas de ascorbato (0,3-20 mM) causam a morte de células tumorais, preservando as células normais, conferindo desta forma, uma citotoxicidade seletiva (VERRAX et al., 2009; CHEN et al., 2005; KANG et al., 2003). Estudos clínicos demonstraram que altas concentrações plasmáticas de ascorbato podem ser alcançadas a partir da administração intravenosa de forma segura e eficaz para a terapia do câncer (RIORDAN et al., 2005; RIORDAN et al., 2004). Apesar de prévios estudos clínicos mostrarem que a terapia intravenosa com ascorbato parece segura, certa atenção é necessária em determinadas condições. A remoção de H₂O₂ gerado no sangue requer glutathiona, a qual necessita de NADPH gerado pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) da via da pentose fosfato (TIAN et al., 1999). Portanto, altas doses de ascorbato podem induzir hemólise intravascular em pacientes com deficiência de G6PD (REES; KELSEY; RICHARDS, 1993). Um dos produtos finais da oxidação do ascorbato é o ácido oxálico, que pode cristalizar como oxalato de cálcio em pacientes com insuficiência renal (WONG et al., 1994).

1.3.2.2 Quinonas

Há tempos que as quinonas naturais e sintéticas despertam o interesse da comunidade científica por apresentarem uma atividade antitumoral particularmente interessante (WOO et al., 2012; NEIDNIGHT; SCHOBERT, 2011). Esta família de compostos é originalmente considerada como pigmento, devido à coloração que varia do verde ao vermelho, sendo derivados de hidrocarbonetos como o benzeno, o naftaleno, o antraceno ou outros, nos quais duas olefinas são substituídas por duas carbonilas, com um rearranjo das duplas ligações, dando origem ao núcleo quinóide, uma estrutura dicetona completamente conjugada.

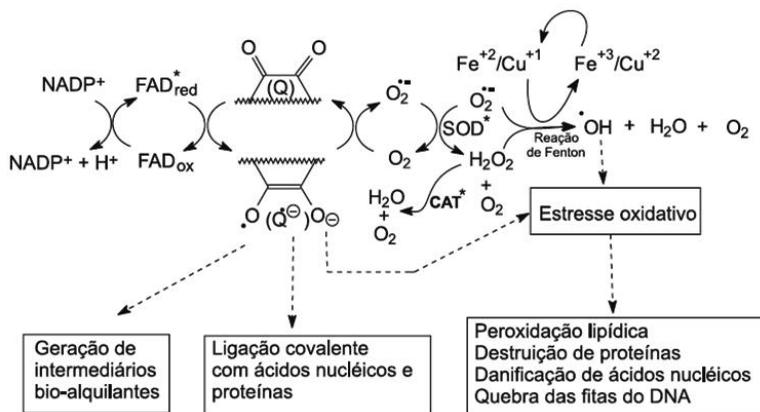
Consideráveis esforços são feitos para entender os mecanismos envolvidos no potencial efeito antitumoral das quinonas, particularmente as naftoquinonas. Dois fatores principais são aceitos para explicar o efeito citotóxico desses compostos: a capacidade intracelular de gerar EROs e a eletrofilicidade que permite formar adutos com alguns constituintes celulares (KVIECINSKI et al., 2012).

Na década de 60, iniciaram-se as pesquisas em estágio clínico com a daunorrubicina, para o tratamento de leucemia aguda e linfoma. Atualmente, vários fármacos derivados das quinonas são utilizados como agentes quimioterápicos (VERMA, 2006). Como exemplos, pode-se citar a mitomicina, que é um agente antitumoral derivado de *p*-benzoquinona, bem como a doxorrubicina, antraciclina e daunorrubicina, as quais possuem uma antraquinona em suas estruturas (KITAGAWA et al., 2004).

A doxorrubicina é um metabólito secundário produzido pela bactéria *Streptomyces* e amplamente utilizado no tratamento do câncer. No entanto, a aplicação clínica é limitada devido a um início precoce de resistência, além de restrições de doses devido à toxicidade cardíaca (ICHIKAWA et al., 2014). Devido a estes efeitos, derivados quinonas têm sido testados nos últimos anos com vistas no desenvolvimento de fármacos com maior seletividade para o tratamento do câncer (SIEGEL; YAN; ROSS, 2012; HUSSAIN et al. 2011).

É relatado que o efeito citotóxico e antitumoral exercido por quinonas e compostos que contêm o núcleo quinona nas estruturas moleculares estão relacionados à biotransformação, a qual envolve uma redução enzimática da quinona por um ou dois elétrons (VÁSQUEZ et al., 2010). Esta redução ocorre nas células tumorais, sendo catalisada pela flavoenzima NADPH como doador de elétrons, resultando na formação de um radical semiquinona. O radical semiquinona pode doar o elétron extra ao oxigênio molecular gerando EROs, principalmente ânion superóxido. Tanto o radical semiquinona, quanto o ânion superóxido podem mediar a geração do radical hidroxila, causando um ataque oxidativo a biomoléculas, como o DNA, e conseqüentemente induzindo a quebra desta macromolécula (VERMA, 2006; GUTIERREZ, 2000). Este processo que envolve a redução catalisada por uma redutase, seguida por oxidação realizada pelo oxigênio molecular é conhecida como “ciclo-redox”, processo gerador de radicais livres, conforme apresentado na figura 13 (GUTIERREZ, 2000).

Figura 13 – Ciclo redox induzido por quinonas.



Fonte: SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003.

As quinonas, principalmente as naftoquinonas e as antraquinonas, são capazes de interagir com o DNA por reações de intercalação ou alquilação (FARRELL et al., 2013). No entanto, a clivagem oxidativa ocasionada pelas EROs provenientes do ciclo redox das quinonas está relacionada à ruptura da cadeia do DNA, e esta oxidação configura entre os principais efeitos das quinonas (FARRELL et al., 2013).

As 1,4-naftoquinonas que possuem um grupo amino ou grupo amino substituído na posição 2 são objeto intenso de estudo devido aos efeitos biológicos como agentes antituberculose, antimaláricos, larvicidas, herbicidas, fungicidas e agentes antitumorais (CLARK, 1984; SILVER; HOLMES, 1968). A presença do átomo de nitrogênio permite a modulação dos efeitos dos substituintes nas propriedades eletrônicas do sistema quinona, bem como modificação da geometria da molécula neutra e a redução a intermediários (BENITES et al., 2010). Benites e colaboradores (2010) já demonstraram que mudanças estruturais na inserção de um átomo de cloro no núcleo quinona e/ou a inserção de um átomo de nitrogênio no grupo metil do grupo fenilamino doador induzem a uma significativa mudança na atividade citotóxica.

A quinona juglona mostrou efeito antitumoral frente a algumas linhagens celulares, como células de câncer gástrico SGC-7901 (JI; QU; ZOU, 2011) e células leucêmicas HL-60 (XU et al., 2010), causando morte celular por apoptose. No entanto, a necrose foi observada em células de melanoma B16F1 expostas ao tratamento com juglona

(AITHAL et al., 2009). Resultados semelhantes também foram observados para linhagens de câncer de próstata (T24) (KVIECINSKI et al., 2013). Já as naftoquinonas fenilaminonaftoquinona-7 (Q7) e fenilaminonaftoquinona-9 (Q9) mostraram efeito citotóxico em várias linhagens celulares testadas, como DU145 (câncer de próstata), T24 (câncer de bexiga) e MCF7 (câncer de mama), não ocorrendo citotoxicidade em células normais testadas (fibroblastos 3T3 BALB), surgindo evidências de uma possível seletividade para células tumorais (BENITES et al., 2010).

1.3.2.3 Associação de quinonas e ascorbato de sódio como terapia eficaz para o tratamento do câncer

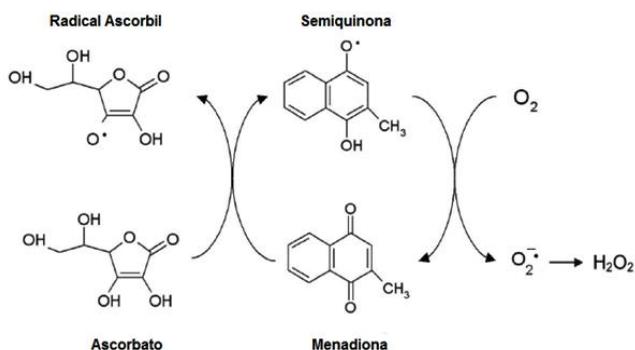
Estudos prévios já demonstraram que quinonas associadas a doses farmacológicas de ascorbato de sódio geram um ciclo redox com formação considerável de EROs, potencializando o efeito antitumoral das quinonas, evidenciando o sinergismo entre esses compostos (VÁSQUEZ et al., 2012; VERRAX et al., 2006).

Verrax e colaboradores (2005) desenvolveram uma estratégia particular de indução de morte celular a partir da exposição seletiva de células tumorais a um estresse oxidativo induzido pela geração de EROs no ciclo redox entre o ascorbato e uma quinona sintética, a menadiona. Este efeito pode ser explicado sob três aspectos principais: primeiro, as células tumorais são mais sensíveis ao estresse oxidativo devido à baixa atividade de enzimas antioxidantes; segundo, o ascorbato é preferencialmente captado pelas células tumorais, devido à superexpressão dos transportadores GLUT; e terceiro, as células tumorais mostram um fenótipo glicolítico, necessário para sobrevivência e invasão de tecidos adjacentes. Em contrapartida, não há como desconsiderar o processo de biorredução das quinonas pelas redutases, que leva à formação de radicais livres, por exemplo, o radical semiquinona. Tal semiquinona, conforme citado anteriormente, é rapidamente reoxidada para sua forma quinona pelo oxigênio molecular, havendo geração de EROs como $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 e HO^{\bullet} , que podem causar uma cascata de reações, incluindo peroxidação lipídica, oxidação protéica e dano ao DNA, culminando em morte celular. Assim, o ascorbato tem a capacidade de potencializar o ciclo de oxirredução das quinonas, gerando EROs as quais causam um dano oxidativo irreversível ao DNA.

Como já demonstrado anteriormente por Verrax e colaboradores (2011), o ascorbato pode reduzir algumas quinonas, como a menadiona,

gerando um radical semiquinona que pode ser re-oxidado pelo oxigênio molecular. O resultado final desta reação é a produção de anion superóxido, o qual é convertido em peróxido de hidrogênio (Figura 14). Portanto, a combinação do ascorbato e quinonas exibe um efeito sinérgico entre esses dois compostos, indicando a ativação do ciclo redox como o principal mecanismo de ação para a citotoxicidade. Vários estudos revelam que a morte celular induzida por esta associação está diretamente relacionada ao aumento do estresse oxidativo intracelular (VERRAX et al., 2006; VERRAX et al., 2005).

Figura 14 – O ascorbato de sódio ativa o ciclo redox da quinona menadiona.



Fonte: Adaptado de BECK et al., 2011.

Por fim, a associação quinonas/ascorbato também pode desregular a homeostase do cálcio e gerar um estresse diretamente no retículo endoplasmático das células cancerígenas (KVIECINSKI et al., 2012; DEJEANS et al., 2010). O cálcio é rapidamente liberado a partir do retículo endoplasmático para o citosol, induzindo um estresse reticular, sendo este um importante evento para a morte das células tumorais.

A atividade antitumoral de derivados quinonas em associação ao ascorbato foi demonstrada em um trabalho utilizando diferentes linhagens celulares, tais como MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (câncer de pulmão), e SF-268 (CNS câncer) (BENITES et al., 2008a), e esse tratamento mostrou-se seletivo quando comparado com células normais, como fibroblastos (BENITES et al., 2008b). Benites e colaboradores (2009) reportam que naftoquinonas, na ausência ou

presença de ascorbato de sódio, podem alterar a sobrevivência de células de hepatocarcinoma.

Segundo Taper e colaboradores (1996), o aumento da citotoxicidade, consequência da associação do ascorbato à quinona menadiona, pode ser explicada pelo próprio ciclo redox ocorrido entre ambos e que culmina em indução de estresse oxidativo, conforme citado anteriormente. Verrax e colaboradores (2009) propõem que este efeito pode ter alguma seletividade, uma vez que o ascorbato, em elevadas concentrações, deve ser preferencialmente captado pelas células cancerígenas, visto que estas células superexpressam os transportadores GLUT, devido ao fato de serem altamente dependentes da glicólise, pois apresentam altas taxas de *turnover* celular (BENITES et al., 2009).

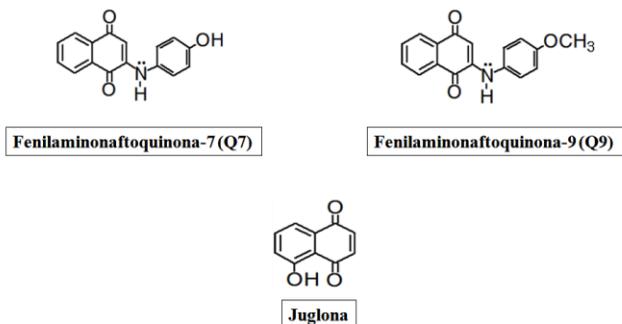
Vásquez e colaboradores (2012), ao estudarem a associação de aminopirimidisoquinolinoquinona (APIQ) e ascorbato em várias linhagens celulares tumorais, verificaram que a mesma causou um aumento da citotoxicidade em decorrência do estresse oxidativo intracelular, bem como aumento do estresse do retículo endoplasmático através da ativação da fosforilação de eIF2 α e morte celular independente de caspase-3.

Sabe-se também que a associação quinonas/ascorbato afeta a via da MAPK e a atividade da proteína chaperona HSP90, que desempenha um papel crucial na estabilidade de algumas proteínas como Bcr-Abl, Akt, RIP e p53 mutado, as quais são essenciais para progressão da malignidade (NECKERS, 2003). Beck e colaboradores (2009a) verificaram que a associação menadiona/ascorbato, em células de câncer de mama (MCF-7), causou a inibição da proliferação celular através da ativação da via p38 MAPK e desativação da via ERK, via esta ativada em inúmeros tipos de câncer.

Beck e colaboradores (2009b) concluíram que o estresse oxidativo ocasionado pela associação da quinona menadiona ao ascorbato induziu a quebra da HSP90 e a degradação de proteínas clientes, tais como RIP, Akt ou Bcr-Abl em linhagens celulares de leucemia. É bem descrito na literatura que a proteína HSP90 desempenha um importante papel na estabilidade de proteínas oncogênicas, e portanto, a clivagem desta proteína seria interessante na terapia contra o câncer.

As quinonas juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona), Q7 (2-(4-hidroxianilino)-1,4-naftoquinona) e Q9 (2-(4-metoxianilino)-1,4-naftoquinona), cujas estruturas estão apresentadas na figura 15, há tempos são estudadas pelo Labioex com resultados promissores para a terapia antitumoral.

Figura 15 – Estrutura química das quinonas Q7, Q9 e juglona.



Fonte: Do autor.

A juglona é um pigmento encontrado naturalmente em raízes, caules, cascas, folhas e frutos de noqueiras (*Juglans* sp. – Juglandaceae) (AITHAL et al., 2009). Porém, sua forma sintética já é comercializada. A Q7 e a Q9 foram sintetizadas pelo processo de aminação de 1,4-naftoquinona com as respectivas arilaminas, em condições aeróbicas, utilizando $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ como ácido de Lewis, conforme descrito por Benites et al. (2010).

A juglona associada ao ascorbato, em células de tumor de bexiga (T24), através da ativação do ciclo redox e aumento do estresse oxidativo intracelular, foi capaz de causar alterações morfológicas nas células, inibir a proliferação, bem como causar a morte celular por um mecanismo semelhante à necrose (KVIECINSKI et al. 2012). As naftoquinonas Q7 e Q9 causaram inibição da proliferação celular (células T24) na presença de ascorbato, via ativação do ciclo redox. Ainda, os autores relatam que o efeito antitumoral destas quinonas envolve um fenótipo senescente das células tumorais, o que provoca mudanças nas vias de sinalização de MAPK e prejudica a função celular, levando à morte celular por necrose (FELIPE et al., 2013).

Neste sentido, diante dos resultados obtidos até o momento para as associações da juglona, Q7 e Q9, ao ascorbato de sódio, torna-se primordial o avanço das pesquisas com essas associações de compostos visando uma possível triagem da associação mais promissora para o tratamento do câncer.

2. JUSTIFICATIVA DA PROPOSTA

A ocorrência significativa de casos de câncer é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo ocidental. Em 2008, a *The International Agency for Research on Cancer* estimou a ocorrência de ~ 12,4 milhões de novos casos e ~ 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo a cada ano. Para 2030 está previsto um crescimento no número de mortes de ~ 12 milhões de pessoas em decorrência desta doença, segundo órgãos internacionais de saúde. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de pessoas com algum tipo de câncer vem aumentando significativamente, em todo o país a cada ano, seguindo o mesmo perfil de magnitude observado para o restante do continente americano. Os tipos mais incidentes são, à exceção do câncer de pele não melanoma, os cânceres de próstata, de pulmão e de bexiga no sexo masculino e de mama e colo do útero no sexo feminino.

As altas taxas de mortalidade ocasionadas pelo câncer estão diretamente relacionadas ao fato da doença ser diagnosticada em estágios avançados e, em alguns casos, aos efeitos citotóxicos ocasionados pelos tratamentos convencionais (quimioterapia e radioterapia).

A quimioterapia é um tratamento sistêmico, pois embora os efeitos citotóxicos dos agentes quimioterápicos sejam esperados apenas para as células cancerígenas, que se dividem rapidamente, células normais de rápido crescimento, como as células sanguíneas, as células da membrana mucosa que reveste os órgãos internos e os folículos pilosos também sofrem muito os efeitos dos agentes antitumorais, resultando em efeitos adversos.

Embora já existam fármacos consagrados para o tratamento do câncer, como é o caso das antraciclina, a maioria das abordagens terapêuticas atuais não são capazes de regredir as diferentes manifestações dos tumores malignos, ou mesmo reduzir significativamente sua toxicidade, efeitos adversos e a multiresistência à quimioterapia (MDR). Portanto, quando se considera o tratamento do câncer, as pesquisas por novas substâncias ativas que possam substituir as disponíveis com vantagens relacionadas à eficácia e à segurança são consideradas fundamentais.

O grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Rozangela Curi Pedrosa, em parceria com o *Toxicology and Cancer Biology Research Group*, da Université Catholique de Louvain (Bélgica), coordenado pelo Dr. Pedro Buc Calderón e com o Dr. Julio Benites da Universidad

Arturo Prat (Chile), há anos tem focado seus estudos em naftoquinonas com atividade antitumoral. Tais estudos compreendem desde a síntese de baixo custo e alta eficiência de novos derivados quinóides e testes da potencial atividade quimioterápica desses compostos em associação ao ascorbato de sódio para potencializar o ciclo redox das quinonas e aumentar a produção de EROs. Uma das razões mais frequentemente apresentada para as pesquisas com quinonas na terapia do câncer é o fato de as células cancerígenas serem mais susceptíveis ao dano oxidativo ocasionado pelas EROs do que as células normais.

Dentro desse contexto, a juglona, a fenilaminonaftoquinona-7 e fenilaminonaftoquinona-9, em associação ao ascorbato, há algum tempo vêm sendo testadas com promissores resultados antitumorais *in vitro*. Levando-se em conta tais resultados e o efeito antitumoral evidente para as três associações, o presente trabalho visa triar qual das associações seria a mais promissora para o tratamento do câncer usando um modelo *in vivo*, e ainda tentar elucidar o possível mecanismo de ação dessas associações.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi dar continuidade aos estudos sobre o efeito antitumoral das naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 em associação ao ascorbato de sódio, bem como avaliar a melhor associação para o tratamento do câncer a partir dos efeitos obtidos *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito direto das naftoquinonas e associações ao ascorbato de sódio sobre o DNA;
- Avaliar em células MCF-7:
 - A citotoxicidade das naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 administradas isoladamente e em associação ao ascorbato de sódio;
 - A geração de EROs intracelulares ocasionada pelas naftoquinonas isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio;

- O possível efeito das EROs geradas pelos tratamentos sobre o DNA celular;
 - A atividade antiproliferativa das naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 isoladas e em associação ao ascorbato de sódio;
- Avaliar *in vivo*:
- A inibição do crescimento tumoral e o efeito sobre a sobrevida dos animais causados pela juglona, Q7 e a Q9 isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio;
 - A geração de EROs através da avaliação de marcadores de estresse oxidativo;
 - O efeito sobre o DNA celular ocasionado pelas naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio, bem como a consequência deste efeito sobre a via de proliferação celular PI3K/pAkt/mTOR;
 - O efeito das naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio sobre o ciclo celular e proteínas envolvidas no controle do mesmo;
 - O tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio;
 - A partir de uma análise *ex vivo*, avaliar se os tratamentos com as naftoquinonas em estudo e as associações com o ascorbato de sódio são capazes de interferir na captação de glicose pelas células tumorais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes químicos e anticorpos

O meio de cultura modificado de Eagle (DMEM), o soro fetal bovino e os antibióticos utilizados na cultura de células foram adquiridos da Gibco (EUA). Os seguintes reagentes foram comprados da Sigma-Aldrich (EUA): juglona, ascorbato de sódio, *calf thymus* DNA (CT-DNA), agarose, dimetil-sulfóxido (DMSO), 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzólico) (DTNB), albumina de soro bovino (BSA), brometo de etídio (EtdBr), ácido tiobarbitúrico (TBA), coquetel inibidor de protease, catalase (CAT), glutationa redutase, dinucleotídeo de nicotinamida e adenosina fosfato reduzido (NADPH) e doxorubicina. O coquetel inibidor de

fosfatase foi adquirido da Calbiochem (Merck Biosciences). O kit quimioluminescente para detecção das bandas de proteínas (*horseradish peroxidase* – HRP) foi adquirido da Millipore (EUA). Todos os demais reagentes químicos foram usados com grau de pureza atendendo as normas da *American Chemical Society* (ACS). Os anticorpos primários e secundários utilizados na parte I desta tese estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Anticorpos primários e secundários utilizados na parte I desta tese.

Anticorpos primários	Tipo	Referência	Uso e diluição
Anti- γ H2AX (Ser 139)	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-101696)	WB (1:1000)
Anti-PARP	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-7150)	WB (1:1000)
Anti-pAkt (Ser 473)	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-7985-R)	WB (1:1000)
Anti-p16	<i>Rabbit polyclonal</i>	Cell Signaling Technology (#4824)	WB (1:1000)
Anti-Ciclina A	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-596)	WB (1:1000)
Anti-p53	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-6243)	WB (1:1000)
Anti-Bax	<i>Mouse monoclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-7480)	WB (1:500)
Anti-Bcl-xL	<i>Mouse monoclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-8392)	WB (1:500)
Anti- β Actina	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-7210)	WB (1:1000)
Anticorpos secundários	Tipo	Referência	Uso e diluição
Anti-rabbit IgG	<i>Goat polyclonal</i>	Merck Millipore (AP 132P)	WB (1:10000)
Anti-mouse IgG	<i>Goat polyclonal</i>	Merck Millipore (AP 181P)	WB (1:10000)

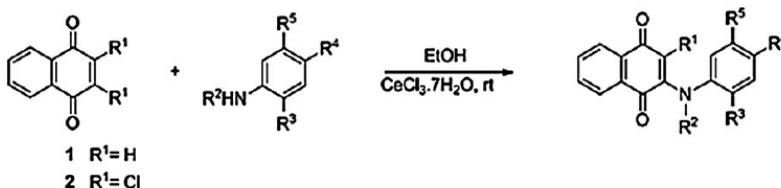
WB (*Western blot*). Fonte: Do autor.

4.2 Síntese das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9

A síntese da fenilaminonaftoquina-7 [2-(4-hidroxianilino)-1,4-naftoquinona] e da fenilaminonaftoquinona-9 [2-(metoxianilino)-1,4-naftoquinona] foi realizada pela equipe do Prof. Dr. Julio Benites, do

Laboratório de Química Orgânica, da Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile. A obtenção dos compostos deu-se a partir da aminação de 1,4-naftoquinonas com suas respectivas arilaminas, utilizando $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como catalisador ácido de Lewis, conforme descrito por Benites e colaboradores (2010) (Figura 16). Posteriormente à síntese, os compostos foram fornecidos para o desenvolvimento deste estudo.

Figura 16 – Reação de síntese das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9.



Fonte: BENITES et al., 2010.

4.3 Avaliação dos danos diretos das naftoquinonas isoladas ou associadas ao ascorbato de sódio sobre o CT-DNA

4.3.1 Intercalação ao CT-DNA

A intercalação ao DNA foi avaliada utilizando o brometo de etídio como padrão de agente intercalante ao DNA, sendo as medidas de fluorescência realizadas no leitor TECAN Infinity M200, conforme adaptação da metodologia descrita por Silveira e colaboradores (2008). O comprimento de onda de excitação foi de 492 nm e de emissão 620 nm. O CT-DNA (12,17 mM) foi diluído em tampão fosfato 50 mM contendo 0,1 M de cloreto de sódio (NaCl) em pH 7,4. O NaCl foi utilizado para evitar uma segunda fixação do brometo de etídio nos sítios do DNA.

A concentração de CT-DNA utilizada neste estudo foi de 10 μM . O espectro de emissão do brometo de etídio, na ausência e na presença de CT-DNA, foi registrado variando-se a concentração na faixa de 1 a 100 μM , obtendo-se a concentração de saturação em 3 μM . A seguir o experimento foi conduzido com concentrações crescentes das naftoquinonas em estudos (0 – 50 μM) na presença ou ausência de ascorbato (1 mM). Os espectros foram registrados em temperatura ambiente após 10 minutos da adição dos compostos. A doxorrubicina (0

– 50 μM) foi utilizada como controle positivo para a intercalação ao CT-DNA.

4.3.2 Clivagem oxidativa do CT-DNA

A clivagem oxidativa do CT-DNA foi avaliada segundo o método proposto por Jun e colaboradores (2007). Este método baseia-se no princípio de que as EROs, especialmente o peróxido de hidrogênio, gerados pelos compostos em estudo, atacam o DNA, especialmente no C4 da desoxirribose, ocasionando uma quebra oxidativa desta molécula, tendo como produto a base propenal. Esta base tem a capacidade de reagir com o ácido tiobarbitúrico originando a cor da reação.

Em eppendorf foram adicionados: CT-DNA 0,5 mM diluído em 50 mM de tampão fosfato (pH 7,2), as naftoquinonas (10 μM) e o ascorbato (1 mM). Esta mistura foi incubada a 37 °C durante 2 h. Tanto as naftoquinonas quanto o ascorbato foram testados isolados e em associação. Após o tempo de incubação, uma solução de ácido tiobarbitúrico (1%) em hidróxido de sódio (NaOH) 50 mM e ácido acético glacial foram adicionados (1:1:1) e incubados a 100 °C por 30 min. Passados os 30 min de incubação as amostras foram refrigeradas e a absorbância foi medida a 532 nm em leitor TECAN Infinity M200. O controle negativo continha todos os componentes exceto as naftoquinonas e o ascorbato. Como controle positivo foi utilizado $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ (100 μM) e peróxido de hidrogênio (10 mM).

4.4 Ensaios biológicos *in vitro*

4.4.1 Cultura de células MCF-7

As células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil. As células foram cultivadas e mantidas a 37 °C em uma atmosfera de CO_2 (5%) com 95% de umidade em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (ZHONG et al., 2006).

4.4.2 Avaliação da viabilidade celular

A citotoxicidade ocasionada pelos compostos em estudo foi avaliada através do método que emprega o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT). Células viáveis tem a capacidade de reduzir o sal de tetrazólio, pela atividade de enzimas mitocondriais, produzindo derivados de formazan de cor púrpura, cuja intensidade é proporcional ao número de células viáveis da amostra (MOSMANN, 1983).

As células (10^4 células por poço) foram plaqueadas em placas *multiwell* de 96 poços e submetidas a uma incubação de 24 h para aderência e confluência. Passadas as 24 h de incubação o meio de cultura foi substituído (200 μ L) por outro contendo as naftoquinonas (0-80 μ M), isoladas ou associadas ao ascorbato (1 mM), seguindo-se uma nova incubação de 24 h. Para o controle negativo foi utilizado somente o meio de cultura completo contendo quantidades similares do veículo utilizado para os tratamentos das quinonas (DMSO 1%). As concentrações das amostras foram todas testadas em triplicata, sendo três experimentos individuais em dias diferentes.

Passadas as 24 h de incubação com os tratamentos e após a adição do MTT, foi feita a leitura espectrofotométrica em leitor TECAN Infinity M200 a 540 nm, para determinar a intensidade de cor violeta e consequentemente a viabilidade celular.

A partir dos dados obtidos foi calculada a CI_{50} utilizando o software GraphPad Prisma (San Diego, EUA) sendo os valores das absorbâncias das amostras comparados aos valores do controle negativo. O valor de CI_{50} corresponde à concentração na qual o composto citotóxico é capaz de induzir a morte de 50% das células submetidas ao tratamento.

4.4.3 Medida do conteúdo intracelular de EROs

O conteúdo de EROs foi avaliado conforme proposto por Glorieux e colaboradores (2011), utilizando o reagente fluorescente diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). Este reagente, quando no meio intracelular, sofre a ação de esterases e é convertido em diclorofluoresceína reduzida (DCFH). O DCFH pode ser oxidado pelas EROs, especialmente o H_2O_2 , intracelulares produzindo diclorofluoresceína fluorescente. Assim, a medida da fluorescência é proporcional ao conteúdo de EROs no interior da célula.

Neste ensaio, 15.000 células em placa *multiwell* foram incubadas com uma solução de DCFH-DA (10 μ M) em solução tampão de Hank (HBSS) a 37 °C por 30 min. Após esse tempo de incubação, o excesso de DCFH-DA foi removido com lavagem com HBSS fresco (100 μ L). As células foram incubadas por 2 h com as naftoquinonas (2,5, 5, 10 e 20 μ M) isoladas ou associadas ao ascorbato (1 mM). Posteriormente, as células submetidas aos tratamentos foram lavadas duas vezes com HBSS. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de HBSS por poço para a leitura de fluorescência.

A intensidade de fluorescência foi verificada em leitor TECAN Infinity M200 com 485 nm de excitação e 530 nm de emissão. Os níveis de EROs intracelulares foram determinados utilizando a seguinte fórmula:

$$\Delta F = (F - F_0) / F_0$$

Onde: F = fluorescência média do teste registrada a cada intervalo de 30 min e F₀ = fluorescência média dos controles.

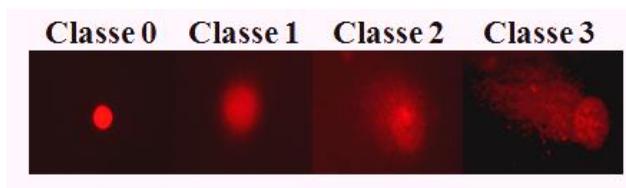
4.4.4 Índice de fragmentação do DNA – Teste Cometa

O efeito dos tratamentos sobre o DNA de células MCF-7 foi avaliado através do teste Cometa conforme proposto por Singh e colaboradores (1988). As células MCF-7 foram plaqueadas em placa de 24 poços (5x10⁴ células por poço). Após o período de 24 h para a aderência celular, o meio de cultura foi retirado, adicionado um novo meio contendo as naftoquinonas (25, 50 e 75 μ M), isoladas ou associadas ao ascorbato de sódio (1 mM), e submetidas à incubação de 24 h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Após o tempo de tratamento, as células foram lavadas com PBS fresco (2x), tripsinizadas, ressuspendidas em meio completo e submetidas a uma centrifugação a 1.000 x g durante 10 min. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 100 μ L de agarose *low-melting* e este volume colocado sobre uma lâmina previamente coberta com uma fina camada de agarose 1%, sendo as lâminas armazenadas a 4 °C durante 5 min. Após esse período as lâminas foram incubadas sob refrigeração (4 °C) em solução de lise (2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, pH 10) durante 2 h. Transcorrido o período de lise, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal, sendo deixadas em contato com tampão (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) durante 20 min a 4 °C. Em seguida,

ocorreu a corrida eletroforética durante 20 min a 25 V e 300 mA a 4 °C. Todos os procedimentos acima mencionados foram conduzidos no escuro para prevenir danos adicionais ao DNA. Após a eletroforese, as lâminas foram submetidas a uma neutralização com Tris 0,4 M (pH 7,5), lavadas com água e coradas com 50 µL de brometo de etídio (0,25 mg/mL), por lâmina.

Utilizando um microscópio de fluorescência (Olympus – Bx41), as células foram selecionadas e contadas, sendo 100 células por lâmina para cada concentração dos tratamentos testados. A seleção das células ocorreu de acordo com uma das quatro classes que levam em consideração o tamanho da cauda (Figura 17). Cada núcleo recebeu um valor arbitrário entre 0 e 4 (0: nenhum dano; 4: máximo dano) (ROSS et al., 1995). O índice de dano foi calculado da seguinte forma: células sem danos = 100 células x 0 até células com o máximo de dano = 100 células x 4 (BURLINSON et al., 2007).

Figura 17 – Índice de dano ao DNA considerado para o teste do Cometa.



Fonte: Dados do autor.

4.4.5 Ensaio da formação de colônias

A avaliação do efeito antiproliferativo dos compostos testados e suas associações foi realizada pelo método proposto por Aithal e colaboradores (2009). Em placa de cultura de 6 poços, 500 células por poço foram semeadas e incubadas 24 h para a aderência. Após este período, o meio de cultura foi substituído por outro contendo as naftoquinonas (2,5, 5, 10 ou 20 µM), isoladamente ou associadas ao ascorbato (1 mM). O ascorbato também foi testado isolado. Como controle negativo foi utilizado somente meio de cultura e quantidade equivalente de veículo (DMSO 1%). Procedeu-se uma incubação de 24 h com os tratamentos propostos. Transcorrido esse tempo, as células foram lavadas com PBS a 37 °C (3x) e o meio foi substituído por meio fresco e as células submetidas a uma incubação de aproximadamente 15 dias, ou até a presença de colônias ser percebida.

Passado esse tempo, o meio foi retirado e as colônias fixadas e coradas com solução cristal violeta 0,2% para serem posteriormente visualizadas e quantificadas. As colônias foram contadas e os resultados expressos pelo número de colônias em comparação ao controle.

4.4.6 Ensaios de imunoelektroforese

Células MCF-7 foram semeadas em placa de 12 poços (4×10^5 células/poço). Após 24 h, as células foram submetidas aos tratamentos com as naftoquinonas (20 μM) isoladas ou em associação ao ascorbato (1 mM) durante 2 h. Transcorrido o tempo de tratamento, as células foram lavadas com PBS (3x) e tratadas com o tampão de lise RIPA (Tris-Cl 25 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, desoxicolato de sódio 0,25%, fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM, pH 7,4) suplementado com um coquetel inibidor de proteases 1% e inibidor de fosfatases 3%. As células foram totalmente destacadas das paredes dos poços com auxílio de um espalhador e recolhidas em eppendorfs. A concentração de proteínas presente em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford utilizando um *kit* para determinação (BioRad). Posteriormente, as amostras foram desnaturadas em tampão Laemmli (Tris-Cl 60 mM, dodecil sulfato de sódio 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, 0,01% de azul de bromofenol, pH 6,8). Quantidades iguais de proteínas (25 μg) provenientes dos homogenatos das células foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE). Posteriormente, as proteínas foram separadas e transferidas para membranas de nitrocelulose por eletrotransferência. Na sequência, estas membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado, lavadas e incubadas *overnight* com os anticorpos primários nas diluições indicadas nos *datasheets* dos mesmos. Transcorrida esta incubação, as membranas foram lavadas e incubadas com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase nas diluições indicadas nos respectivos *datasheets*. Os anticorpos primários utilizados para a detecção de proteínas estão descritos na Tabela 1. Para o controle de carga de proteínas utilizou-se como marcador a β -actina.

As bandas referentes às proteínas estudadas foram obtidas pelo fotodocumentador ChemiDoc MP Bio-Rad.

4.5 Ensaios biológicos *in vivo*

4.5.1 Animais

Para a avaliação da atividade antitumoral *in vivo* das naftoquinonas em estudo e as respectivas associações ao ascorbato de sódio, foram utilizados camundongos isogênicos Balb/C (*Mus musculus*), machos (20 ± 2 g), com idade de aproximadamente 60 dias, obtidos da reprodução e manejo controlados no biotério setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX), Centro de Ciências Biológicas, UFSC.

Os animais foram divididos em grupos de 12 e mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12 h, temperatura de 25 ± 2 °C e aproximadamente 60% de umidade do ar). Os animais receberam ração comercial e água *ad libitum*.

Este projeto foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA), desta universidade, o qual foi aprovado sob o número PP00784.

4.5.2 Modelo do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) – Protocolo Experimental

As células do carcinoma de Ehrlich são mantidas no LABIOEX em camundongos submetidos a um transplante sistemático. Estas células foram obtidas junto à Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil).

As naftoquinonas Q7 e Q9 foram testadas pela primeira vez *in vivo* neste estudo. Portanto, fez-se necessária a adequação das concentrações das mesmas. Para tanto, foram utilizados dados da literatura nos quais foram realizados testes *in vivo* com a juglona em concentrações variadas de 0,5 a 5 mg/kg (AITHAL et al., 2012; BIN et al., 2008), e a associação menadiona/ascorbato em concentrações 10 mg/kg e 1 g/kg, respectivamente (BECK et al., 2011).

Num primeiro momento foram testadas as concentrações de 0,5, 1 e 5 mg/kg das naftoquinonas associadas a 1 g/kg de ascorbato para a inibição do tumor e sobrevida. A concentração de 1 mg/kg das naftoquinonas mostrou-se eficaz para os parâmetros avaliados. No entanto, a concentração de 1 g/kg de ascorbato de sódio mostrou-se altamente tóxica, quando associada às naftoquinonas, apresentando um alto índice de mortalidade dos animais. Sendo assim, a concentração de

ascorbato de sódio foi diminuída a uma décima parte (100 mg/kg) da testada inicialmente.

Células (5×10^6) do tumor ascítico de Ehrlich foram inoculadas no abdome dos animais para induzir o desenvolvimento do tumor. O dia da inoculação foi considerado dia zero. Os animais foram divididos em nove grupos (n=12):

- a) Grupo controle negativo: sem tratamento (solução salina)
- b) Grupo controle positivo: tratado com doxorubicina (1,2 mg/kg)
- c) Grupo tratado com ascorbato (100 mg/kg)
- d) Grupo tratado com juglona (1 mg/kg)
- e) Grupo tratado com Q7 (1 mg/kg)
- f) Grupo tratado com Q9 (1 mg/kg)
- g) Grupo tratado com a associação juglona (1 mg/kg) + ascorbato (100 mg/kg)
- h) Grupo tratado com a associação Q7 (1 mg/kg) + ascorbato (100 mg/kg)
- i) Grupo tratado com a associação Q9 (1 mg/kg) + ascorbato (100 mg/kg)

As soluções de tratamento foram preparadas diariamente, sendo que as associações das naftoquinonas e ascorbato de sódio foram preparadas imediatamente antes da aplicação nos animais. Os tratamentos foram iniciados 24 h após a inoculação das células do TAE e realizados por via intraperitoneal (i.p.). Os compostos foram administrados em concentrações máximas previamente determinadas. Os tratamentos foram feitos durante 9 dias consecutivos. No nono dia, 2 h após o último tratamento, amostras foram coletadas de seis animais de cada grupo para as análises de fragmentação do DNA, ciclo celular e imunodeteção de proteínas. No décimo dia, seis animais selecionados de cada grupo foram submetidos à análise de inibição do crescimento tumoral. Estes mesmos animais foram mantidos para a análise de sobrevida.

4.5.3 Inibição do crescimento tumoral e tempo de sobrevida dos animais

A inibição do crescimento do tumor foi avaliada levando em consideração a medida da circunferência abdominal e determinação do peso dos animais, conforme proposto por Kwiecinski e colaboradores (2008). A variação destas medidas foi calculada por subtração dos valores de peso (g) e circunferência (cm) medidos no primeiro e último dia de tratamento. O percentual de inibição do crescimento do tumor (%)

ICT) foi determinado a partir da seguinte equação (KVIECINSKI et al., 2011):

$$\text{ICT}(\%) = (\text{variação média da circunferência abdominal do grupo teste} \times 100 / \text{medida média do grupo controle negativo}) - 100$$

Os demais animais de cada grupo foram mantidos vivos para a avaliação dos parâmetros do tempo médio de sobrevivência, conforme proposto por Kaplan e Meier (1958).

4.5.4 Marcadores de estresse oxidativo

Para a avaliação de marcadores de estresse oxidativo, amostras do TAE foram coletadas e os homogenatos preparados conforme o protocolo para cada marcador a ser avaliado. A dosagem de proteínas de todas as amostras foi feita a partir do método proposto por Lowry e colaboradores (1951).

4.5.4.1 Peroxidação lipídica

Os níveis de peroxidação lipídica foram avaliados pela medida de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), em especial o produto majoritário malondialdeído (MDA), produzindo uma base de Schiff de coloração rosa. Para tanto, foi utilizado o método proposto por Bird e Draper (1984).

Foi preparado um homogenato de cada amostra na proporção 1:4 v/v (400 µL de TAE:1600 µL de tampão fosfato de potássio 20 mM, NaCl 150 mM, 0,1% de Triton e pH 7,4) e centrifugados a 5.000 x g durante 5 min. Em tubo eppendorf foram adicionados 100 µL do sobrenadante da amostra, 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 12%, 900 µL de tampão Tris-HCl 60 mM pH 7,4 e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73%. Para o branco foram utilizados todos os reagentes anteriormente citados, com exceção da amostra. Seguiu-se então a fervura das amostras por 1 h em banho-maria. Após a fervura, as amostras foram colocadas em banho de gelo por aproximadamente 10 min. Posteriormente, foram centrifugadas durante 5 min a 5.000 x g. Em seguida, em placa *multiwell* de 96 poços, 200 µL do sobrenadante de cada amostra foi colocado nos seus respectivos poços, sendo três poços para cada amostra, e a leitura feita em 540 nm no leitor TECAN Infinity M200. Os resultados foram expressos em MDA (nmol/mg proteína).

4.5.4.2 Proteína carbonilada

Os níveis de proteína carbonilada foram avaliados segundo método proposto por Levine e colaboradores (1990). Inicialmente foi preparado um homogenato na proporção 1:4 v/v (400 μ L de TAE:1600 μ L de tampão fosfato de potássio 20 mM, NaCl 150 mM, 0,1% de Triton, pH 7,4). Na sequência, foram adicionados 100 μ L do sobrenadante da amostra em 600 μ L de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 mM preparado em solução HCl 2 N, seguido de uma incubação durante 1 h à temperatura ambiente protegido da luz, com agitação contínua. Decorrido este tempo, foram adicionados 600 μ L de TCA 20 %, com agitação e banho de gelo durante 10 min, seguindo uma centrifugação durante 5 min a 10.000 x g e o sobrenadante descartado. Em seguida, o *pellet* foi lavado por três vezes consecutivas com uma centrifugação de 5 min a 10.000 x g, num volume total de 800 μ L (1:1, v/v) para cada lavado. Após as três lavagens o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de uma haste flexível de algodão e adicionados 900 μ L de guanidina 6 M preparada em solução de KH_2PO_4 20 Mm, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C com agitação contínua por 60 min. Após esta incubação, 200 μ L de cada amostra foi transferido para uma placa *multiwell* de 96 poços (3 poços por amostra) e a leitura efetuada a 360 nm em leitor TECAN Infinity M200. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol/mg proteína.

4.5.4.3 Conteúdo de GSH

Para avaliação dos níveis de glutatona reduzida (GSH), foi utilizada a metodologia proposta por Beutler; Duron; Kelly (1963). A GSH reage com o DTNB e por redução da GSSG, a GSH total (GSH+GSSG) pode ser medida.

Para tanto, foi preparado um extrato ácido na proporção 1:4 v/v (200 μ L de TAE:800 μ L de TCA 12 %) e centrifugado a 5.000 x g durante 5 min. Após a centrifugação, em placa *multiwell* de 96 poços, uma alíquota de 10 μ L dos sobrenadantes das amostras foi acrescentada em 190 μ L de tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 8,0 e 20 μ L de ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) 2,5 mM (DTNB), diluído em citrato de sódio 1%. Para o branco foi realizado o mesmo procedimento das amostras, porém, ao invés da amostra, foram adicionados 10 μ L da solução TCA 12% e água destilada na proporção 3:2 v/v. A reação foi monitorada durante 3 min, e o maior valor de absorbância, que

corresponde à máxima formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela e mensurável a 412 nm em leitor TECAN Infinity M200, foi utilizado para o cálculo. Os resultados foram expressos como conteúdo de GSH em $\mu\text{mol/mg}$ proteína.

4.5.4.4 Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A avaliação da atividade da SOD foi realizada conforme método proposto por Misra e Fridovich (1972), modificado por Boveris e colaboradores (1983). Este método baseia-se na oxidação da adrenalina (mudança de pH de 2,0 para pH 10,0), a qual produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo (adenocromo), que é mensurado em 480 nm.

Foi preparado um homogenato na proporção 1:4 v/v (400 μL de TAE:1600 μL de tampão fosfato de potássio 20 mM, NaCl 150 mM, 0,1% de Triton, pH 7,4). No dia do experimento foi preparada uma solução de adrenalina 60 mM (pH em torno de 2,0) e armazenada em frasco âmbar e em gelo.

As amostras foram centrifugadas a 5.000 x g durante 5 min. Para cada amostra foram utilizados 5 volumes diferentes dos sobrenadantes (5 – 60 μL) completando o volume para 200 μL de volume final com tampão glicina 50 mM em placa de 96 poços. No momento da leitura, foram adicionados 5 μL de adrenalina em cada poço e realizada uma leitura cinética a 480 nm durante 10 min em leitor TECAN Infinity M200. Os valores da SOD (USOD/mg proteína) foram expressos em termos de atividade da enzima na qual uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adenocromo (oxidação da adrenalina).

4.5.4.5 Avaliação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada seguindo o método proposto por Aebi (1984), o qual é baseado na velocidade ($V_{\text{máx}}$) de degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e quantificada na absorbância de 240 nm.

Foi preparado um homogenato na proporção 1:4 v/v (400 μL de TAE:1600 μL de tampão fosfato de potássio 20 mM, NaCl 150 mM, 0,1% de Triton, pH 7,4), centrifugado a 5.000 x g durante 5 min e o sobrenadante usado para a análise.

Em placa de 96 poços foram adicionados 5 μL do sobrenadante de cada amostra e adicionados 200 μL de solução de H_2O_2 30% (10

mM) preparada com tampão fosfato 50 mM e pH 7,0. Imediatamente, em leitor TECAN Infinity M200, foi realizada uma leitura cinética em 240 nm durante 5 min. Os valores foram expressos em $\text{nmol}(\text{min}.\text{mg prote\u00edna})^{-1}$.

4.5.4.6 Avaliação da atividade da glutaciona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi avaliada pelo método proposto por Flohé e Gunzler (1984). A GPx dismuta o *tert*-butilhidroperóxido (t-BuOOH) gerando uma ponte de dissulfeto entre duas moléculas de GSH (GSSG), que por sua vez, retorna ao estado reduzido (GSH) pela ação da GR que oxida o NADPH. A oxidação do NADPH é medida em 340 nm. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à atividade de GPx presente na amostra.

Foi preparado um homogenato da amostra do TAE na proporção 1:4 v/v (400 μL de TAE:1600 μL de tampão fosfato de potássio 20 mM, NaCl 150 mM, 0,1% de Triton, pH 7,4), centrifugado a 5.000 x g durante 5 min para a obtenção do sobrenadante. No momento da realização da técnica, foi preparado um meio de reação contendo 25 mL de tampão fosfato 0,1 M e (pH 7,0) 8,6 mg de NADPH, 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) a 5 mM, 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH, e 5 U de GR.

Em placa de 96 poços foram adicionados: 5 μL do sobrenadante de cada amostra, 200 μL de meio de reação e 5 μL de t-BuOOH. Em seguida foi realizada uma leitura cinética a 340 nm durante 3 min (18 ciclos/20s) em em leitor TECAN Infinity M200. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol}(\text{min}.\text{mg prote\u00edna})^{-1}$.

4.5.4.7 Avaliação da atividade da glutaciona redutase (GR)

A atividade da enzima GR foi analisada segundo o método proposto por Calberg e Mannervick (1985), o qual mede a taxa de oxidação do NADPH pela GSH formada a partir da GSSG, pela ação da enzima GR presente na amostra.

Foi preparado um homogenato na proporção 1:4 v/v (400 μL de TAE:1600 μL de tampão fosfato de potássio 20 mM, NaCl 150 mM, 0,1% de Triton e pH 7,4). Previamente foi preparado um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M e (pH 7,0), 8,6 mg de NADPH, 30,6 mg de glutaciona oxidada e DPTA 5 mM. Em placa de 96 poços foram adicionados 5 μL de sobrenadante da amostra e 200 μL de meio de reação. Em seguida foi realizada uma leitura cinética a 340 nm durante 3

min (18 ciclos/20s) em leitor TECAN Infinity M200. Os valores da atividade da enzima GR foram expressos em $\mu\text{mol}(\text{min}.\text{mg prote\~{i}na})^{-1}$.

4.5.4.8 Avaliação da atividade da glutatona S-transferase (GST)

A atividade da glutatona S-transferase foi determinada a 340 nm usando CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) como substrato e GSH 0,15 M, segundo proposto por Habig; Pabst; Jacoby (1976).

Foi preparado um homogenato da amostra do TAE na proporção 1:4 v/v (400 μL de TAE:1600 μL de tampão fosfato de potássio 20 mM, NaCl 150 mM, 0,1% de Triton, pH 7,4). Imediatamente antes do uso foram preparadas as soluções de CDNB 0,1 M em etanol e GSH 0,1 M em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Ambas as soluções foram armazenadas em frasco âmbar e em banho de gelo até o momento do uso.

O homogenato das amostras foi centrifugado a 5.000 x g durante 5 min. Foram adicionados em placa de 96 poços: 5 μL do sobrenadante da amostra; 250 μL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 5 μL de CDNB e 5 μL de GSH, sendo que os dois últimos reagentes adicionados imediatamente antes do uso. Em um leitor TECAN Infinity M200 foi efetuada uma leitura cinética a 340 nm durante 3 min (18 ciclos/20s). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}(\text{min}.\text{mg prote\~{i}na})^{-1}$.

4.5.5 Índice de fragmentação do DNA – Teste Cometa

Os efeitos dos tratamentos sobre o DNA de células do tumor ascítico de Ehrlich foram avaliados através do teste Cometa proposto por Singh e colaboradores (1988).

Alíquotas de 500 μL do TAE foram coletadas e centrifugadas (1.000 x g durante 10 min), o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com 1000 μL de PBS. Uma alíquota de 5 μL desta solução foi adicionada a 95 μL de agarose *low-melting* e este volume colocado sobre uma lâmina previamente coberta com uma fina camada de agarose 1%, sendo as lâminas armazenadas a 4 °C durante 5 min. Após esse período, as lâminas foram incubadas sob refrigeração (4 °C) em solução de lise (2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, pH 10) durante 2 h. Transcorrido o período de lise, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal, sendo deixadas em contato com tampão (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) durante 20 min a 4 °C. Em seguida, ocorreu a corrida eletroforética durante 20 min a 25 V e 300 mA a 4 °C. Todos os procedimentos acima

mencionados foram conduzidos ao abrigo da luz para prevenir danos adicionais ao DNA. Após a eletroforese, as lâminas foram submetidas a uma neutralização com Tris 0,4 M (pH 7,5), lavadas com água e coradas com 50 µL de brometo de etídio (0,25 mg/mL), por lâmina.

Utilizando um microscópio de fluorescência (Olympus – Bx41) as células foram selecionadas e contadas, sendo 100 células por lâmina para cada concentração dos tratamentos testados. A seleção das células ocorreu de acordo com uma das quatro classes que levam em consideração o tamanho da cauda (Figura 17). Cada núcleo recebeu um valor arbitrário entre 0 e 4 (0: nenhum dano; 4: máximo dano) (ROSS et al., 1995). O índice de dano foi calculado da seguinte forma: células sem danos = 100 células x 0 até células com o máximo de dano = 100 células x 4 (BURLINSON et al., 2007).

4.5.6 Ciclo celular

Para a avaliação de modificações no ciclo celular ocasionadas pelo tratamento dos animais com as naftoquinonas juglona, Q7 ou Q9 isoladas ou associadas ao ascorbato, utilizou-se o kit PI/RNase *solution* (Immunostep), seguindo as instruções do fabricante.

Uma alíquota do TAE contendo 5×10^5 células foi coletada e centrifugada a 1.000 x g por 10 min. Logo após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e as células ressuspensas com 250 µL de solução salina. Uma alíquota de 200 µL foi separada em tubo eppendorf e novamente centrifugada a 1.000 x g por 10 min. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e adicionados, lentamente em vórtex, 200 µL de etanol 70% refrigerado. Esta amostra foi acondicionada a -20 °C por 24 h. Após este período as amostras foram centrifugadas a 1.000 x g por 10 min, retirado o etanol 70%, adicionado 1 mL de solução salina e novamente centrifugada a 1.000 x g por 10 min. Após a centrifugação, a solução salina foi retirada e adicionados 200 µL de solução contendo iodeto de propídio e RNase. As amostras foram analisadas em Citômetro de Fluxo BD FACSCanto II. Os dados foram analisados através do software *Flowing Software 2.5*, a partir do qual foi determinada a porcentagem de células agrupadas em cada fase do ciclo celular.

4.5.7 Captação de glicose

Células do tumor ascítico de Ehrlich (8×10^5 células) foram coletadas em eppendorf. Logo após a coleta, foi realizada uma centrifugação de $1.000 \times g$ durante 8 min para a separação das células tumorais do líquido ascítico. Em cada tubo foi adicionado 200 μL de meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) (ZHONG et al., 2006), as células foram ressuspensas e pré-incubadas durante 2 h a 37°C numa atmosfera de CO_2 (5%) com 95% de umidade.

Após a pré-incubação o sobrenadante foi retirado e em cada eppendorf foram adicionados 200 μL de meio contendo os tratamentos com a juglona, Q7 e Q9 isoladas (10 μM) ou em associação ao ascorbato (1 mM). No grupo controle foi adicionado somente meio DMEM (Gibco). Glicose marcada (^{14}C -DG, 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$) foi adicionada em cada tubo. As amostras foram incubadas durante 1 h em contato com a ^{14}C -DG. Posteriormente à incubação, as células foram centrifugadas a $1.000 \times g$ durante 8 min, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com meio para a retirada da ^{14}C -DG não incorporada. Após, este processo foram adicionados 200 μL de uma solução NaOH 0,5 M. A radioatividade foi medida por cintilação líquida usando um espectrômetro de cintilação (*Multi-Purpose Scintillation Counter*, modelo LS 6500, Beckman Coulter, Boston, MA). A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método proposto por Lowry e colaboradores (1951), e os resultados expressos como nmol glicose/mg de proteína (CAZZAROLLI et al., 2009).

4.5.8 Morte celular

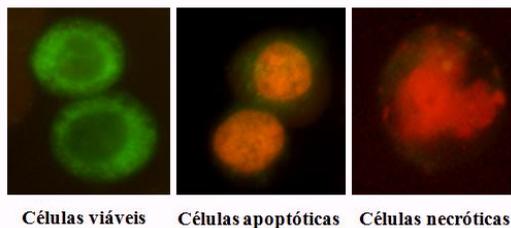
Para a avaliação do tipo de morte celular causada pelos tratamentos foi utilizado o método por coloração de laranja de acridina e brometo de etídio (BE/LA), inicialmente proposto por McGahon e colaboradores (1995). Este método permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose, tendo como parâmetros alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas.

Uma alíquota (125 μL) do TAE foi coletada e centrifugada durante 10 min a $1.000 \times g$. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 μL de PBS (salina tamponada de fosfato). Uma alíquota de 25 μL da solução de células foi colocada em tubo eppendorf, a esta solução foi adicionado 10 μL da solução corante (1:1) de brometo de etídio (100 $\mu\text{g/mL}$) e laranja de

acridina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Uma alíquota (10 μL) foi colocada em lâmina para efetuar a leitura em microscópio de fluorescência (Microscópio Olympus, Bx41).

Para cada amostra foram contadas 300 células. Os resultados foram expressos em percentual de células viáveis, apoptóticas e necróticas (Figura 18), sendo realizados 3 experimentos independentes em triplicata.

Figura 18 – Células viáveis, em apoptose ou em necrose.



Fonte: Dados do autor.

4.5.9 Ensaios de imunoeletroforese

Aliquotas do TAE (250 μL) foram centrifugadas (5.000 $\times g$ por 5 min), o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com PBS (3x). Após a última lavagem, as células foram tratadas com o tampão de lise RIPA (Tris-Cl 25 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, desoxicolato de sódio 0,25%, fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM, pH 7,4) suplementado com um coquetel inibidor de proteases 1% e inibidor de fosfatases 3%. A concentração de proteínas presente em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford utilizando um *kit* para determinação (BioRad). Posteriormente, as amostras foram desnaturadas em tampão Laemmli (Tris-Cl 60 mM, dodecil sulfato de sódio 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, 0,01% de azul de bromofenol, pH 6,8). Quantidades iguais de proteínas (25 μg) provenientes dos homogenatos das células foram submetidas à eletroforese em géis de poliácridamida (SDS-PAGE). Posteriormente, as proteínas foram separadas e transferidas para membranas de nitrocelulose por eletrotransferência. Na sequência estas membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado, lavadas e incubadas *overnight* com os anticorpos primários nas diluições indicadas nos *datasheets* dos mesmos. Transcorrida esta incubação, as membranas foram lavadas e incubadas com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase nas diluições indicadas nos respectivos

datasheets. Para o controle de carga de proteínas utilizou-se como marcador a β -actina.

As bandas referentes às proteínas estudadas foram obtidas pelo fotodocumentador ChemiDoc MP Bio-Rad.

4.6 Análise estatística

Os resultados, em sua maioria, foram expressos a partir da Média \pm Desvio Padrão. Todos os ensaios bioquímicos foram realizados em triplicata e os ensaios *in vitro* repetidos três vezes. As bandas dos ensaios de imunoelektroforese foram quantificadas, quando necessário, através do programa ImageJ[®] e posteriormente submetidas à análise estatística.

Os dados foram submetidos à análise de variância *one-way* ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni ou Tukey-Kramer, quando necessário. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

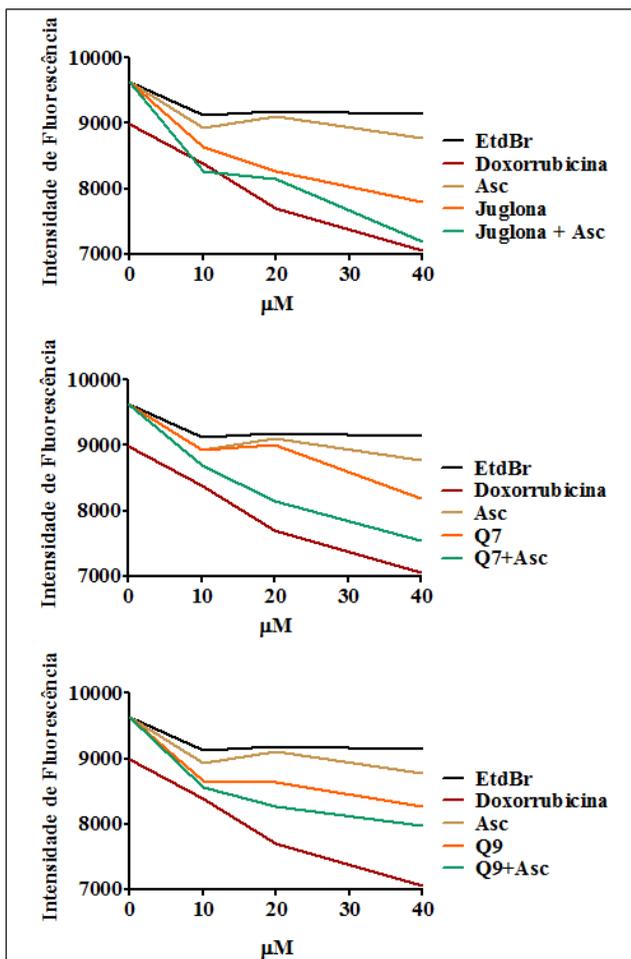
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Danos diretos sobre o CT-DNA causados pelas naftoquinonas isoladas ou associadas ao ascorbato de sódio

5.1.1 Intercalação no DNA

O efeito intercalante ao CT-DNA das naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio, foi avaliado usando o agente intercalante fluorescente brometo de etídio. Moléculas que se intercalam ao DNA competem com o brometo de etídio e reduzem a fluorescência deste composto (BOX, 2007), conforme observado com a doxorrubicina, fármaco antitumoral padrão utilizado como controle positivo neste experimento. A figura 19 mostra a capacidade intercalante ao DNA das naftoquinonas e suas associações ao ascorbato de sódio. O ascorbato de sódio não foi capaz de intercalar na molécula de CT-DNA. Quando o CT-DNA e o brometo de etídio foram incubados com as naftoquinonas isoladas houve uma pequena redução na fluorescência, especialmente para a juglona e Q7. No entanto, a capacidade intercalante das naftoquinonas aumentou de forma relevante quando o CT-DNA foi tratado com as naftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio.

Figura 19 – Efeitos intercalantes das naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio sobre o CT-DNA em comparação à doxorubicina.



As naftoquinonas e a doxorubicina foram usadas em concentrações entre 0 - 50 μM. O ascorbato de sódio (Asc) foi utilizado numa concentração fixa de 1 mM. O brometo de etídio (EtdBr) foi utilizado na concentração de saturação (3 μM). Fonte: Dados do autor.

Há mais de meio século, Lerman (1963) demonstrou que moléculas aromáticas policíclicas são típicos agentes intercalantes da dupla hélice do DNA, e este postulado permanece vigente atualmente

(KELLET et al., 2012). Sendo assim, os resultados apresentados sugerem que a molécula intercalante ao DNA possa ser o radical semiquinona originado do ciclo redox entre as naftoquinonas e o ascorbato de sódio (Figura 14).

Muitos compostos exercem seus efeitos antitumorais através da afinidade de ligação com o DNA. Agentes intercalantes têm sido extensivamente estudados nas últimas décadas e muitos já utilizados na clínica médica para o tratamento do câncer, como é o caso de alguns compostos quinóides (BOSE; DEY; BASU, 2008).

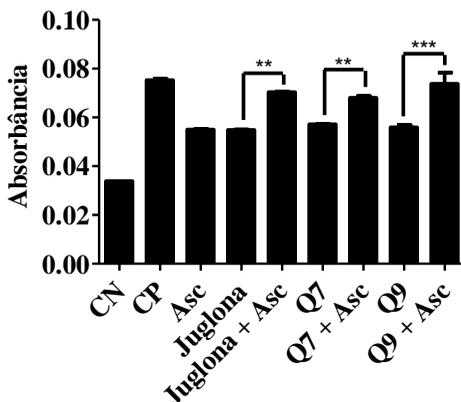
As consequências da intercalação ao DNA por moléculas exógenas tem alta relevância no tratamento do câncer, uma vez que este efeito tem como consequência uma significativa modificação na estrutura do DNA, podendo resultar em supressão da função desse ácido nucleico em processos fisiológicos (HURLEY et al., 2002), como supressão da replicação do DNA e transcrição genética, resultando em morte das células tumorais (SHAHABUDDIN; GOPAL; RAGHAVAN, 2007).

5.1.2 Clivagem oxidativa

A molécula de DNA é extremamente susceptível à clivagem oxidativa. Sendo assim, foi avaliado se as EROs geradas durante o ciclo redox formado pela associação das naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 e o ascorbato de sódio, seriam capazes de ocasionar uma quebra oxidativa da molécula de DNA.

EROs intracelulares podem atacar o DNA no C4 da desoxirribose causando clivagem oxidativa e geração de produtos de degradação como a base propenal, a qual é detectada pela reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (JIANG et al., 2007). Os resultados obtidos e apresentados na figura 20 mostram que a absorbância resultante da associação entre a base propenal e o ácido 2-tiobarbitúrico foi aumentada quando o CT-DNA foi tratado com o $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}/\text{H}_2\text{O}_2$, usado como um controle positivo para a geração de radicais livres através da reação de Fenton, indicando um elevado índice de clivagem oxidativa. Quando o CT-DNA foi tratado com as naftoquinonas ou ascorbato isolados observou-se um ligeiro aumento da absorbância quando comparados com o controle negativo. Porém, as absorbâncias foram significativamente aumentadas ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$) quando o CT-DNA foi submetido ao tratamento com as associações naftoquinonas/ascorbato de sódio, sendo os valores estatisticamente semelhantes ao controle positivo, doxorubicina.

Figura 20 – Clivagem oxidativa do DNA ocasionada pelas EROs geradas durante o ciclo redox das naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 associadas ao ascorbato de sódio.



CN: controle negativo (tampão fosfato). CP: controle positivo $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{-2}/\text{H}_2\text{O}_2$. Asc: ascorbato de sódio. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=3$. (**) representa diferença estatística significativa de $p < 0,01$ e (***) representa diferença estatística significativa de $p < 0,001$ quando comparados os tratamentos com as naftoquinonas isoladas ou em associação com o ascorbato de sódio. Fonte: Dados do autor.

Tal resultado sugere que as EROs geradas pelo ciclo redox quando as naftoquinonas são associadas ao ascorbato, atacam o C4 do anel da desoxirribose do DNA e promovem a clivagem oxidativa desta molécula. Em nível celular, a clivagem do DNA pelas EROs é particularmente interessante, uma vez que a oxidação direta dos ácidos nucleicos pelas EROs pode levar à formação de bases oxidadas ou a quebra das fitas do DNA. Tais alterações afetam a replicação do DNA e a transcrição em RNA, causando instabilidade genômica, além de provocar a ativação de vias de sinalização que ocasionam a inibição da proliferação e ativação de mecanismos de morte celular (DONG et al., 2015).

5.2 Efeitos dos tratamentos das naftoquinonas isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio sobre células MCF-7

5.2.1 Viabilidade celular

Os resultados referentes à citotoxicidade dos tratamentos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Citotoxicidade da juglona, Q7 e Q9 isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio sobre células MCF-7 após incubação de 24 h com os respectivos tratamentos.

	CI ₅₀ (µM)		
	Juglona	Q7	Q9
	61	42	50
<i>plus</i> Ascorbato 1 mM	28	26	25

As naftoquinonas foram usadas em concentrações variáveis de 5 – 80 µM e o ascorbato de sódio na concentração de 1 mM. Os resultados foram expressos como Média da CI₅₀ de n=3. Fonte: Do autor.

A partir dos resultados obtidos para as CI₅₀ pode-se inferir que as naftoquinonas isoladas apresentam atividade citotóxica em células MCF-7, sendo a Q7 mais eficaz. No entanto, a citotoxicidade foi consideravelmente aumentada (aproximadamente duas vezes), quando as naftoquinonas foram associadas ao ascorbato de sódio 1 mM. Tais resultados estão de acordo com os publicados por Kwiecinski et al. (2012) e Felipe et al. (2013), os quais evidenciaram a diminuição da viabilidade de células T24 (carcinoma de bexiga) tratadas com juglona/ascorbato ou Q7, Q9/ascorbato, respectivamente.

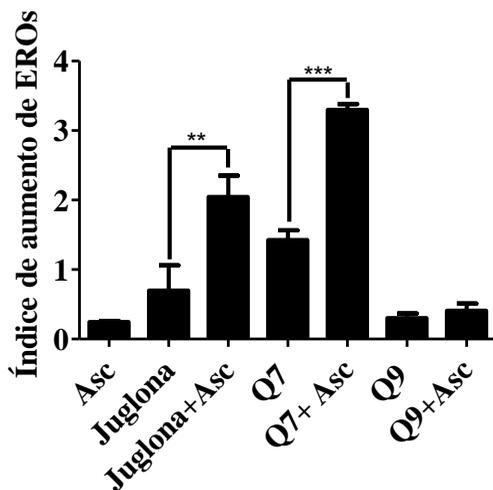
Alguns estudos já demonstraram uma citotoxicidade seletiva *in vitro* da juglona contra um representativo painel de células tumorais (MONTENEGRO et al., 2010; BABICH; STERN, 1993), inclusive em células leucêmicas resistentes à doxorubicina (HL-60R) (KAMEI et al., 1998). Benites e colaboradores (2010) observaram que, entre uma série de naftoquinonas sintetizadas, a Q7 e a Q9 mostraram alta habilidade para reduzir a viabilidade celular em diferentes linhagens de células tumorais com baixa citotoxicidade em fibroblastos saudáveis. Dando

sequência ao estudo, Felipe (2014) demonstrou que os valores de CI_{50} obtidos após fibroblastos BALB 3T3 (linhagem não tumoral) serem tratados com as associações das naftoquinonas Q7 e Q9 ao ascorbato de sódio, foram bastante superiores aos obtidos pelos tratamentos em linhagem tumoral T24.

5.2.2 Conteúdo intracelular de EROs

Para elucidar a relação entre a citotoxicidade causada pelas associações das naftoquinonas com o ascorbato de sódio e a geração de EROs, células MCF-7 foram expostas ao tratamento com as naftoquinonas isoladas em diferentes concentrações (2,5; 5; 10 e 20 μM), e as mesmas concentrações testadas em associação ao ascorbato de sódio (1 mM). No entanto, a concentração que se mostrou mais efetiva quanto a produção de EROs, particularmente para a juglona e a Q7, foi a de 10 μM , cujos resultados são apresentados na figura 21.

Figura 21 – Conteúdo intracelular de EROs em células MCF-7 determinado após 2 h de tratamento com as naftoquinonas (10 μM) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (1 mM).



Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=3$. (**) representa uma diferença estatística significativa de $p < 0,01$ e (***) uma diferença estatística significativa de $p < 0,001$. Estes valores referem-se às diferenças entre os grupos

tratados somente com as naftoquinonas ou estas associadas ao ascorbato de sódio (Asc). Fonte: Dados do autor.

É possível observar que nas células submetidas à incubação apenas com o ascorbato de sódio (1 mM) não houve uma indução expressiva na geração de EROs. Já as naftoquinonas juglona e Q7 sozinhas foram capazes de induzir a geração intracelular de EROs. Por outro lado, a geração de EROs foi significativamente aumentada (aproximadamente 3 vezes) nas associações juglona/ascorbato ($p < 0,01$) e Q7/ascorbato ($p < 0,001$). No entanto, o ascorbato teve menor impacto em termos de indução de EROs quando administrado em associação com a Q9 em células MCF-7. Pode-se inferir que o ascorbato é capaz de aumentar os danos oxidativos da Q9 somente quando os experimentos foram conduzidos com CT-DNA, um sistema não celular (Figura 20).

Um dos mecanismos de ação antitumoral dos compostos da classe das quinonas, já bem descrito na literatura, é a geração de EROs no meio intracelular (ELHABIRI et al., 2015; NGUYEN et al., 2013). Porém, nos últimos anos, o nosso grupo de pesquisa em parceria com o GTOX da Université Catholique de Louvain (Bélgica), vem demonstrando que o ascorbato de sódio potencializa o ciclo redox das quinonas, aumentando consideravelmente o estresse oxidativo intracelular.

Kvciński e colaboradores (2012) verificaram que células T24 (carcinoma de bexiga) tratadas com a associação juglona/ascorbato apresentaram altos níveis de EROs intracelular, e o estresse oxidativo exacerbado foi relacionado à citotoxicidade do tratamento.

Segundo Benites e colaboradores (2010), a fenilaminonaftoquinona-7 (Q7) é um dos mais promissores agentes antitumorais da série das naftoquinonas sintetizadas por estes autores, pois a capacidade de formar ligações de hidrogênio com o grupo hidroxil presente na molécula da Q7 aliada às propriedades lipofílicas pode facilitar as interações com alvos biológicos importantes para a terapia antitumoral. Felipe e colaboradores (2013) mostraram que tanto a Q7 quanto a Q9 geram quantidades suficientes de EROs na presença de ascorbato de sódio, os quais inibem a proliferação e induzem um fenótipo senescente em células T24.

Quando a menadiona (quinona da classe das 1,4-naftoquinonas) foi associada ao ascorbato houve uma potencialização do ciclo redox com aumento na geração de EROs em células MCF-7, ocasionando a ativação da via da p38 MAPK, responsável pela diferenciação celular e apoptose (BECK et al., 2009a).

As células tumorais exibem um status redox anormal e uma alta produção endógena de EROs devido a alterações metabólicas e a atividade de oncogenes que direcionam a produção de altos níveis de radicais livres, os quais promovem instabilidade genética aliada às baixas defesas antioxidantes destas células (TRACHOOTHAM et al., 2006). Tais características tornam as células cancerígenas sensíveis a altos níveis de EROs gerados pelo ciclo redox formado entre as quinonas e o ascorbato de sódio (VERRAX et al., 2011). As EROs formadas podem atuar como mensageiros secundários em cascatas de sinalização intracelulares (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009), como, por exemplo, ativar a via para a indução da senescência celular e apoptose (VALKO et al., 2006). Desta forma, o uso de compostos que interferem na regulação redox das células é uma estratégia promissora para a terapia do câncer (TRACHOOTHAM et al., 2009).

5.2.3 Danos induzidos no DNA de células tumorais

Segundo Ahn e colaboradores (2015), o DNA é um notável bioreceptor para moléculas exógenas e EROs, e o principal alvo biológico para o desenvolvimento de agentes anticâncer (HURLEY, 2002).

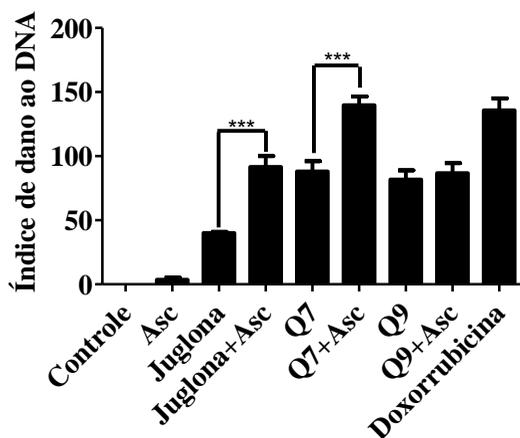
Para verificar se as quinonas isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio são capazes de causar danos no DNA de células MCF-7, foram realizados os testes Cometa e a análise por imunoeletroforese da histona H2AX fosforilada (γ H2AX). Os resultados estão expressos nas figuras 22 e 23, respectivamente.

Num primeiro momento, para o teste Cometa, as naftoquinonas foram testadas nas concentrações de 25, 50 e 75 μ M. Para facilitar a compreensão e análise, na figura 22 são apresentadas as concentrações que obtiveram os melhores resultados com relação ao índice de dano ao DNA para cada naftoquinona. O ascorbato de sódio não foi capaz de induzir um dano significativo no DNA das células MCF-7. No entanto, quando as células foram tratadas com as naftoquinonas isoladas, especialmente a Q7 e a Q9, ocorreu um aumento considerável no índice de dano. Por outro lado, a adição de ascorbato de sódio aumentou a fragmentação do DNA em aproximadamente duas vezes nos casos da juglona ($p < 0,001$) e da Q7 ($p < 0,001$), quando comparadas ao tratamento com as naftoquinonas isoladas. Os resultados apresentados sugerem que, possivelmente, as EROs geradas pelo ciclo redox entre o ascorbato de sódio e as naftoquinonas juglona e Q7 são capazes de

causar danos ao DNA de células MCF-7, corroborando os resultados de dano ao CT-DNA.

Ataques ao DNA pelas EROs podem causar danos oxidativos capazes de provocar a fragmentação desta molécula e consequente morte celular ou senescência (YUAN; ADAMSKI; CHEN, 2010; JOYCE; ZHU; HARRIS, 2009). Moléculas capazes de induzir dano ao DNA, há décadas, são estudadas e um número representativo delas é utilizado na clínica médica para o tratamento do câncer como, por exemplo, as antraciclina e as antraquinonas.

Figura 22 - Índice de dano ao DNA determinado pelo teste Cometa, em células MCF-7 tratadas com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio.



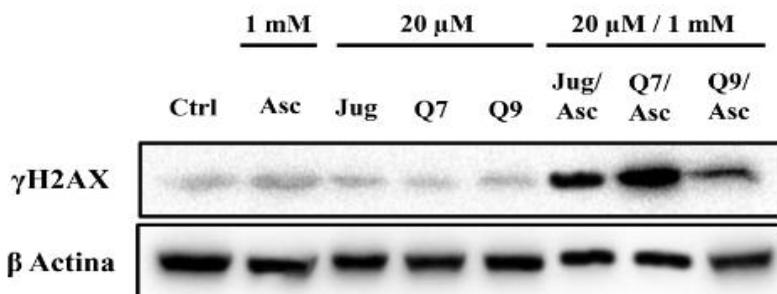
As células MCF-7 foram tratadas durante 24 h com juglona (75 μ M), Q7 (50 μ M) e Q9 (50 μ M) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (1 mM). Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (***) representa uma diferença estatística significativa de $p < 0,001$ entre os grupos das naftoquinonas isoladas e os grupos das naftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio (Asc). Fonte: Dados do autor.

O dano do DNA pode ser comprovado pela presença da proteína fosforilada H2AX. A γ H2AX está superexpressa nos casos de dano ao DNA e resposta de reparo ao DNA (YUAN; ADAMSKI; CHEN, 2010). A figura 23 mostra que nenhum dos compostos isolados (naftoquinonas e ascorbato de sódio) foi capaz de provocar a fosforilação da H2AX. Todavia, a detecção da γ H2AX foi consideravelmente aumentada

quando as células MCF-7 foram tratadas com as associações juglona/ascorbato e especialmente Q7/ascorbato, indicando um elevado índice de dano ao DNA ocasionado pelos tratamentos, corroborando os resultados apresentados na figura 22.

A histona H2AX é uma variante da H2A que forma parte do nucleossoma e condensa o DNA nos cromossomas (KELLET et al., 2012), sendo amplamente distribuída pelo genoma humano. As EROs causam a fosforilação da H2AX na Ser 139 pela família de cinases ATM/ATR (KRUM et al., 2010; PAULL et al., 2000). Lesões ao DNA, evidenciados pela expressão da γ H2AX, levam a mudanças na estrutura da cromatina e ocasionam o bloqueio da replicação e proliferação celular (WARD; CHEN, 2001).

Figura 23 – Efeito das naftoquinonas isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio sobre a fosforilação da histona H2AX em células MCF-7.

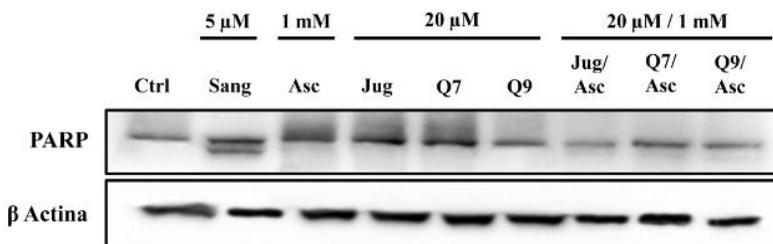


Os ensaios de imunoelectroforese foram realizados com o homogenato total de células MCF-7 tratadas durante 2 h com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 (20 μ M, a qual corresponde, aproximadamente, à CI_{50} das naftoquinonas), isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (1 mM). Fonte: Dados do autor.

Danos nas fitas do DNA ativam a PARP, uma enzima nuclear de reparo. A PARP liga-se à fita de DNA que foi danificada pelo seu domínio N-terminal e utiliza NAD^+ para sintetizar a poli (ADP-ribose), e proteínas envolvidas no metabolismo e reparo do DNA, como a DNA polimerase. Ainda, o DNA fragmentado ativa vias de sinalização para a morte celular como, por exemplo, ativação da caspase-3 e consequente clivagem da proteína PARP, levando à morte celular por apoptose (KIM et al., 2012). Os dados apresentados na figura 24 mostram que a clivagem da PARP ocorreu somente nas células tratadas com

sanguinarina, um flavonóide conhecido por causar a clivagem da PARP e provocar apoptose celular, e que foi utilizada como controle positivo neste experimento. A PARP tem um peso molecular de 116 kD e pode ser clivada por agentes indutores de apoptose, em um fragmento de 89 kD (BOULARES et al., 1999). Os resultados aqui apresentados evidenciam que os danos ao DNA ocasionados pelos tratamentos não foram capazes de induzir a fragmentação da proteína PARP, indicando uma morte celular diferente de apoptose em células MCF-7 submetidas aos tratamentos com as naftoquinonas em associação ao ascorbato de sódio.

Figura 24 – Efeito das naftoquinonas isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio sobre a integridade da proteína PARP em células MCF-7.



Os ensaios de imunoeletrforese foram realizados com o homogenato total de células MCF-7 tratadas durante 4 h com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 (20 μM, a qual corresponde, aproximadamente, à CI_{30} das naftoquinonas) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (1 mM). A sanguinarina (Sang) 5 μM foi utilizada como um controle positivo para clivagem da PARP e indução da apoptose. Fonte: Dados do autor.

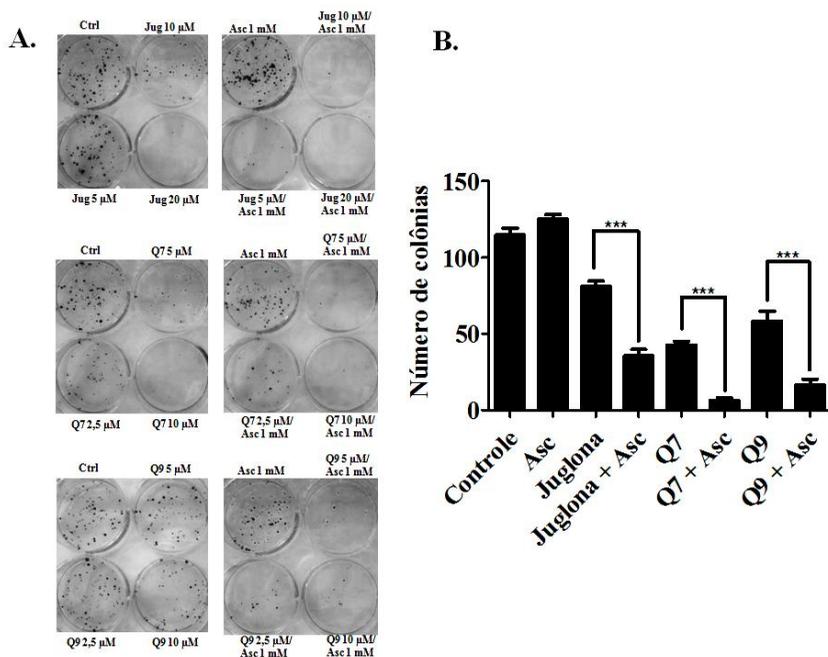
5.2.4 Inibição da proliferação celular

O efeito antiproliferativo dos tratamentos com as naftoquinonas e/ou ascorbato de sódio foi avaliado a partir do ensaio de formação de colônias e expressão da proteína Akt fosforilada (pAkt), componente da via PI3K/Akt/mTOR e com papel fundamental na proliferação celular.

Para o ensaio de morte clonogênica (formação de colônias), as células MCF-7 foram tratadas com concentrações crescentes da juglona (5, 10 e 20 μM), Q7 e Q9 (2,5, 5 e 10 μM) com ou sem ascorbato (1 mM) (Figura 25 (A)). As naftoquinonas administradas sozinhas foram capazes de inibir a proliferação celular de forma concentração-dependente, como indicado pela redução no número de colônias

formadas em comparação com as células não tratadas. No entanto, um considerável efeito antiproliferativo ocorreu nas células tratadas com as naftoquinonas 10 μM associadas ao ascorbato 1 mM ($p < 0,001$ em todos os casos) (Figura 25 (B)). O estado de morte clonogênica, verificado pelo teste de formação de colônias, pode ser induzido e compreende um estado em que as células podem apresentar algumas características de células viáveis, porém sem a capacidade de divisão (MARSDEN et al., 2006). Os resultados obtidos sugerem que as EROs geradas pelas naftoquinonas em associação ao ascorbato de sódio são capazes de induzir dano ao DNA e bloquear a divisão celular, conforme proposto por Bischoff; Hoffman (2002).

Figura 25 – Efeito antiproliferativo da juglona, Q7 e Q9 associadas ou não ao ascorbato de sódio em células MCF-7, após 24 h de tratamento.

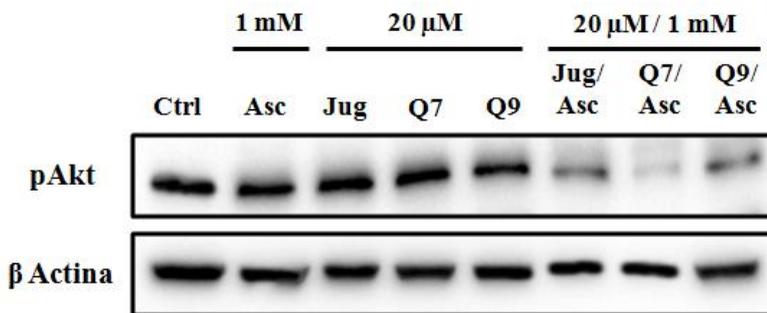


As células MCF-7 foram tratadas durante 24 h com juglona (5, 10 e 20 μM), Q7 e Q9 (2,5, 5 e 10 μM) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (1 mM). (A) Células MCF-7 submetidas a diferentes tratamentos com as naftoquinonas em ordem crescente de concentração e o ascorbato 1 mM. (B) Morte clonogênica induzida pelas naftoquinonas na concentração de 10 μM , com ou sem ascorbato 1 mM. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=3$. (***) representa

uma diferença estatística significativa de $p < 0,001$, entre os grupos das naftoquinonas isoladas e os grupos das naftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio. Fonte: Dados do autor.

Uma vez que os tratamentos foram capazes de induzir a morte clonogênica, foi avaliado se os mesmos afetam a via de sinalização da PI3K/Akt/mTOR em células MCF-7. Para tanto, os níveis da forma ativa fosforilada da Akt (pAkt) foram determinados (Figura 26). A via da PI3K/Akt regula muitos processos biológicos, incluindo sobrevivência, proliferação e diferenciação celular. A ativação desta via é observada em alguns tipos de câncer e está associada à proliferação descontrolada destas células (LEE et al., 2012; VIGLIETTO et al., 2002). Como demonstrado na figura 26, uma significativa inibição da pAkt ocorreu em células MCF-7 tratadas com naftoquinonas associadas ao ascorbato, especialmente Q7/ascorbato, mostrando uma ação direta deste tratamento sobre a inibição da proliferação celular.

Figura 26 – Efeito da juglona, Q7 e Q9 associadas ou não ao ascorbato de sódio sobre a fosforilação da Akt.



Os ensaios de imunoeletroforese foram realizados com o homogenato total de células MCF-7 tratadas durante 24 h com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 (20 μM, a qual corresponde, aproximadamente, à CI_{30} das naftoquinonas) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (1 mM). Fonte: Dados do autor.

A PI3K transmite sinais para a geração de fosfolipídios, os quais causam a fosforilação e ativação da Akt, esta sinaliza para mTOR que atua como um sensor para a captação de nutrientes para o crescimento celular (KHAN et al., 2012; SHIMIZU et al., 2012). A mTOR é uma serina/treonina cinase que desempenha um papel central em variadas vias de sinalização (PI3K/Akt, VEGF, HIF) (SHRIVASTAVA et al.,

2015). A ativação da Akt, ou seja, sua forma fosforilada, estimula a progressão do ciclo celular, sobrevivência, metabolismo e migração através da fosforilação de alguns substratos fisiológicos (VIVANCO; SAWYERS, 2002; STOKOE, 2001). A Akt regula negativamente o ciclo celular através da fosforilação de inibidores do ciclo como p21 e p27, resultando numa proliferação celular descontrolada em vários tipos de câncer (VIGLIETTO et al., 2002; DIEHL et al., 1998). Sendo assim, extensos esforços têm sido feitos para descobrir inibidores da via da PI3K/Akt/mTOR para a terapia antitumoral (SAINI et al., 2013).

Massaoka e colaboradores (2012) sugerem que EROs são capazes de ativar a proteína p38 MAPK e esta, por sua vez, conduz a inibição de proteínas envolvidas na proliferação celular como a pAkt. A p38 MAPK é uma proteína cinase intracelular sensível à modulação redox (JIA et al., 2007). Uma vez que a p38 MAPK é ativada pelo estresse oxidativo, sinaliza para a inibição de vias de proliferação como PI3K/Akt. Gratton e colaboradores (2001) descreveram que o bloqueio da fosforilação da Akt por EROs estimula a apoptose mediada por p38 MAPK.

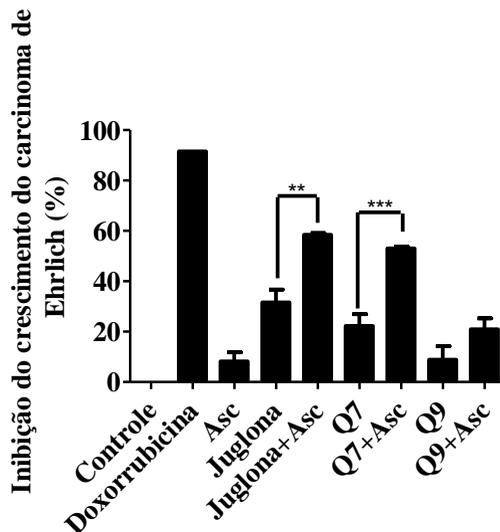
5.3 Efeitos dos tratamentos das naftoquinonas isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio *in vivo*

5.3.1 Inibição do crescimento tumoral e tempo de sobrevivência dos animais

Com o intuito de verificar se os efeitos antitumorais *in vitro* das naftoquinonas sozinhas ou em combinação com o ascorbato são reproduzidos *in vivo*, alguns experimentos foram conduzidos. Para tanto, foram utilizados camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE). O TAE tem a característica de um desenvolvimento rápido (período máximo de 10 dias) o que facilita os estudos de moléculas com possível atividade antitumoral.

A figura 27 apresenta a inibição do crescimento do tumor *in vivo*. Pode-se observar que as naftoquinonas isoladas causaram um efeito moderado no desenvolvimento do tumor. No entanto, as combinações juglona ou Q7 com ascorbato de sódio tiveram a atividade mais potente com alcance de 60% de inibição tumoral, aproximando-se da atividade do quimioterápico padrão doxorubicina, que mostrou uma inibição de mais de 90% do crescimento do tumor.

Figura 27 – Inibição do crescimento tumoral em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich tratados com juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) em associação ou não ao ascorbato de sódio (100 mg/kg).



Os animais foram tratados durante 9 dias consecutivos (i.p.). Solução salina foi utilizada como controle negativo. Doxorubicina (1,2 mg/kg) foi utilizada como controle positivo. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. (**) representa diferença estatística significativa de $p < 0,01$ e (***) representa diferença estatística significativa de $p < 0,001$ entre os grupos das naftoquinonas isoladas e os grupos das naftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio. Fonte: Dados do autor.

O efeito antitumoral da juglona já foi estudado *in vivo* (AITHAL et al., 2012; SUGIE et al., 1998). Porém, o estudo *in vivo* da Q7 e da Q9 isoladas, bem como a associação das três naftoquinonas ao ascorbato de sódio é inédito.

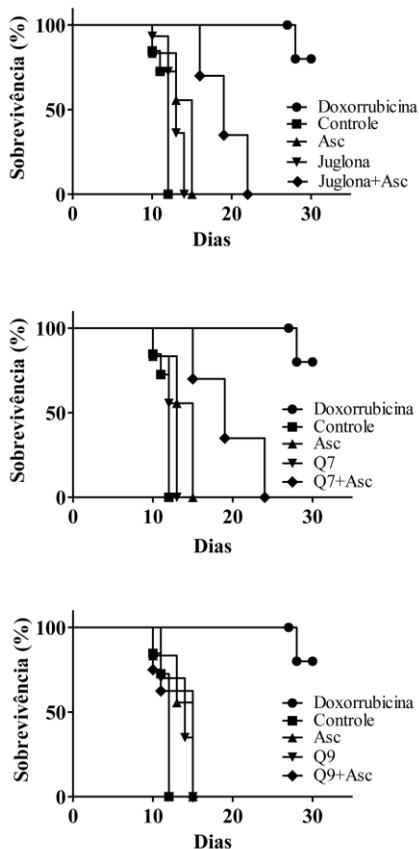
O Registro dos Efeitos Tóxicos de Substâncias Químicas (*Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, RTECS, National Library of Medicine, EUA*) reporta uma CL_{50} de 25 mg/kg para a juglona administrada via intraperitoneal em camundongos (AITHAL et al., 2012). Considerando que neste trabalho foram utilizadas concentrações de 1 mg/kg da juglona, bem como da Q7 e Q9, uma concentração bem abaixo da CL_{50} da juglona, supõe-se que estas naftoquinonas possam ser eficazes para o desenvolvimento de um novo

fármaco antitumoral, no entanto, ensaios devem ser conduzidos para esta comprovação.

Considerando os dados de inibição do crescimento do tumor, é possível sugerir que o potente efeito do tratamento combinado com ascorbato foi confirmado *in vivo* com diferença estatística significativa para a juglona e a Q7. No entanto, o líquido ascítico coletado dos animais que receberam o tratamento com juglona sozinha ou associada ao ascorbato apresentou um alto índice de hemólise (dado não apresentado). Alguns autores relatam que, quando a juglona é administrada por via intravenosa ou intraperitoneal, apresenta limitações como a ocorrência de hemorragias (AITHAL ET AL., 2012; BOELKINS; EVERSON; AUYONG, 1968).

A habilidade para aumentar o tempo de sobrevida dos animais é um dos mais confiáveis critérios para avaliação de um fármaco com atividade antitumoral (CLARKSON; BURCHENAL, 1965). A figura 28 apresenta os gráficos relativos ao número de dias, após a inoculação do tumor, e a porcentagem de animais que sobreviveram após os tratamentos; um aumento na área sob a curva indica um aumento da sobrevivência.

Figura 28 – Tempo de sobrevida dos animais submetidos aos tratamentos com juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) em associação ou não ao ascorbato de sódio (100 mg/kg).



Os animais foram tratados durante 9 dias consecutivos (i.p.), e durante 30 dias foi feito um controle diário do número de óbitos. Solução salina foi utilizada como controle negativo. Doxorubicina (1,2 mg/kg) foi utilizada como controle positivo. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. (**) representa diferença estatística significativa de $p < 0,01$ e (***) representa diferença estatística significativa de $p < 0,001$ entre os grupos das naftoquinonas isoladas e os grupos das naftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio. Fonte: Dados do autor.

As menores áreas sob as curvas nos gráficos correspondem aos grupos de animais controle, que receberam solução salina ao invés dos tratamentos. Em geral, estes animais começaram a morrer já no décimo dia após a inoculação do tumor, e até o décimo segundo dia todos já haviam morrido. O tempo de sobrevivência foi estendido entre 2 e 6 dias quando os animais receberam os tratamentos somente com as naftoquinonas (juglona, Q7 e Q9). Porém, estes animais morreram antes do vigésimo dia. A maior área sob a curva corresponde aos tratamentos com juglona e Q7 ambos em combinação com o ascorbato de sódio, indicando uma maior sobrevida para os animais que receberam estes tratamentos. Vale ressaltar a correlação entre os resultados de inibição do crescimento tumoral com o aumento da sobrevida dos animais que receberam tanto o tratamento juglona/ascorbato como Q7/ascorbato. Com os resultados apresentados nesta seção pode-se inferir que um efeito sinérgico entre a juglona e a Q7 associadas ao ascorbato ocorre também *in vivo*.

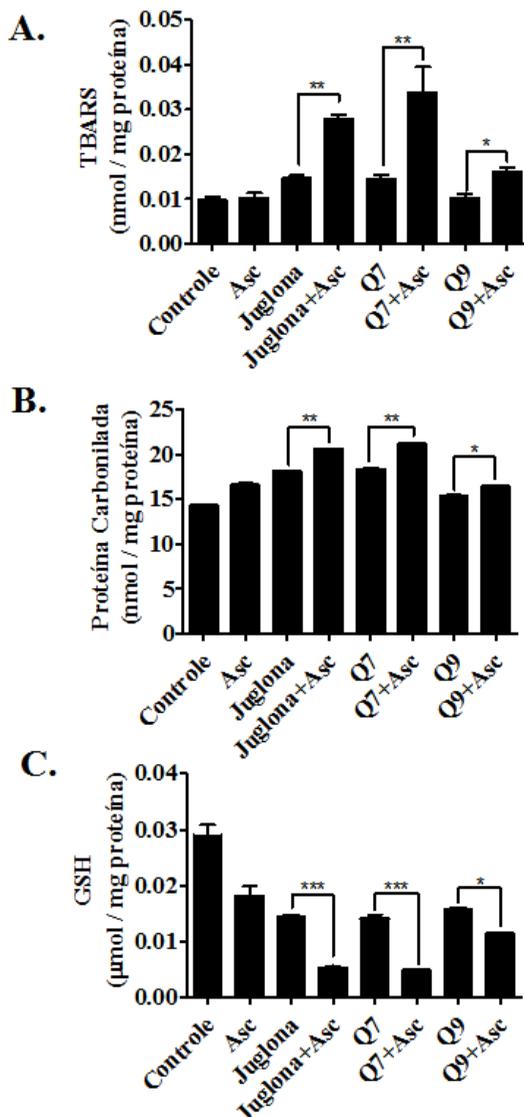
5.3.2 Marcadores de estresse oxidativo

Moléculas indutoras de estresse oxidativo são descritas como promissores agentes antitumorais (BASU et al., 2012; MALHI et al., 2012). Isto é explicado pelo fato das células cancerígenas, em comparação com as células normais, possuírem altos níveis de EROs endógenos em decorrência das alterações no balanço redox, sendo que esta característica as torna mais vulneráveis ao estresse oxidativo induzido por agentes exógenos (SOSA et al., 2013). Os mecanismos de defesa antioxidante normalmente protegem as células dos efeitos deletérios das EROs. Todavia, um aumento proeminente da atividade das defesas antioxidantes indica um mecanismo compensatório das células para tentar combater o estresse oxidativo intracelular exacerbado.

Marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes foram avaliados a fim de verificar se os tratamentos com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9, associadas ou não ao ascorbato de sódio, são capazes de induzir uma maior geração de EROs também em células do carcinoma de Ehrlich.

Na figura 29 estão apresentados os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteína carbonilada (PC) e glutathiona reduzida (GSH) em homogenato de células do TAE de camundongos submetidos ou não aos tratamentos propostos.

Figura 29 – Peroxidação lipídica, carbonilação proteica e conteúdo de GSH em células do tumor ascítico de Ehrlich coletadas de animais tratados com juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) associadas ou não ao ascorbato (100 mg/kg).



Os animais foram tratados durante 9 dias consecutivos (i.p.). As amostras para análise foram coletadas 2 h após o último tratamento. Solução salina foi utilizada como controle negativo. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio

Padrão, n=6. (**) representa diferença estatística significativa de $p < 0,01$ e (***) representa diferença estatística significativa de $p < 0,001$ entre os grupos das naftoquinonas isoladas e os grupos das naftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio. Fonte: Dados do autor.

O malondialdeído (MDA) é um biomarcador de peroxidação lipídica. A lipoperoxidação foi estatisticamente aumentada quando os animais foram tratados com a juglona e a Q7 em associação ao ascorbato ($p < 0,01$) (Figura 29 A). Conforme Zhao e colaboradores (2014), os ácidos graxos poliinsaturados presentes nos lipídios de membrana são uma das principais moléculas prejudicadas pelo estresse oxidativo exacerbado. Alguns produtos da peroxidação lipídica são deletérios às biomoléculas, como é o caso do 4-hidroxinonal (HNE), descrita como a molécula-chave para a sinalização mediada por estresse (YANG et al., 2003(a)). O HNE sinaliza para a parada do ciclo celular e reage diretamente com proteínas e com o DNA, causando danos nessas biomoléculas (YANG et al., 2003(a); AL-SHABANAH et al., 1998; PORTA et al., 1983).

A figura 29 (B) mostra os níveis de proteína carbonilada em células do TAE após os animais serem submetidos aos tratamentos. Os resultados evidenciam que o ascorbato de sódio potencializou a eficácia dos tratamentos com as naftoquinonas juglona e Q7, causando uma carbonilação de proteínas significativamente maior ($p < 0,01$). Para tal efeito pode-se sugerir a ação direta das EROs geradas pela associação das naftoquinonas ao ascorbato sobre as proteínas e pela ação do HNE gerado durante a peroxidação lipídica. As EROs induzem a peroxidação lipídica e a oxidação de grupos tióis das proteínas, e ambos os processos causam alterações na membrana mitocondrial (KROEMER; DALLAPORTA; RESCHE-RIGON, 2008; BOLTON et al., 2000) induzindo a morte celular por apoptose.

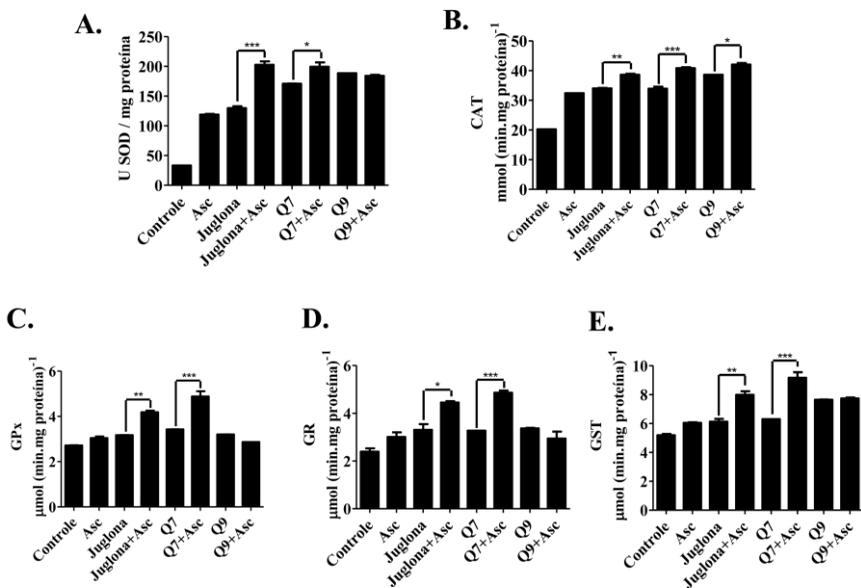
A GSH é um antioxidante intracelular vital que protege as células de danos causados por toxinas, radicais livres e peróxidos (YOU et al., 2014). Moléculas que causam a depleção da GSH podem ser consideradas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais, uma vez que essa depleção é crucial para a autofagia ou apoptose mediada por estresse oxidativo (GACH; DLUGOSZ; JANECKA, 2015; LIU et al., 2015). Os níveis de GSH após os tratamentos estão mostrados na figura 29 (C). Tanto o tratamento com o ascorbato quanto com as naftoquinonas isoladas foram capazes de causar diminuição nos níveis de GSH, quando comparados com as amostras obtidas dos animais controle. No entanto, observa-se uma

diminuição considerável e significativa da GSH nos homogenatos celulares obtidos dos animais que receberam os tratamentos juglona/ascorbato e Q7/ascorbato, sugerindo que as EROs geradas pelo ciclo redox dessas combinações foram capazes de causar a maior depleção da GSH em células do TAE. As EROs oriundas do ciclo redox das quinonas podem reagir com núcleos de enxofre da GSH, assim como em resíduos de cisteína das proteínas, ocasionando a depleção celular de GSH ou a alquilação de proteínas (BOLTON et al., 2000). Klotz; Hou; Jacob (2014) descreveram a ocorrência do ciclo redox e formação de EROs em linhagens celulares expostas ao tratamento com naftoquinonas, e este causou uma significativa depleção da GSH seguida pelo aumento nos níveis de glutathiona dissulfeto (GSSG). Estudos relatam que o conteúdo de GSH intracelular afeta inversamente a apoptose (YOU; PARK, 2012; ESTRELA; ORTEGA; OBRADOR, 2006). A depleção da GSH pelas EROs torna as células tumorais mais sensíveis à indução da apoptose por agentes quimioterápicos (FRIESEN; KIESS; DEBATIN, 2004; ANDERSON et al., 1999). Recentemente foi descrito também que a deficiência da GSH está associada com elevados níveis de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) e quebra na dupla fita do DNA em cultura de células (PUHAKKA et al., 2002). Modificações oxidativas no DNA foram observadas em coelhos submetidos a tratamento que induz a depleção da GSH (GOKCE et al., 2009).

Está bem descrito na literatura que as quinonas exercem sua atividade antitumoral a partir do estresse oxidativo intracelular exacerbado gerado pelo ciclo redox (ZHAO et al., 2014). O anel quinóide pode ser convertido a radical semiquinona por oxidoredutases. A oxidação do radical semiquinona leva à geração de elevados níveis de superóxido, o qual pode estar envolvido na produção de uma variedade de EROs como $\cdot\text{OH}$, ROOH e H_2O_2 (MINOTTI et al., 1998). A ação do ascorbato de sódio sobre a potencialização do ciclo redox das naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 *in vitro* está claramente evidenciado (OURIQUE et al., 2015; FELIPE et al., 2013; KVICINSKI et al., 2012). No entanto, a eficácia desses compostos associados para gerar altas taxas de EROs intracelulares e as consequentes alterações no equilíbrio de enzimas antioxidantes *in vivo* foi comprovada neste trabalho, cujos resultados estão apresentados na figura 30. Os resultados evidenciaram que as naftoquinonas juglona e Q7, quando associadas ao ascorbato de sódio, foram capazes de induzir um alto estresse oxidativo *in vivo*, uma vez que a atividade das enzimas antioxidantes analisadas

está aumentada como alternativa para tentar neutralizar o excesso de EROs intracelular.

Figura 30 – Enzimas antioxidantes em células do TAE, após os animais serem tratados com a juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) associadas ou não ao ascorbato de sódio (100 mg/kg).



Os animais foram tratados durante 9 dias consecutivos (i.p.). As amostras para análise foram coletadas 2 h após o último tratamento. Solução salina foi utilizada como controle negativo. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. (**) representa diferença estatística significativa de $p < 0,01$ e (***) representa diferença estatística significativa de $p < 0,001$ entre os grupos das naftoquinonas isoladas e os grupos das naftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio. Fonte: Dados do autor.

O aumento da geração de EROs e um status redox alterado nas células cancerígenas oferece um interessante alvo molecular para a terapêutica do câncer por agentes que causam geração de EROs intracelular (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009). Apesar de moléculas geradoras de EROs serem amplamente estudadas e promissoras para o tratamento antitumoral, o estudo das mudanças homeostáticas causadas por esses agentes genotóxicos são limitadas. Lin

e colaboradores (2015) propuseram que enquanto alguns agentes quimioterápicos induzem um estado persistente de estresse oxidativo, pode ocorrer uma resposta adaptativa das células tumorais ao excesso de EROs, incluindo a ativação de fatores de transcrição responsáveis pelo aumento da expressão de enzimas antioxidantes.

Acharyya e colaboradores (2015) relataram que o desequilíbrio de enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT está relacionado ao elevado estresse oxidativo intracelular e que as EROs em excesso são capazes de causar danos ao DNA.

A SOD é uma importante enzima devido ao seu papel crucial na dismutação de $O_2^{\cdot -}$. A figura 30 (A) apresenta a atividade da enzima SOD para os diferentes tratamentos testados *in vivo*. Em células do TAE a atividade da SOD aumentou significativamente nos animais que receberam os tratamentos juglona/ascorbato ($p < 0,001$) e Q7/ascorbato ($p < 0,05$), indicando um mecanismo de adaptação dessas células a um limiar crítico nos níveis de EROs ocasionados pelos referidos tratamentos.

A atividade da CAT em células do TAE após os animais receberem os tratamentos propostos está expressa na figura 30 (B). Todas as associações foram capazes de induzir uma atividade significativa da CAT, no entanto, destaca-se a associação Q7/ascorbato, com uma significância de $p < 0,001$ quando comparada ao tratamento com a Q7 isolada, evidenciando que a associação proposta faz com que esta enzima tenha maior atividade, tentando neutralizar as quantidades excessivas de H_2O_2 , transformando este em H_2O e O_2 .

O aumento da atividade das enzimas GPx, GR e GST ocasionado pelos tratamentos está mostrado nas figuras 30 (C, D e E). A GPx é uma família de enzimas antioxidantes responsáveis pela neutralização de quantidades excessivas de H_2O_2 e redução dos hidroperóxidos lipídicos (TOPPO et al., 2009). A GR é responsável pela recuperação da GSH após a oxidação em GSSG (MEISTER; GILBERT, 2006). A GST exerce a atividade catalítica da detoxificação do organismo (SHEEHAN et al., 2001). O ascorbato mostrou-se efetivo quando associado à juglona e à Q7, mas não efetivo quando associado à Q9, no que diz respeito às atividades das enzimas supracitadas. O H_2O_2 parece representar uma das principais EROs resultantes da juglona e Q7 em combinação com o ascorbato, uma vez que marcadores relacionados com as defesas antioxidantes cuja função primária é a eliminação do H_2O_2 foram alteradas em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich.

Os resultados aqui descritos são particularmente interessantes, pois demonstram que os tratamentos com as associações

juglona/ascorbato e Q7/ascorbato são capazes de manter um elevado estresse oxidativo intracelular *in vivo*, comprovado pelo aumento basal da atividade das principais enzimas envolvidas direta ou indiretamente na neutralização de EROs.

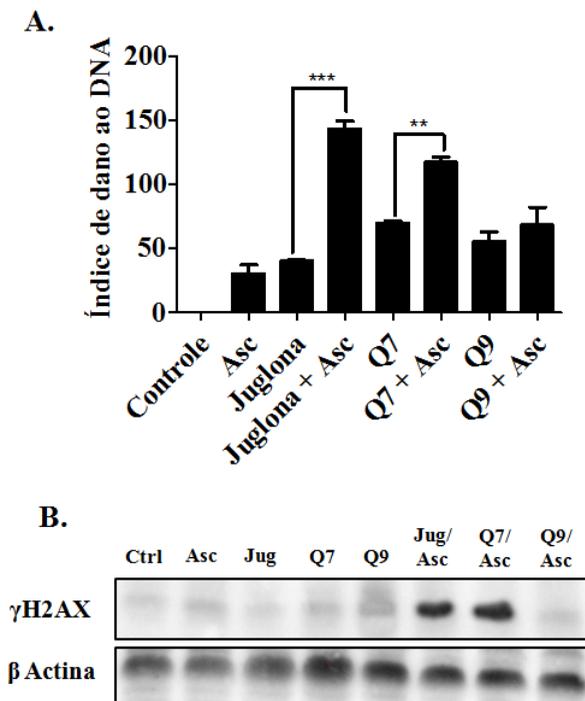
As EROs podem desempenhar importante papel em diversos aspectos fisiológicos intracelulares como nas vias de sinalização e regulação, induzindo danos a macromoléculas, inibição da função proteica e ativação da apoptose via receptor de morte e estresse oxidativo mitocondrial (SHIRAVASTAVA et al., 2015; XIAO et al., 2013, ZHANG et al., 2008). De acordo com Valko e colaboradores (2006), as EROs interferem na expressão de inúmeros genes e vias de transdução de sinal. O peróxido de hidrogênio, o ânion superóxido e o radical hidroxila figuram entre as principais EROs responsáveis por dano ao DNA e indução da morte celular (LEE et al., 2012).

5.3.3 Dano ao DNA e inibição da via de proliferação celular

Está bem descrito na literatura que as EROs induzem danos ao DNA causando quebras na dupla fita. Neste sentido, ensaios foram conduzidos para verificar se o estresse oxidativo exacerbado provocado pela associação das naftoquinonas ao ascorbato foi capaz de induzir danos ao DNA e conseqüente diminuição da proliferação celular *in vivo*.

O ensaio Cometa é um método adequado para detectar danos ao DNA celular (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEIL, 1995). A figura 31 (A) mostra que a fragmentação do DNA foi aumentada significativamente *in vivo* somente nos animais que receberam juglona e Q7 em combinação com o ascorbato, com destaque para a associação juglona/ascorbato ($p < 0,001$). Corroborando os resultados do teste Cometa, a fosforilação da proteína H2AX (γ H2AX) foi aumentada pelos tratamentos juglona e Q7 em associação ao ascorbato (Figura 31 (B)). Tais resultados sugerem que as naftoquinonas juglona e Q7, quando em combinação com o ascorbato, são capazes de causar dano à molécula de DNA também *in vivo*.

Figura 31 – Fragmentação do DNA em células do tumor ascítico de Ehrlich (A) e fosforilação da proteína γ H2AX (B) provocados pelos tratamentos com juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) em associação ou não ao ascorbato de sódio (100 mg/kg) *in vivo*.



Os animais foram tratados durante 9 dias consecutivos (i.p.). As amostras para análise foram coletadas 2 h após o último tratamento. Solução salina foi utilizada como controle negativo. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. (**) representa diferença estatística significativa de $p < 0,01$ e (***) representa diferença estatística significativa de $p < 0,001$ entre os grupos das naftoquinonas isoladas e os grupos das naftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio. Fonte: Dados do autor.

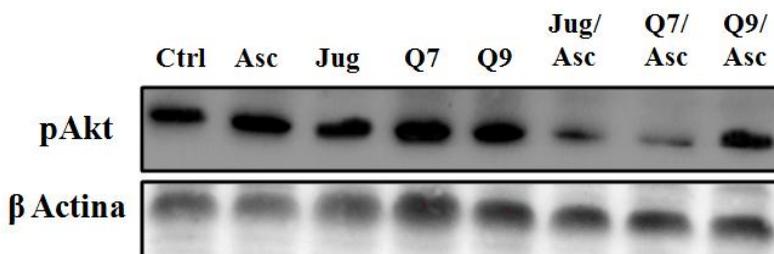
No núcleo da célula, o DNA não existe como uma estrutura isolada, mas sim associada com uma variedade de proteínas, formando o complexo denominado cromatina. O nucleossoma é a unidade básica da cromatina e consiste em 146 pares de bases de DNA envoltos por proteínas denominadas histonas, as quais são extremamente susceptíveis a modificações (LUGER et al., 1997).

A quebra da dupla fita do DNA induz uma cascata de sinalização através da ativação de cinases, iniciando pela família de proteínas fosfatidilinositol-3 cinase, incluindo a proteína cinase dependente de DNA (DNA-PK), a qual é responsável pela fosforilação da histona H2AX (ROGAKOU et al., 1998). Estas cinases recrutam numerosas proteínas que ativam efetores para executar respostas celulares que direcionam a parada do crescimento celular e apoptose (YANG et al., 2003(b)).

Há algum tempo que a citotoxicidade das quinonas tem sido atribuída às modificações e oxidações no DNA causadas diretamente por estes compostos e, principalmente, pelas EROs geradas pelas mesmas (SPENCER et al., 2009; CIESIELKA et al., 2005; O'BRIEN, 1991). As EROs causam dano oxidativo ao DNA, o qual induz a fosforilação da serina 139 no domínio carboxi terminal da histona H2AX (IBUKI; SHIKATA; TOYOOKA, 2015), também são responsáveis por alterar a estrutura da cromatina, afetando a regulação transcricional em níveis epigenéticos (KHAN et al., 2011).

Alterações no DNA estão diretamente relacionadas ao bloqueio da proliferação celular em células tumorais e, por isso, consideradas como uma estratégia promissora para a terapia do câncer (XU; HER, 2015). A Akt é parte importante da via de sinalização da fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K) e é ativada através da fosforilação da Ser 473/474 e Thr 308/309, sendo positivamente regulada nos processos de crescimento e sobrevivência celular (DAI; MATINKA; LI, 2005). Neste sentido, uma vez que os tratamentos das naftoquinonas associadas ao ascorbato mostraram-se promissores no que diz respeito à inibição do crescimento tumoral e dano direto ao DNA, decidiu-se avaliar em células do TAE a fosforilação da proteína Akt (Figura 32). Os ensaios de *immunoblotting* revelaram uma elevada fosforilação da Akt nos animais controle ou que receberam apenas tratamentos com as quinonas isoladas ou ascorbato. No entanto, houve uma diminuição significativa da fosforilação da Akt quando as quinonas juglona e Q7 foram associadas ao ascorbato. Este resultado aumenta a evidência de que a inativação da Akt pode representar uma consequência na ativação da cascata das caspases pelas EROs, uma vez que a degradação da Akt pelas caspases tem sido reportada como um sinal para o desencadeamento da apoptose (XU; LIU; SONGYANG, 2002).

Figura 32 – Inibição da fosforilação da proteína Akt em células de TAE após o tratamento com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (100 mg/kg).



Os animais foram submetidos aos tratamentos durante 9 dias consecutivos (i.p.). As amostras para análise foram coletadas 2 h após o último tratamento. Solução salina foi utilizada como controle negativo (Ctrl). Fonte: Dados do autor.

O efeito antiproliferativo das EROs geradas entre as naftoquinonas testadas em associação ao ascorbato de sódio *in vivo* corrobora os resultados *in vitro* obtidos até o momento. E tal efeito mostrou ter ação direta na inibição do crescimento do tumor nos animais.

Kvciński e colaboradores (2012) demonstraram a inibição da proliferação e migração celular ocasionadas pelo estresse oxidativo quando o ascorbato de sódio é associado à juglona em células T24 (carcinoma de bexiga). Felipe e colaboradores (2013) concluíram que o ciclo redox das naftoquinonas Q7 e Q9 inibiu a proliferação celular na presença do ascorbato, envolvendo um fenótipo senescente, o qual provoca mudanças na via de sinalização da MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno) e parada das funções celulares.

A proteína Akt fosforilada é responsável pela sobrevivência celular, uma vez que inibe a apoptose a partir da fosforilação e inativação de alvos da via pró-apoptótica, tais como membros da família Bcl-2, BAD e GSK-3 β (LEE et al., 2012; ARAFA et al., 2011). O estresse oxidativo pode provocar a inativação da Akt (SHIN et al., 2009; DHAWAN et al., 2002), e Zhang e colaboradores (2001) relataram que o peróxido de hidrogênio atua sobre a proteína cinase C (PKC), a qual desempenha um papel importante na apoptose, uma vez que pode regular de forma negativa a via PI3K/Akt.

Alguns trabalhos mostraram que as EROs podem também estar relacionadas com o aumento da expressão da proteína PTEN, a qual é

responsável pela inibição da fosforilação da Akt e ativação de vias de apoptose, desta forma suprimindo a formação do tumor em modelos animais (YUAN; WHANG, 2002; CANTLEY; NEEL, 1999). A PTEN inibe a PI3K/Akt e promove a translocação nuclear de MDM2, o principal regulador de p53. A MDM2 no citoplasma promove a transativação de p53, indução de p21 e parada do ciclo celular (ARAFI et al., 2011).

Consistente com as observações acima, os resultados apresentados neste tópico evidenciam a capacidade do ascorbato em potencializar o efeito antitumoral das naftoquinonas juglona e Q7, induzindo o dano ao DNA e a inibição da proliferação celular, via inibição da pAkt *in vivo*.

5.3.4 Ciclo celular

A parada do ciclo celular representa uma importante barreira para o crescimento das células tumorais, uma vez que o bom funcionamento do ciclo é essencial para a proliferação. O dano ao DNA ocasiona a parada da proliferação celular devido à inibição de ciclinas importantes para a progressão do ciclo celular (BENADA; MACUREK, 2015).

Num primeiro momento foi avaliado se os tratamentos propostos neste estudo seriam capazes de alterar as diferentes fases do ciclo celular em células do TAE (Figura 33).

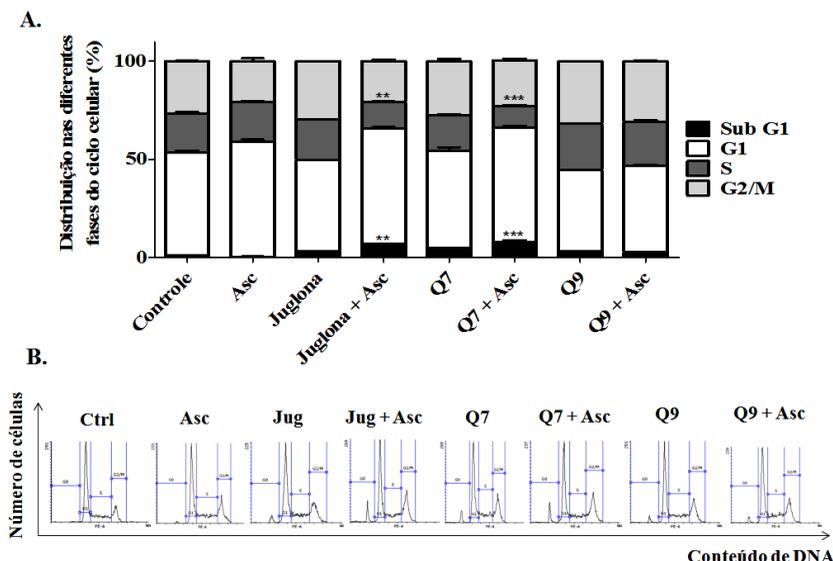
Na figura 33 (A) estão apresentados os dados estatísticos referentes às distribuições de células nas diferentes fases do ciclo celular. Observou-se que o ascorbato potencializou o efeito da juglona ($p < 0,01$) e da Q7 ($p < 0,001$) no que se refere à parada do ciclo celular entre as fases G1 e S, e tal efeito poderia estar relacionado ao forte dano ao DNA causado pelas associações mostradas nas figuras 31 (A) e 31 (B). Segundo Porter; Cukier; Lee (2003), o dano ao DNA causa diminuição na expressão de ciclinas e tal repressão é considerada como um dos mecanismos pelo qual a p53 inibe a transição entre as fases S e G2/M do ciclo celular.

Na figura 33 (B) estão apresentados os histogramas obtidos a partir da análise de cada tratamento. Nos histogramas referentes aos tratamentos juglona/ascorbato e Q7/ascorbato observou-se um pico proeminente na fase sub-G1, o qual representa a morte celular por apoptose causada pelos referidos tratamentos, conforme proposto por Sagar; Green (2009).

São vários os trabalhos que relatam a efetividade das quinonas em promover a parada do ciclo celular, principalmente entre as fases G1

e S (LI et al., 2015; KUNDU et al., 2014). Mallavadhani e colaboradores (2014) verificaram que a juglona é capaz de induzir a parada do ciclo celular em G2/M na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-453. Em células T24, o tratamento com as naftoquinonas Q7 e Q9 na presença do ascorbato mostrou um efeito relevante na diminuição no número de células nas fases G2/M, bem como alteração nas proteínas p53, p21 e p27, mostrando uma regulação do ciclo celular em diferentes *checkpoints* (FELIPE et al., 2013). Os resultados aqui apresentados sugerem que a presença do ascorbato de sódio é capaz de potencializar o efeito das naftoquinonas juglona e Q7 sobre a parada do ciclo celular na fase S, impedindo desta forma, a síntese de novas moléculas de DNA.

Figura 33 – Influência dos tratamentos com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) isoladas ou associadas ao ascorbato de sódio (1 mg/kg) nas diferentes fases do ciclo celular no tumor ascítico de Ehrlich.



Os animais foram tratados durante 9 dias consecutivos (i.p.). As amostras para análise foram coletadas 2 h após o último tratamento. Solução salina foi utilizada como controle negativo (Ctrl). Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. (**) representa diferença estatística significativa de $p < 0,01$ e (***) representa diferença estatística significativa de $p < 0,001$ entre os grupos das naftoquinonas isoladas e os grupos das naftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio. Fonte: Dados do autor.

As EROs são responsáveis pela ativação de vias de sinalização que levam à inibição da proliferação, senescência e morte celular (BANERJEE; MANDAL, 2015). Com o intuito de averiguar mudanças na cascata de sinalização para a parada do ciclo celular provocadas pelas EROs provenientes dos tratamentos propostos e consequente ao dano ao DNA, algumas proteínas envolvidas na progressão do ciclo foram quantificadas (Figura 34).

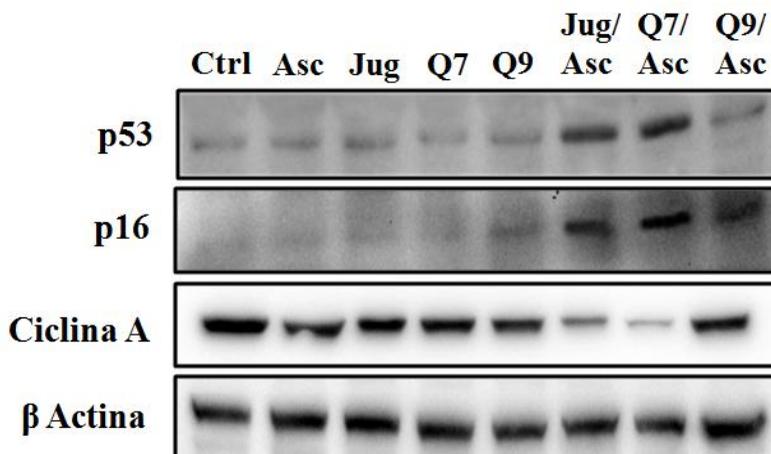
A proteína p53, quando ativa, é uma das principais reguladoras do ciclo e senescência celular em resposta a danos ao DNA e ativação de oncogenes, sinalizando para a morte celular (ITAHANA; DIMRI; CAMPISI, 2001). A p53 pode atuar como um fator de transcrição ativando a síntese de p21, uma das mais importantes proteínas envolvidas na parada do ciclo celular em G1 e G2/M (ARAFI et al., 2011). Foi observado que os tratamentos juglona/ascorbato e Q7/ascorbato induziram a expressão da proteína p53, já os demais tratamentos não mostraram grande efeito sobre essa proteína nas células tumorais (Figura 34). Tal efeito pode ser atribuído ao dano ao DNA causado pelas EROs, que é capaz de induzir a estabilização e ativação da p53 por diferentes mecanismos, incluindo a desregulação celular de oncogenes (HICKMAN; MORONI; HELIN, 2002).

A proteína p16 foi expressa de forma significativa nas amostras oriundas dos animais submetidos aos tratamentos juglona/ascorbato e Q7/ascorbato (Figura 34). As EROs sinalizam para a ativação da proteína p16, que inibe cinases dependentes de ciclinas (CDKs) responsáveis pela fosforilação da proteína Rb, desta forma inibindo a progressão do ciclo celular em células tumorais (BANERJEE; MANDAL, 2015; ZHOU et al., 2015; SANO et al., 1998). Estudos prévios mostram que, em alguns tipos de câncer, a atividade da p53 pode também estar relacionada à sinalização para a hiperfosforilação da proteína Rb (CARPER et al., 2014; SHINOHARA et al., 2000). Assim sendo, p53 e p16 podem estar atuando de forma conjunta e cooperativa na inibição do ciclo celular, que se refletiria na inibição do crescimento tumoral observado após os animais receberem os tratamentos juglona/ascorbato e Q7/ascorbato (Figura 27).

O ciclo celular é controlado pela sequencial ativação e inativação de cinases dependentes de ciclinas (CDKs), que dirigem a progressão do ciclo através da fosforilação/desfosforilação de inúmeros fatores regulatórios, como a proteína Rb (SCHNERCH et al., 2012). A ativação de CDKs requer a associação com ciclinas específicas (SALEH et al., 2015). A associação ciclina A/CDK2, quando ativa, exerce a função na replicação celular e, assim, contribui para progressão do ciclo celular e

mitose (DeBOER et al., 2008). Os resultados apresentados na figura 34 indicam que as naftoquinonas, particularmente a juglona e a Q7, em associação ao ascorbato de sódio mostraram desempenhar uma modulação negativa da ciclina A. Desta forma, pode-se inferir que os tratamentos juglona/ascorbato e Q7/ascorbato ativam as proteínas p53 e p16, impedem a ligação ciclinas/CDKs e, possivelmente, suprimem a hiperfosforilação de Rb, inibindo a progressão do ciclo e consequente proliferação celular.

Figura 34 – Efeito dos tratamentos com as naftoquinonas (1 mg/kg) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (100 mg/kg) sobre proteínas envolvidas na progressão e bloqueio do ciclo celular *in vivo*.



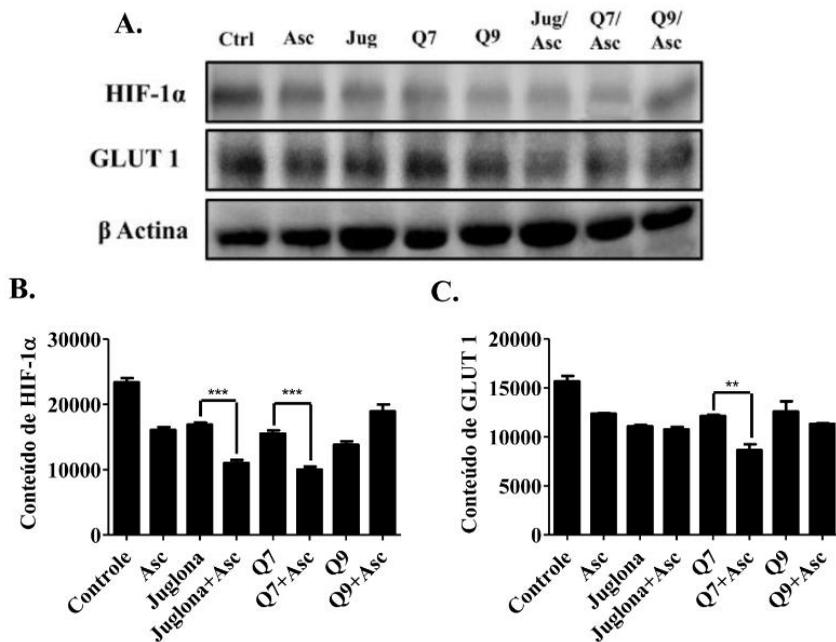
Os animais foram tratados durante 9 dias consecutivos (i.p.). As amostras para análise foram coletadas 2 h após o último tratamento. Solução salina foi utilizada como controle negativo (Ctrl). Fonte: Dados do autor.

5.3.5 Alteração no ambiente de hipóxia e captação de glicose

O aumento nos níveis do mRNA GLUT e do transportador GLUT1 está caracterizado em vários tipos de câncer como coloretal, esofágico, tireoide, pulmão, ovário e mama (SZABLEWSKI, 2013; RASTOGI et al., 2007; SEMENZA, 2003), porém não foram encontrados na literatura, até o momento, relatos da expressão de GLUT1 em células do TAE.

As células tumorais utilizam o GLUT para transportar o ácido ascórbico para o meio intracelular sob a forma de ácido deidroascórbico (DHA), devido à similaridade do DHA com a molécula de glicose. O fator indutor de hipóxia-1 α (HIF-1 α) regula a expressão e atividade dos transportadores GLUT, especialmente GLUT1 e GLUT3, que são os principais responsáveis pela captação de glicose em células tumorais (SADLECKI et al., 2014; LIU et al., 2009). Portanto, devido à importância do GLUT para a captação de glicose e DHA pelas células tumorais, foram avaliadas as presenças do fator regulador de hipóxia HIF-1 α e transportadores GLUT1 em células do TAE (Figura 35).

Figura 35 – Avaliação da presença do fator indutor de hipóxia-1 α (HIF-1 α) e do transportador GLUT1 em células do TAE após o tratamento com juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (100 mg/kg).



Os animais foram submetidos aos tratamentos durante 9 dias consecutivos (i.p.). As amostras para análise foram coletadas 2 h após o último tratamento. Solução salina foi utilizada como controle negativo (Ctrl). (A) Presença das proteínas HIF-1 α e GLUT1 em células do TAE após os animais serem submetidos aos tratamentos com as naftoquinonas isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio. (B) e (C)

Quantificação das bandas de HIF-1 α e GLUT1 pelo *software* ImageJ[®]. Fonte: Dados do autor.

A partir dos resultados da imunoeletroforese (Figura 35 (A)) pode-se inferir que os tratamentos juglona/ascorbato e Q7/ascorbato provocaram uma diminuição significativa do HIF-1 α . Já o transportador de membrana GLUT1 foi reduzido, principalmente, no tratamento Q7/Asc. Resultados estes confirmados pela quantificação das bandas pelo *software* ImageJ[®] (Figura 35 (B) e (C)).

O ambiente de hipóxia, uma característica marcante da maioria dos tumores, surge pela ativação do fator de transcrição HIF-1 α em baixas concentrações de oxigênio (SEMENZA, 2003). A presença de HIF-1 α tem sido relatada em tumores mais agressivos e relacionada com a resistência à quimioterapia (McCARTY, 2013). Já está bem descrito na literatura que o HIF-1 α regula a expressão do GLUT1 e que este aumenta em condições de hipóxia devido à reduzida fosforilação oxidativa e aumento do consumo de glicose (SZABLEWSKI, 2013; CHIBA et al., 2011).

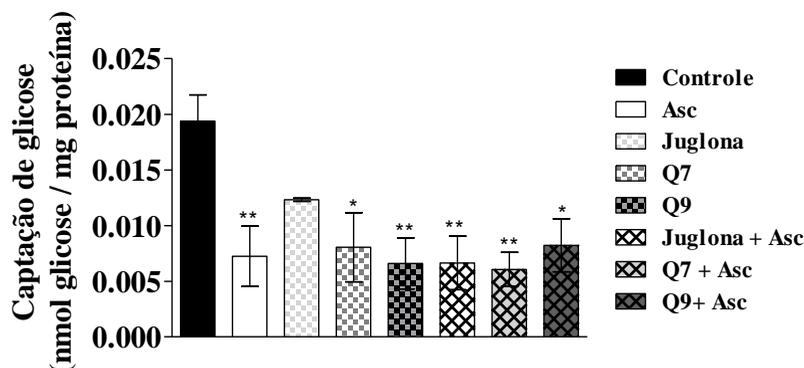
A transcrição do HIF-1 α é altamente regulada pela ativação da via PI3K/Akt/mTOR (SEMENZA, 2003). Já a degradação do HIF-1 α ocorre por hidroxilação mediada por enzimas da família das prolin hidroxilases (PHDs) as quais necessitam de ascorbato como cofator para desempenhar uma ótima atividade (McCARTY, 2013). Kuiper e colaboradores (2014) mostraram que a presença do ascorbato suprime a resposta transcricional do HIF-1 α .

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a diminuição da presença da proteína HIF-1 α , principalmente nas células do TAE obtidas dos animais que receberam os tratamentos juglona/ascorbato e Q7/ascorbato. Sugere-se que esta inibição tenha ocorrido como consequência da inibição da via da PI3K/Akt/mTOR, provocada pelos mesmos tratamentos (Figura 32). Também, os tratamentos supracitados podem ter acelerado a degradação da proteína HIF-1 α devido à presença do ascorbato em uma concentração farmacológica, a qual pode ter influenciado na ativação das prolin hidroxilases que direcionam a degradação da HIF-1 α .

Há aproximadamente 80 anos que o crescimento exacerbado das células cancerígenas é relacionado com o aumento do metabolismo glicolítico, conhecido como “Efeito Warburg” (WARBURG, 1956). Este fenômeno preconiza a necessidade do aumento da captação de glicose, refletido pelo aumento da expressão dos transportadores GLUT, cuja expressão e atividade são induzidas pelo HIF-1 α .

Levando em consideração os resultados obtidos, foi avaliado se a diminuição da presença de HIF-1 α e GLUT1 nas células tumorais foram capazes de interferir também na captação de glicose. Os resultados deste experimento estão apresentados na figura 36. Verifica-se que todos os compostos foram capazes de inibir a captação de glicose de forma significativa quando testados de forma isolada. No entanto, verificou-se uma potencialização do efeito inibitório quando as naftoquinonas foram associadas ao ascorbato de sódio.

Figura 36 – Influência dos tratamentos com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio sobre a captação de glicose em células do tumor ascítico de Ehrlich.



Células do tumor ascítico de Ehrlich foram coletadas, tratadas com as naftoquinonas (10 μ M) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (1 mM) e, posteriormente, adicionada glicose-C¹⁴ para a análise em cintilador. Solução salina foi utilizada como controle negativo (Controle). Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (*) representa diferença estatística significativa de $p < 0,05$ e (**) representa diferença estatística significativa de $p < 0,01$ em relação ao grupo controle. Fonte: Dados do autor.

Como previamente mencionado, as células cancerígenas tem uma alta dependência da glicólise para a obtenção de energia e um deficiente status antioxidante. Portanto, a inibição da glicólise é uma estratégia interessante e promissora para a indução da morte de células tumorais (XU et al., 2005). A principal hipótese deste trabalho é que o ascorbato de sódio melhora o ciclo redox das quinonas juglona, Q7 e Q9, aumentando a formação de EROs intracelulares tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No entanto, foi verificado que as associações juglona/ascorbato e

Q7/ascorbato podem também causar uma alteração no metabolismo energético celular através da inibição de HIF-1 α e GLUT1, possivelmente pelas altas concentrações de ascorbato utilizadas nos tratamentos.

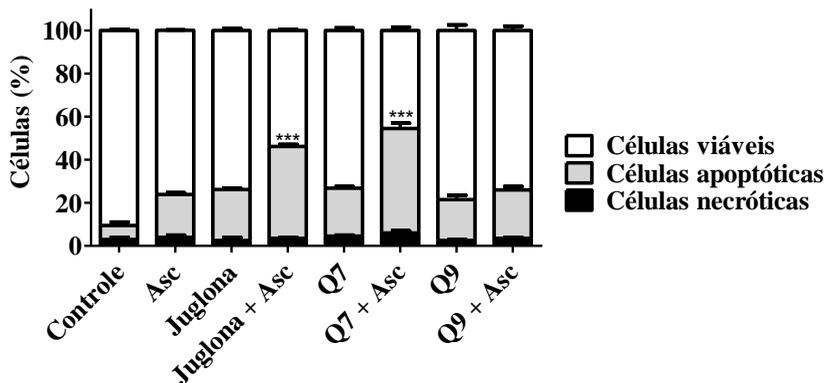
5.3.6 Morte celular

A ativação de vias de sinalização para a morte celular é um dos principais mecanismos contra o desenvolvimento do tumor (SINGH et al., 2011).

Neste estudo foi demonstrado que o ascorbato de sódio, quando associado às naftoquinonas, foi capaz de ativar vias que culminam com a morte de células tumorais *in vivo*. Os dados referentes ao tipo de morte celular induzido pelos tratamentos estão apresentados na figura 37.

Os resultados indicam que a porcentagem de células apoptóticas para as naftoquinonas juglona e Q7 quando associadas ao ascorbato, foi significativamente maior ($p < 0,001$) se comparado aos tratamentos com os compostos isolados. Todos os tratamentos, especialmente a associação Q7/ascorbato, causaram uma porcentagem pequena de morte celular por necrose, sem diferença estatística com o controle. Tendo em vista os resultados apresentados até o momento, propõe-se que o efeito apoptótico dos tratamentos foi sinalizado a partir da drástica geração intracelular de EROs, a qual culmina na ativação da via intrínseca (mitocondrial) da apoptose.

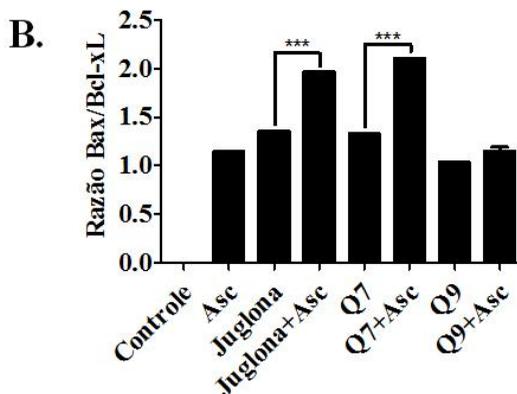
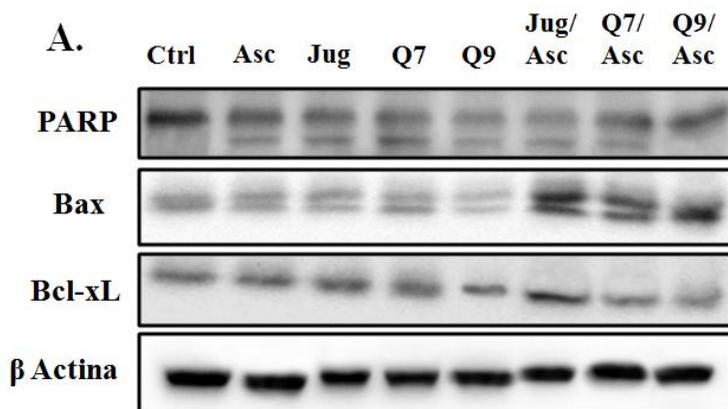
Figura 37 – Tipo de morte celular induzido *in vivo* pelos tratamentos com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (100 mg/kg).



Os animais foram tratados durante 9 dias consecutivos (*i.p.*). As amostras para análise foram coletadas 2 h após o último tratamento. Solução salina foi utilizada como controle negativo. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=6$. (***) representa diferença estatística significativa de $p < 0,001$ entre os grupos das naftoquinonas isoladas e os grupos das naftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio. Fonte: Dados do autor.

O processo de morte celular não é determinado apenas por uma via de sinalização, mas por várias vias que se intercomunicam através de uma rede de moléculas sinalizadoras (CARPER et al., 2014). Proteínas envolvidas na sinalização para a via intrínseca da apoptose foram verificadas após os tratamentos *in vivo* (Figura 38). Os resultados mostraram que os tratamentos em destaque (juglona/ascorbato e Q7/ascorbato) foram capazes de induzir e/ou inibir algumas das principais proteínas envolvidas na apoptose.

Figura 38 – Efeito dos tratamentos com as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 (1 mg/kg) isoladas ou em associação ao ascorbato de sódio (100 mg/kg) sobre proteínas da via intrínseca da apoptose *in vivo*.



Os animais foram tratados durante 9 dias consecutivos (i.p.). As amostras para análise foram coletadas 2 h após o último tratamento. Solução salina foi utilizada como controle negativo. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa de $p < 0,001$ entre os grupos das naftoquinonas isoladas e os grupos das naftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio. Fonte: Dados do autor.

Todos os tratamentos, com exceção da associação Q9/ascorbato, ocasionaram a clivagem da proteína PARP, o que sugere uma possível ativação da via das caspases para a morte celular. As EROs podem

ativar a via mitocondrial da apoptose com posterior liberação do citocromo *c* e consequente clivagem da caspase-3. Uma vez clivada e ativa, a caspase-3 é responsável pela clivagem proteolítica de inúmeros substratos, assim como a PARP, resultando em condensação da cromatina, fragmentação do DNA e morte celular (WANG et al., 2013; YUAN et al., 2012).

Depois de ativada, a proteína p53 regula a expressão de alguns mediadores apoptóticos incluindo membros da família Bcl-2. Proteínas da família Bcl-2, que inclui tanto proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-xL, quanto pro-apoptóticas como a Bax, são os principais moduladores para apoptose (MARTINO; YOULE, 2011).

Os resultados do ensaio de imunoeletoforese mostraram que os tratamentos, com exceção dos grupos controle, Q9 e Q9/ascorbato, provocaram uma clivagem da proteína Bax em decorrência do aumento do estresse oxidativo intracelular, além de um aumento proeminente desta proteína nos tratamentos juglona/ascorbato e Q7/ascorbato. De encontro à ativação da Bax, a proteína anti-apoptótica Bcl-xL foi inibida, indicando possivelmente, a indução da apoptose pelos tratamentos.

A proteína Bax está solúvel no citosol sob condições normais. Na presença de estímulos apoptóticos, como o excesso de EROs, a Bax é translocada para o interior da membrana mitocondrial formando poros que afetam a permeabilidade desta membrana (JI; QU; ZOU, 2011) e liberação de citocromo *c* (FUNICANE et al., 1999). Alguns estudos mostram que o estresse oxidativo em excesso provoca clivagem da Bax induzindo a translocação desta proteína à membrana mitocondrial (LU et al., 2011; JUNGAS et al., 2002; HEMMATI et al., 2002; WOOD et al., 1998). A clivagem proteolítica da Bax foi descrita em células tumorais tratadas com vários agentes quimioterápicos que ativam a via intrínseca da apoptose (TANG et al., 2014; CAO; DENG; MAY, 2003; YEO et al., 2002; GAU; DOU, 2000; WOOD et al., 1998). Ji et al. (2011) relataram que quinonas foram capazes de induzir a apoptose em células de câncer gástrico (SGC-7901) e este efeito foi associado à geração de EROs, ativação da Bax, despolarização mitocondrial, liberação do citocromo *c* e ativação da caspase-3.

A razão Bax/Bcl-xL determina o quanto um tratamento é capaz de induzir ou não a apoptose via mitocondrial (DIAS; BAILLY, 2005; SAMBAZIOTIS; KAPRANOS; KONTOGEOGOS, 2003). Conforme os dados apresentados na figura 38 (B) as associações juglona/ascorbato e Q7/ascorbato foram capazes de aumentar significativamente ($p < 0,001$) a razão Bax/Bcl-xL, indicando um aumento da presença da

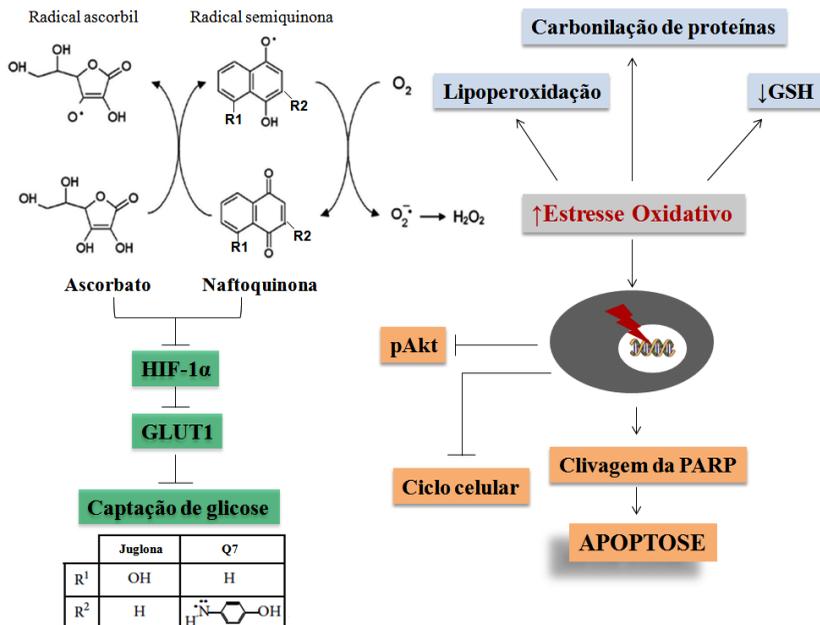
proteína Bax em detrimento da presença da proteína Bcl-xL. Estes resultados estão de acordo com Ola et al. (2011) que descrevem que a superexpressão da Bax e baixa expressão da Bcl-xL, podem ocasionar dano mitocondrial com a liberação de citocromo *c* e ativação da caspase-3, conduzindo as células para a morte por apoptose.

Em resumo, a associação Q9/ascorbato não demonstrou efeito antitumoral benéfico principalmente quando avaliada *in vivo*. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho mostram que as associações juglona/ascorbato e, principalmente Q7/ascorbato apresentam efeitos biológicos satisfatórios, evidenciados pelo dano ao DNA, citotoxicidade, efeito antiproliferativo e morte celular. A potência da atividade antitumoral para a associação Q7/ascorbato pode estar relacionada ao potencial de óxido-redução elevado entre a naftoquinona e o ascorbato *in vivo*.

A hipótese para o mecanismo de ação antitumoral *in vivo* das naftoquinonas estudadas em associação ao ascorbato de sódio está mostrada na figura 39. Sugere-se que as associações juglona/ascorbato e Q7/ascorbato são capazes de aumentar o estresse oxidativo intracelular e as EROs geradas causam danos aos lipídios de membrana, proteínas e alteração nos níveis de marcadores de estresse oxidativo. Ainda, sugere-se que as EROs causam danos ao DNA ativando vias de sinalização para a parada do ciclo celular, inibição da proliferação e morte celular por apoptose. Os mesmos tratamentos são capazes de alterar o perfil glicolítico das células tumorais inibindo o HIF-1 α e o transportador de glicose GLUT1, conseqüentemente alterando a captação de glicose.

Os resultados aqui apresentados foram publicados no periódico *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* sob o título “*DNA damage and inhibition of Akt pathway in MCF-7 cells and Ehrlich tumor in mice treated with 1,4-naphthoquinones in combination with ascorbate*” (Anexo 1), e no periódico *Biochemical and Biophysical Research Communications* sob o título *In vivo inhibition of tumor progression by 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone) and 2-(4-hydroxianilino)-1,4-naphthoquinone (Q7) in combination with ascorbate* (Anexo 2).

Figura 39 – Hipótese para o mecanismo de ação antitumoral *in vivo* das naftoquinonas juglona e Q7 em associação ao ascorbato de sódio.



Fonte: Do autor.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitem concluir que:

- As naftoquinonas em estudo, principalmente a juglona e a Q7, quando associadas ao ascorbato de sódio, são capazes de intercalar no DNA. Este efeito deve-se provavelmente ao radical semiquinona gerado durante o ciclo redox entre os compostos.
- Todas as associações testadas causaram clivagem oxidativa do DNA, indicando que a juglona, a Q7 e em menor escala a Q9, quando associadas ao ascorbato, geraram grandes quantidades de EROs e os mesmos possivelmente foram capazes de atacar o C4 da desoxirribose.
- O ascorbato aumentou a citotoxicidade das naftoquinonas aproximadamente duas vezes em células MCF-7.
- O ascorbato potencializou a geração intracelular de EROs em células MCF-7, quando associados às naftoquinonas juglona e Q7.
- Confirmando os resultados dos efeitos sobre o DNA, as EROs geradas pelas associações juglona /ascorbato e Q7/ascorbato induziram dano direto ao DNA em células MCF-7, resultado confirmado pelo teste Cometa e pelo aumento da fosforilação da histona H2AX (γ H2AX).
- Os danos ao DNA não foram capazes de ocasionar a fragmentação da proteína PARP em células MCF-7, indicando uma morte celular diferente da apoptose para este tipo celular.
- As naftoquinonas juglona, Q7 e Q9, quando associadas ao ascorbato, têm a capacidade de diminuir consideravelmente a proliferação de células MCF-7, resultado confirmado pela diminuição da formação de colônias e inibição da fosforilação da proteína Akt.
- Quando testadas *in vivo*, as associações juglona/ascorbato e Q7/ascorbato inibiram significativamente o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich. Juglona/ascorbato, mas principalmente, Q7/ascorbato aumentaram o tempo de sobrevivência dos animais de forma significativa, quando comparados ao grupo controle.

- Quando as naftoquinonas juglona, Q7 e Q9 (esta de modo mais modesto) são associadas ao ascorbato de sódio, aumentam consideravelmente a lipoperoxidação, o dano às proteínas e diminui o conteúdo intracelular de GSH em células do TAE. As associações juglona/ascorbato e Q7/ascorbato aumentaram a atividade de enzimas antioxidantes, evidenciando que os tratamentos induzem um estresse oxidativo exacerbado *in vivo*.
- Juglona/ascorbato e Q7/ascorbato causaram dano no DNA das células do TAE *in vivo*, sendo este efeito evidenciado pelo teste Cometa e aumento da fosforilação da histona H2AX (γ H2AX).
- A via de proliferação celular PI3K/Akt/mTOR foi inibida em células do TAE pelos tratamentos juglona/ascorbato e Q7/ascorbato.
- O ciclo celular foi significativamente afetado entre as fases G1 e S após os animais serem tratados com as associações juglona/ascorbato e Q7/ascorbato. Tal efeito foi confirmado pelo aumento dos níveis das proteínas p16 e p53 e diminuição da ciclina A.
- Os tratamentos juglona/ascorbato e Q7/ascorbato alteram o metabolismo energético em células do TAE através da diminuição dos níveis de HIF-1 α , GLUT-1 e redução da captação de glicose. Estes resultados podem contribuir para a inibição da proliferação e morte celular.
- A morte celular por apoptose induzida pela associação das quinonas juglona e Q7 ao ascorbato de sódio *in vivo* foi comprovada a partir do ensaio de morte celular e proteínas envolvidas na via intrínseca da apoptose. A clivagem da Bax evidenciou a apoptose induzida por estresse oxidativo.
- Especialmente a associação Q7/ascorbato apresentou um promissor efeito antitumoral *in vitro* e também confirmado *in vivo*. Desta forma encoraja-se o aprofundamento das pesquisas desta associação de compostos como uma promissora candidata para o tratamento do câncer.

7. PERSPECTIVAS

Uma vez que as associações juglona/ascorbato e, especialmente a Q7/ascorbato, foram triadas como promissores agentes antitumorais, os estudos *in vivo* merecem ser aprofundados. Para tanto, se propõe como próximas etapas da pesquisa:

- Avaliar o efeito antitumoral dos tratamentos em um modelo de tumor xenográfico;
- Avaliar a atividade mitocondrial e papel do retículo endoplasmático na geração de EROs;
- Avaliar o índice de HNE (4-hidroxinonenal), um dos possíveis causadores de danos a biomoléculas;
- Avaliar a expressão e presença da proteína DNA-PK (proteína cinase dependente de DNA), que está aumentada após o dano ao DNA;
- Avaliar as proteínas PTEN e mTOR na via de proliferação celular PI3K/Akt/mTOR;
- Avaliar outras proteínas-chave na progressão do ciclo celular como a p21 e p27;
- Avaliar a possível inibição da topoisomerase II provocada pelos tratamentos propostos;
- Avaliar a expressão e atividade da proteína JNK (proteína cinase ativada por estresse) durante o processo de morte celular;
- Avaliar a via da p38 MAPK induzida por EROs e responsável pela diferenciação celular e apoptose.

Adicionalmente, com os resultados obtidos até o momento, tornam-se relevantes os investimentos em estudos pré-clínicos referentes à toxicidade dos tratamentos juglona/ascorbato e Q7/ascorbato em órgãos como fígado, rins e coração, este último devido à cardiotoxicidade ocasionada por alguns fármacos antitumorais derivados de quinonas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYYA, N. et al. Green tea (*Camellia sinensis*) alleviates arsenic-induced damages to DNA and intestinal tissues in rat and in situ intestinal loop by reinforcing antioxidant system. **Environ. Toxicol.**, v. 30, p. 1033-1044, 2015.

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

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AGARWAL, M.L. et al. The p53 network. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 1-4, 1998.

AGARWAL, B.B. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. **Cancer Cell**, v. 6, p. 203-208, 2004.

AGUS, D.B.; VERA, J.C.; GOLDE, D.W. Stromal cell oxidation: a mechanism by which tumors obtain vitamin C. **Cancer Res.**, v. 59, p. 4555-4558, 1999.

AHN, J.S. et al. JAK2V617F mediates resistance to DNA damage-induced apoptosis by modulating FOXO3A localization and Bcl-xL deamidation. **Oncogene**, 2015. Artigo *in press*.

AIRLEY, R. et al. Glucose transporter glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 928-934, 2001.

AITHAL, K.B. et al. Tumor growth inhibitory effect of juglone and its radiation sensitizing potential: in vivo and in vitro studies. **Integr. Cancer Ther.**, v. 11, p. 68-80, 2012.

AITHAL, B.K. et al. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. **Cell. Biol. Int.**, v. 33, p. 1039-1049, 2009.

ALANO, C.C.; YING, W.H.; SWANXON R.A. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD(+) depletion and mitochondrial permeability transition. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 18895-18902, 2004.

ALESSI, D.R.; COHEN, P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 8, p. 55-62, 1998.

ALMHANNA, K.; STROSBERG, J.; MALAFA, M. Targeting AKT protein kinase in gastric cancer. **Anticancer Res.**, v. 31, p. 4387-4392, 2011.

AL-SHABANAH, O.A. et al. Thymoquinone protects against doxorubicin-induced cardio-toxicity without compromising its antitumoractivity. **Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 17, p. 193-198, 1998.

ANDERSON, C.P. et al. Depletion of glutathione by buthionine sulfoxine is cytotoxic for human neuroblastoma cell lines via apoptosis. **Exp. Cell Res.**, v. 246, p. 183-192, 1999.

ANTONSSON, B. et al. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 11615-11623, 2001.

ARAFI, S.A. et al. Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. **Mutat. Res.**, v. 706, p. 28-35, 2011.

AUSIO, J; ABBOTT, D.W. The many tales of a tail: carboxy-terminal tail heterogeneity specializes histone H2A variants for defined chromatin function. **Biochem.**, v. 41, p. 5945-5949, 2002.

AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxid. Med. Cell Longev.**, v. 2014, no. 360438, 2014.

AYYAGARI, N.V.; BRARD, L. Bithionol inhibits ovarian cancer cell growth *in vitro* – studies on mechanism(s) of action. **BMC Cancer**, v. 24, p. 61, 2014.

BABICH, H.; STERN A. In vitro cytotoxicities of 1,4-naphthoquinone and hydroxylated 1,4-naphthoquinones to replicating cells. **J. Appl. Toxicol.**, v. 13, p. 353-358, 1993.

BADER, A.G.; KANG, S.; VOGT, P.K. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 1475-1479, 2006.

BAI, P.; CANTO, C. The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease. **Cell Metab.**, v. 16, p. 290-295, 2012.

BANATH, J.P.; MACPHAIL, S.H.; OLIVE, P.L. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. **Cancer Res.**, v. 64, p. 7144-7149, 2004.

BANERJEE, K.; MANDAL, M. Oxidative stress triggered by naturally occurring flavones apigenin results in senescence and chemotherapeutic effect in human colorectal cancer cells. **Redox Biol.**, v. 5, p. 153-162, 2015.

BANERJEE, T.; CHAKRAVARTI, D. A peek into the complex realm of histone phosphorylation. **Mol. Cell Biol.**, v. 31, p. 4858-4873, 2011.

BASU, S. et al. Targeting the mitochondrial pathway to induce apoptosis/necrosis through ROS by a newly developed Schiff's base to overcome MDR in cancer. **Biochimie**, v. 94, p. 166-183, 2012.

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

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

BECK, R. et al. Hsp90 cleavage by an oxidative stress leads to its client proteopins degradation and cancer cell death. **Biochem. Pharmacol.**, v. 77, p. 375-383, 2009b.

BENADA, J.; MACUREK, L. Targeting the checkpoint to kill cancer cells. **Biomolecules**, v. 5, p. 1912-1937, 2015.

BENITES, J. et al. Biological evaluation of donor-acceptor aminonaphthoquinones as antitumor agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 6052-6057, 2010.

BENITES, J. et al. Part 2: influence of 2-euryfuryl-1, 4-naphthoquinone and its perihydroxy derivatives on both cell death and metabolism of TLT cells, a murine hepatoma cell line. Modulation of cytotoxicity by vitamin C. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 57, p. 615-619, 2009.

BENITES, J. et al. Studies on quinones. Part 42: Synthesis of furylquinone and hydroquinones with antiproliferative activity against human tumor cell lines. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 862-868, 2008a.

BENITES, J. et al. Part 1: anticancer activity of two euryfurylbenzoquinone on TLT, a murine hepatoma cell line. Role of vitamin C in the mechanism leading to cell death. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 43, p. 1813-1817, 2008b.

BENITEZ-BRIBIESCA, L.; SANCHEZ-SUAREZ, P. Oxidative damage, bleomycin, and gamma radiation induce different types of DNA strand breaks in normal lymphocytes and thymocytes: a comet assay study. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 887, p. 133-149, 1999).

BERGER, N.A. Symposium – cellular-response to DNA damage – the role of poy(ADP-ribose)-poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. **Radiat. Res.**, v. 101, p. 4-15, 1985.

BERKERS, C.R. et al. Metabolic regulation by p53 family members. **Cell Metab.**, v. 18, p. 617-633, 2013.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 61, p. 882-888, 1963.

BIN, J.Y. et al. Growth inhibition and induction of apoptosis in sarcoma 180 cells by juglone in vivo. **Fut. BioMed. Informat. Eng.**, p. 325-328, 2008.

BIRD, R.P.; DRAPER, H.H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 299-305, 1984.

BISCHOFF, G.; HOFFMANN, S. DNA-binding of drugs used in medicinal therapies. **Curr. Med. Chem.**, v. 9, p. 321-348, 2002.

BHAKTA, D.; SIVA, R. Morindone, an anthraquinone, intercalates DNA sans toxicity: a spectroscopic and molecular modeling perspective. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 167, p. 885-896, 2012.

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

BOELKINS, J.N.; EVERSON, L.K.; AUYONG, T.K. Effects of intravenous juglone in the dog. **Toxicol.**, v. 6, p. 99-102, 1968.

BOLTON, J.L. et al. Role of quinones in toxicology. **Am. Chem. Soc.**, v. 13, p. 136-156, 2000.

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

BOSE, A.; DEY, D.; BASU, S. Interactions of guanine and guanosine hydrates with quinones: a laser flash photolysis and magnetic field effect study. **J. Phys. Chem.**, v. 112, p. 4914-4920, 112.

BOUQUET, F.; MULLER, C.; SALLES, B. The loss of γ H2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. **Cell Cycle**, v. 5, p. 1116-1122, 2006.

BOULARES, A.H. et al. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 22932-22940, 1999.

BOVERIS, A.; FRAGA, C.G., VARSAVSKY, A.I., KOCH, O.R. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 227(2), p. 534-541, 1983.

BOX, V.G. The intercalation of DNA double helices with doxorubicin and nogalamycin. **J. Mol. Graph Model.**, v. 26, p. 14-19, 2007.

BOZULIC, L. et al. PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. **Mol. Cell.**, v. 30, p. 203-213, 2008.

BRAHIMI-HORN, M.C.; BELLOT, G.; POUYSSÉGUR, J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 21, p. 67-72, 2011.

BRÖKER, L.E.; KRUYT, F.A.E.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, p. 3155-3162, 2005.

BROWNE, R.W.; ARMSTRONG, D. HPLC analysis of lipid-derived polyunsaturated fatty acid peroxidation products in oxidatively modified human plasma. **Clin. Chem.**, v. 46, no. 6, p. 829-836, 2000.

BURKHART, D.L.; SAGE, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, p. 671-682, 2008.

BURLINSON, R.R. et al. Proceedings of the Fourth International Workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. **Mutat. Res.**, v. 627, p. 31-35, 2007.

BYUN, H.S. et al. Prevention of TNF-induced necrotic cell death by rottlerin through a Nox1 NADPH oxidase. **Exp. Mol. Med.**, v. 40, p. 186-195, 2008.

CABAL-HIERO, L.; LAZO, P.S. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. **Cell Signal**, v. 24, p. 1297-1305, 2012.

CALBERG, I.; MANNERVICK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymol.**, v. 113, p. 484-490, 1985.

CALDERON, P.B. et al. Potential therapeutic application of the association of vitamins C and K3 in cancer treatment. **Curr. Med. Chem.**, v. 9, p. 2271-2285, 2002.

CANTLEY, L.C.; NEEL, B.G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, p. 4240-4245, 1999.

CAO, X.; DENG, X.; MZY, S. Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax. **Blood**, v. 102, p. 2605-2614, 2003.

CARCAMO, J.M. et al. Vitamin C suppresses TNF alpha-induced NF kappa b activation by inhibiting I kappa B alpha phosphorylation. **Biochem.**, v. 41, p. 12995-13002, 2002.

CARNERO, A. The PKB/AKT pathway in cancer. **Curr. Pharmac. Design**, v. 16, p. 34-44, 2010.

CARPER, M.B. et al. RGS16, a novel p53 and pRb cross-talk candidate inhibits migration and invasion of pancreatic cancer cells. **Genes & Cancer**, v. 5, p. 420-435, 2014.

CARR, A.; FREI, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? **FASEB J.**, v. 13, p. 1007-1024, 1999.

CARRETERO, J. et al. Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 17, p. 567-574, 1999.

CARVAJAL, D. et al. Induction of cell death by a novel naphthoquinone containing a modified anthracycline ring system. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 78, p. 764-777, 2011.

CASTRO, M.L. et al. Radiosensitisation by pharmacological ascorbate in glioblastoma multiforme cells, human glial cells, and HUVECs depends on their antioxidant and DNA repair capabilities and is not cancer specific. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 74C, p. 200-209, 2014.

CAZAROLLI, L.H. et al. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2'-O-alpha-I-rhamnopyranosyl)-beta-L-fucopyranoside on ¹⁴C-glucose uptake. **Chem. Biol. Interact.**, v. 179, p. 407-412, 2009.

CELETTI, A. et al. H4(D10S170), a gene frequently rearranged with RET in papillary thyroid carcinomas: functional characterization. **Oncogene**, v. 23, p. 109-121, 2004.

CERVANTES-CERVANTES, M.P. et al. Copper increases the damage to DNA and proteins caused by reactive oxygen species. **Biolog. Trace Elem. Res.**, v 103, p. 229-248, 2005.

CHEN, Q. et al. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 13604-13609, 2005.

CHÈNE, P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, p. 102-109, 2003.

CHIBA, I. et al. Clinical significance of GLUT-1 expression in patients with esophageal cancer treated with concurrent chemoradiotherapy. **Oncol. Lett.**, v. 2, p. 21-28, 2011.

CHIPUK, J.E.; GREEN, D.R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization. **Trends Cell Biol.**, v18, p. 157-164, 2008.

CHO, S.Y. et al. Coumestrol suppresses hypoxia inducible factor 1 α by inhibiting ROS mediated sphingosine kinase 1 in hypoxic PC-3 prostate cancer cells. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 24, p. 2560-2564, 2014.

CHOWDURY, D. et al. γ H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. **Mol. Cell**, v. 20, p. 801-809, 2005.

CIESIELKA, E. et al. Cytotoxicity, cellular uptake and DNA damage by daunorubicin and its new analogues with modified daunosamine moiety. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 21, p. 139-147, 2005.

CLARK, N.G. The fungicidal activity of substituted 1,4-naphthoquinones part II: alkoxy, phenoxy and acyloxy derivatives. **Pestic. Sci.**, v. 15, p. 235-240, 1984.

CLARKSON, B.D.; BURCHENAL, J.H. Preliminary screening of antineoplastic drugs. **Progress Clin. Cancer**, v. 1, p. 625-629, 1965.

COLLADO, M.; SERRANO, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. **Nat. Rev. Cancer**, v. 10, p. 51-57, 2010.

COOPER, G.M. **The Cell: A molecular approach**. 2^o ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates. The Eukaryotic Cell Cycle. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>

COPELAND, N.A. et al. Ciz 1cooperates with cyclin-A-CDK2 to activate mammalian DNA replication in vitro. **J. Cell Sci.**, v. 123, p. 1108-1115, 2010.

CORTI, A.; CASINI, A.F.; POMPELLA, A. Cellular pathways for transport and efflux of ascorbate and dehydroascorbato. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 500, p. 107-115, 2010.

CULLEN, J.J.; MITROS, F.A.; OBERLEY, L.W. Expression of antioxidant enzymes in diseases of the human pancreas: another link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. **Pancreas**, v. 7, p. 23-26, 2003.

DAI, D.L.; MARTINKA, M.; LI, G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, p. 1473-1482, 2005.

DANIEL, P.T. et al. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**, v. 15, p. 1022-1032, 2001.

DATTA, S.R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M.E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev.**, v. 15, p. 2905-2927, 1999.

DAVIES, M.A.; SAMUELS, Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. **Oncogene**, v. 29, p. 5545-5555, 2010.

DeBOER, L. et al. Cyclin A/CDK2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. **Oncogene**, v. 27, p. 4261-4268, 2008.

DEGTEREV, A. et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. **Nat. Chem. Biol.**, v. 1, p. 112-119, 2005.

DEJEANS, N. et al. Endoplasmic reticulum calcium release potentiates the ER stress and cell death caused by an oxidative stress in MCF-7 cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 79, p. 1221-1230, 2010.

DHAWAN, P. et al. Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression. **Cancer Res.**, v. 62, p. 7335-7342, 2002.

DIAS, N.; BAILLY, C. Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. **Biochem. Pharmacol.**, v. 70, p. 1-12, 2005.

DIEHL, J.A. et al. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and sub-cellular localization. **Genes Dev.**, v. 12, n. 22, p. 3499-3511, 1998.

DONG, J. et al. Induction of DNA damage and G2 cell cycle arrest by Diepoxybutane through the activation of the Chk1-dependent pathway in mouse germ cells. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 28, p. 518-531, 2015.

DOWNS, J.A. Chromatin structure and DNA double-strand break responses in cancer progression and therapy. **Oncogene**, v. 26, p. 7765-7772, 2007.

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

ELBENDARY, A.A. et al. Relationship between p21 expression and mutation of the p53 tumor suppressor gene in normal and malignant ovarian epithelial cells. **Clin. Cancer Res.**, v. 2, p. 1571-1575, 1996.

ELHABIRI, M. et al. Electrochemical properties of substituted 2-methyl-1,4-naphthoquinones: redox behavior prediction. **Chemistry – A Europ. J.**, v. 21, p. 3415-3424, 2015.

ESTRELA, J.M.; ORTEGA, A.; OBRADOR, E. Glutathione in cancer biology and therapy. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 43, no. 2, p. 143-181, 2006.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEIL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FARRELL, N.P. et al. Exploring the DNA binding/cleavage, cellular accumulation and topoisomerase inhibition of 2-hydroxy-3-(aminomethyl)-1,4-naphthoquinone Mannich bases and their platinum(II) complexes. **J. Inorg. Biochem.**, v. 119, p. 54-64, 2013.

FELIPE, K.B. et al. Antiproliferative effects of phenylaminonaphthoquinones are increased by ascorbate and associated with the appearance of a senescent phenotype in human bladder cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 433, p. 573-578, 2013.

FELIPE, K.B. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Estudo do mecanismo de ação antiproliferativa e antitumoral de extratos de *Casearia sylvestris* e de fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio.** Florianópolis, 2014, 170 f. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Santa Catarina – Departamento de Bioquímica.

FLASHMAN, E. et al. Investigating the dependence of the hypoxia-inducible factor hydroxylases (factor inhibiting HIF and prolyl hydroxylase domain 2) on ascorbate and other reducing agents. **Biochem. J.**, v. 427, p. 135-142, 2010.

FLOHÉ, R.B.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1830, p. 3289-3303, 2013.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v. 105(1), p. 114-121, 1984.

FOSTER, E.R.; DOWNS, J.A. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. **FEBS J.**, v. 272, p. 3231-3240, 2005.

FRASER, M. et al. p53 is a determinant of X-linked inhibitor of apoptosis protein/Akt-mediated chemo-resistance in human ovarian cancer cells. **Cancer Res.**, v. 63, p. 7081-7088.

FRIESEN, C.; KIESS, Y.; DEBATIN, K.M. A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. **Cell Death Differ.**, v. 11, p. 73-85, 2004.

FUNG, T.K.; MA, H.T.; POON, R.Y. Specialized roles of the two mitotic cyclins in somatic cells: cyclin A as an activator of M phase-promoting factor. **Mol. Boil. Cell**, v. 18, p. 1861-1873, 2007.

FUNICANE, D.M. et al. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. **Boil. Chem.**, v. 274, p. 2225-2233.

GACH, K.; DLUGOSZ, A.; JANECKA, A. The role of oxidative stress in anticancer activity of sesquiterpene lactones. **Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 388, p. 477-486, 2015.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ.**, v. 19, p. 107-120, 2012.

GAO, G.; DOU, Q.P. N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome c release and apoptotic cell death. **J. Cell Biochem.**, v. 80, p. 53-72, 2000.

GARCIA-MACEIRA, P.; MATEO, J. Silibinin inhibits hypoxia-inducible factor-1 alpha and mTOR/p70S6K/4E-BP1 signalling pathway in human cervical and hepatoma cancer cells: implications for anticancer therapy. **Oncogene**, v. 28, p. 313-324, 2009.

GAUTHIER, M.L. et al. Abrogated response to cellular stress identifies DCIS associated with subsequent tumor events and defines basal-like breast tumors. **Cancer Cell**, v. 12, p. 479-491, 2007.

GHOLIVAND, M.B.; KASHANIAN, S; PEYMAN, H. DNA-binding, DNA cleavage and cytotoxicity studies of two anthraquinone derivatives. **Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.**, v. 15, p. 232-240, 2012.

GIACINTI, C.; GIORDANO, A. RB and cell cycle progression. **Oncogene**, v. 25, p. 5220-5227, 2006.

GLORIEUX, C. et al. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. **Biochem. Pharmacol.**, v. 15, p. 1384-1390, 2011.

GOKCE, G. et al. Glutathione depletion by buthionine sulfoximine induces oxidative damage to DNA in organs of rabbits in vivo. **Biochemistry**, v. 48, p. 4980-4987, 2009.

GONG, D. et al. Cyclin A2 regulates nuclear-envelope breakdown and the nuclear accumulation of cyclin B1. **Curr. Biol.**, v. 17, p. 85-91, 2007.

GRANA, X.; GARRIGA, J.; MAYOL, X. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. **Oncogene**, v. 17, p. 3365-3383, 1998.

GRATTON, J.P. et al. Akt down-regulation of p38 signaling provides a novel mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated cytoprotection in endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 30359-30365, 2001.

GROSS, A. et al. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. **EMBO J.**, v. 17, p. 3878-3885, 1998.

GU, L. et al. Intervention in genotoxic stress-induced senescence by Cordycepin through activation of eIF2 and suppression of Sp1. **Toxicol. Sci.**, v. 134, p. 345-354, 2013.

GUO, S.X. et al. Hypermethylation of p16 and p15 genes and RB protein expression in acute leukemia. **Leuk. Res.**, v. 24, p. 39-46, 2000.

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

GUTIERREZ, P.L. The metabolism of quinone-containing alkylating agents: free radical production and measurement. **Front. Biosci.**, v. 5, p. D629-D638, 2000.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mescapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 7130-7139, 1976.

HAHN, W.C.; WEINBERG, R.A. Modeling the molecular circuitry of cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 331-341, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. ed 4. **Free Radic. Biol. Med.**, Oxford: Clarendon Press, 2006.

HALLIWELL, B. Free radical reactions in human disease; **Environmental stressors in health and disease**, J. Fuchs and L. Packer, New York, 2001.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J.**, v. 219, no. 1, p. 1-14, 1984.

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

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

HANDE, K.R.; Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1400, p. 173-184, 1998.

HAMPTON, M.B.; MORGAN, P.E.; DAVIES, M.J. Inactivation of cellular caspases by peptide-derived tryptophan and tyrosine peroxides. **FEBS Lett.**, v. 527, p. 289-292, 2002.

HEIDEN, M.G.V.; CANTLEY, L.C.; THOMPSON, C.B. Understanding the Warburg Effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, p. 1029, 2009.

HEMMATI, P.G. et al. Adenovirus-mediated overexpression of p14(ARF) induces p53 and bax-independent apoptosis. **Oncogene**, v. 21, p. 40-61, 2002.

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

HERRERO-RUIZ, J. et al. β TrCP controls the lysosome-mediated degradation on CDK1, whose accumulation correlates with tumor malignancy. **Oncotarget**, v. 5, p. 7563-7574, 2014.

HERSCHKOWITZ, J.I. et al. The functional loss of the retinoblastoma tumour suppressor is a common event in basal-like and luminal B breast carcinomas. **Breast Cancer Res.**, v. 10, p. R75, 2008.

HICKMAN, E.S.; MORONI, M.C.; HELIN, K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 12, p. 60-66, 2002.

HOFFER, L.J. et al. Phase I clinical trial of i.v. ascorbic acid in advanced malignancy. **Ann. Oncol.**, v. 19, p. 1969-1974, 2008.

HOLMGREN, A. Regulation of ribonucleotide reductase. **Curr. Topics Cell. Regul.**, v. 19, p. 47-76, 1981.

HOHN, A.; JUNG, T.; GRIMM, S.; CATALGOL, B.; WEBER, D.; GRUNE, T. Lipofuscin inhibits the proteasome by binding to surface motifs. **Free Radic. Biol.**, v. 50, p. 585-591, 2011.

HUANG, Z. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. **Oncogene**, v. 19, p. 6627-6631, 2000.

HUANG, X.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. DNA damage induced by DNA topoisomerase I and topoisomerase II-inhibitors detected by histone H2AX phosphorylation in relations to the cell cycle phase and apoptosis. **Cell Cycle**, v. 2, p. 614-619, 2003.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; DE FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v. 31, no. 5, p. 1170-1179, 2008.

HURLEY, L.H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. **Nature Rev. Cancer**, v. 2, p. 188-200, 2002.

HUSSAIN, A.R. et al. Thymoquinone suppresses growth and induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in primary effusion lymphoma. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 50, p. 978-987, 2011.

IANNETTI, A. et al. Regulation of p53 and Rb links the alternative NF- κ B pathway to EZH2 expression and cell senescence. **PLoS Genet.**, v. 10, p. e1004642, 2014.

IBUKI, Y.; SHIKATA, M., TOYOOKA, T. γ H2AX is a sensitive marker of DNA damage induced by metabolically activated 4-(methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. **Toxicol. In Vitro**, v. 29, p. 1831-1838, 2015.

ICHIKAWA, Y. et al. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. **J. Clin. Invest.**, v. 124, p. 617-630, 2014.

ILIAKIS, G. et al. Mechanisms of DNA Double strand break repair and chromosome aberration formation. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 104, p. 14-20, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA:
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>.
Acesso eletrônico em 02 de setembro de 2015.

ITAHAMA, K.; DIMRI, G.; CAMPISI, J. Regulation of cellular senescence by p53. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 2784-2791, 2001.

ITOH, M. et al. Cleavage of Bax-alpha and Bcl-x(L) during carboplatin-mediated apoptosis in squamous cell carcinoma cell line. **Oral Oncol.**, v. 36, p. 277-285, 2000.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.**, v. 6, p. 69-90, 2011.

JI, Y.B.; QU, Z.Y; ZOU, X. Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 63, p. 69-78, 2011.

JIA, Y.T. et al. Activation of p38 MAPK by reactive oxygen species is essential in a rat model of stress-induced gastric mucosal injury. **J. Immunol.**, v. 179, p. 7808-7819, 2007.

JIANG, B.H.; LIU, L.Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. **Adv. Cancer Res.**, v. 102, p. 19-65, 2009.

JIANG, Q. et al. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. **Coordin. Chem. Rev.**, v. 251, p. 1951-1972, 2007.

JONATHAN, B.C. Energetics of drug-DNA interactions. **Biopolymers**, v. 44, p. 201-215, 1997.

JONES, R.G.; THOMPSON, C.B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. **Genes Dev.**, v. 23, p. 537-548, 2009.

JOYCE, N.C.; ZHU, C.C.; HARRIS, D.L. Relationship among oxidative stress, DNA damage, and proliferative capacity in human corneal endothelium. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 50, p. 2116-2122, 2009.

JUN, T.; BOCHU, W.; LIANCAI, Z. Hydrolytic cleavage of DNA by quercetin manganese(II) complexes. **Coll. Surf. B: Biointerfaces**, v. 55, p. 149-152, 2007.

JUNGAS, T. et al. Glutathione levels and BAX activation during apoptosis due to oxidative stress in cells expressing wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 27912-27918, 2002.

KAMEI, H. et al. Inhibition of cell growth in culture by quinones. **Cancer Biother. Radiopharm.**, v. 13, p. 185-188, 1998.

KANDEL, E.S.; HAY, N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. **Exp. Cell Res.**, v. 253, p. 210-229, 1999.

KANG, J.S. et al. L-ascorbic acid (vitamin C) induces the apoptosis of B16 murine melanoma cells via a caspase-8-independent pathway. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 52, p. 693-698, 2003.

KAPLAN, E.L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J. Am. Statist. Assoc.**, v. 53, p. 457-481, 1958.

KARANIKA, S. et al. DNA damage response and prostate cancer: defects, regulation and therapeutic implications. **Oncogene**, DOI:10.1038/onc.2014.238.

KASHANIAN, S. et al. Multi-spectroscopic DNA interaction studies of sunset yellow food additive. **Mol. Biol. Rep.**, v. 39, p. 10045-10051, 2012.

KASHANIAN, S. et al. DNA binding, DNA cleavage, and cytotoxicity studies of two new copper (II) complexes. **DNA and Cell Biol.**, v. 30, p. 287-296, 2011.

KASHANIAN, S.; ZEIDALI, S.H. DNA binding studies of tartrazine food additive. **DNA Cell Biol.**, v. 30, p. 499-505, 2011.

KELLETT, A. et al. Radical-induced DNA damage by cytotoxic square-planar copper (II) complexes incorporating o-phthalate and 1,10-phenanthroline or 2,2'-dipyridyl. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 53, p. 564-576, 2012.

KENNEDY, S.G. et al. Akt/protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. **Mol. Cell Biol.**, v. 19, p. 5800-5810, 1999.

KHAN, N. et al. Dual inhibition of phosphatidylinositol-kinase/Akt and mammalian target of rapamycin signaling in human nonsmall cell lung cancer cells by a dietary flavonoid fisetin. **Int. J. Cancer**, v. 130, p. 1695-1705, 2012.

KHAN, S.N. et al. Mitoxantrone induced impediment of histone acetylation and structural flexibility of the protein. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 60, p. 209-218, 2011.

KIM, J.A. et al. Novel anti-cancer role of naphthazarin in human gastric cancer cells. **Int. J. Oncol.**, v. 40, p. 157-162, 2012.

KIM, W.Y.; SHARPLESS, N.E. VHL inactivation: a new road to senescence. **Cancer Cell**, v. 13, p. 295-297, 2008.

KIM, Y.S. et al. TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. **Mol. Cell**, v. 26, p. 675-687, 2007.

KITAGAWA, R.R. et al. A new cytotoxic naphthoquinone from *Paepalanthus latipes*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 52, p. 1487-1488, 2004.

KLOTZ, L.O.; HOU, X.; JACOB, C. 1,4-naphthoquinones: from oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling. **Molecules**, v. 19, 14902-14918, 2014.

KNOWLES, H.J. et al. Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells. **Cancer Res.**, v. 63, p. 1764-1768, 2003.

KOPTYRA, M. et al. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. **Blood**, v. 108, p. 319-327, 2006.

KRISHNAKUMAR, R.; KRAUS, W.L. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. **Mol. Cell**, v. 39, p. 8-24, 2010.

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

KÖHL, R.; ZHOU, J.; BRÜNE, B. Reactive oxygen species attenuate nitric-oxide-mediated hypoxia-inducible factor-1 alpha stabilization. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 40, p. 1430-1442, 2006

KOU, J.F. et al. Chiral ruthenium(II) anthraquinone complexes as dual inhibitors of topoisomerase I and II. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 17, p. 81-96, 2012.

KRUM, S.A. et al. BRCA1 forms a functional complex with γ -H2AX as a late response to genotoxic stress. **J. Nucleic. Acids**, v. 27, 2010.

KUIPER, C. et al. Intracellular ascorbate enhances hypoxia-inducible factor (HIF)-hydroxylase activity and preferentially suppresses the HIF-1 transcriptional response. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 69, p. 308-317, 2014.

KUNDU, J. et al. Mechanistic perspectives on cancer chemoprevention/chemotherapeutic effects of thymoquinone. **Mutat. Res.**, v. 768, p. 22-34, 2014.

KUO, L.J.; YANG, L.X. γ -H2AX – A novel biomarker for DNA double-strand breaks. **In vivo**, v. 22, p. 305-310, 2008.

KVIECINSKI, M.R. et al. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cell. **Biochem. Bioph. Res. Commun.**, v. 421, p. 268-273, 2012.

KVIECINSKI, M.R. et al. SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity. **J. Supercrit. Fluids**, v. 56, p. 243-248, 2011.

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

LAVRIK, I.N.; KRAMMER, P.H. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. **Cell Death Differ.**, v. 19, p. 36-41, 2012.

LE, S.B. et al. Inhibition of mitochondrial respiration as a source of adaphostin-induced reactive oxygen species and cytotoxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 8860-8872, 2007.

LEE, S.J. et al. Effects of Rutaecarpine on hydrogen peroxide-induced apoptosis in murine heap-1c1c7 cells. **Biomol. Ther.**, v. 20, p. 487-491, 2012.

LEE, K. et al. Anthacycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, p. 2353-2358, 2009.

LEONE, V. et al. Ccdc6 knock-in mice develop thyroid hyperplasia associated to an enhanced CREB1 activity. **Oncotarget**, v. 6, p. 15628-15638, 2015.

LERMAN, L.S. The structure of the deoxyribonucleic acid (DNA)-acridine complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 49, p. 94-102, 1963.

LEVINE, A.J.; PUZIO-KUTER, A.M. The control of the metabolic switch in cancer by oncogenes and tumor suppressor genes. **Science**, v. 330, p. 1340-1344, 2010.

LEVINE, R.L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LI, Y.P. et al. Synthesis and biological evaluation on geldanamycin analogs against human cancer cells. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 75, p. 773-782, 2015.

LI, F.; ZHAO, C.; WANG, L. Molecular-targeted agents combination therapy for cancer: developments and potentials. **Int. J. Cancer**, v. 134, p. 1257-1269, 2014.

LI, Y.; SCHERLLHORN, H.E. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. **J. Nutrit.**, v. 137, p. 2171-2184, 2007.

LIN, C. et al. Acetylation at lysine 71 inactivates superoxide dismutase 1 and sensitizes cancer cells to genotoxic agents. **Oncotarget**, v. 6, p. 20578-20591, 2015.

LIN, Y. et al. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 10822-10828, 2004.

LIU, H. et al. Methionine and cystine double deprivation stress suppresses glioma proliferation via inducing ROS/autophagy. **Toxicol. Lett.**, v. 232, p. 349-355, 2015.

LIU, Y. et al. The expression and significance of HIF-1 α and GLUT3 in glioma. **Brain Res.**, v. 1304, p. 149-154, 2009.

LOPEZ-ALARCON, C.; ARENAS, A.; LISSI, E.; SILVA, E. The role of protein-derived free radicals as intermediaries of oxidative processes. **Biomol. Concepts**, v. 5, p. 119-130, 2014.

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

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, J.; TAN, M.; CAI, Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. **Cancer Letters**, v. 356, p. 156-164, 2015.

LU, T.H. et al. Arsenic induces pancreatic beta-cell apoptosis via the oxidative stress-regulated mitochondria-dependent and endoplasmic reticulum stress-triggered signaling pathways. **Toxicol. Lett.**, v. 201, p. 15-26, 2011.

LU, W.; OGASAWARA, M.A.; HUANG, P. Models of reactive oxygen species in cancer. **Drug Discov. Today Dis. Models**, v. 4, p. 67-73, 2007.

LUBOS, E. et al. Glutathione peroxidase-1 modulates lipopolysaccharide-induced adhesion molecule expression in endothelial cells by altering CD14 expression. **FASEB J.**, v. 24, p. 2525-2532, 2010.

LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, p. 251-260, 1997.

LUNT, S.Y.; VANDER HEIDEN, M.G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 27, p. 441-464, 2011.

MAEHAMA, T.; DIXON, J.E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1 dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 13375-13378, 1998.

MARTINO, J.C.; YOULE, R.J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. **Dev. Cell**, v. 21, p. 92-101, 2011.

MATOBA, S. et al. P53 regulates mitochondrial respiration. **Science**, v. 312, p. 1650-1653, 2006.

MCCARTY, M.F. Expression and/or activity of the SVCT2 ascorbate transporter may be decreased in many aggressive cancers, suggesting potential utility for sodium bicarbonate and dehydroascorbic acid in cancer therapy. **Med. Hypotheses**, v. 81, p. 664-670, 2013.

MCCARTY, M.F.; BARROSO-ARANDA, J.; CONTRERAS, F. Practical strategies for suppressing hypoxia-inducible factor activity in cancer therapy. **Med. Hypotheses**, v. 74, p. 789-797, 2010.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 25, p. 6049-6055.

McGAHON, A.J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. **Methods Cell Biol.**, v. 46, p. 153-185, 1995.

MAHALINGAM, D. et al. Trail receptor signaling and modulation: are we on the right TRAIL? **Cancer Treatment Rev.**, v. 35, p. 280-288, 2009.

MAKAREVIC, J. et al. Amygdalin blocks bladder cancer cell growth *in vitro* by diminishing cyclin A and CKD2. **PLoS One**, v. 9, p. e105590, 2014.

MALLAVADHANI, U.V. et al. Synthesis and anticancer activity of some novel 5,6-fused hybrids of juglone based 1,4-naphthoquinones. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 83, p. 84-91, 2014.

MALHI, S.S. et al. Intracellular delivery of redox cyclor-doxorubicin to the mitochondria of cancer cell by folate receptor targeted mitocancerotropic liposomes. **Int. J. Pharm.**, v. 432, p. 63-74, 2012.

MARENGO, B. et al. PKC δ sensitizes neuroblastoma cells to L-buthionine-sulfoximine and etoposide inducing reactive oxygen species overproduction and DNA damage. **PLoS One**, v. 7, p. e14661, 2011.

MARSDEN, V.S. et al. Apaf-1 and caspase-9 are required for cytokine withdrawal-induced apoptosis of mast cells but dispensable for their functional and clonogenic death. **Blood**, v. 107, n. 5, 2006.

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

MAY, J.M. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? **FASEB J.**, v. 13, p. 995-1006, 1999.

McELIGOT, A.J.; YANG, S.; MEYSKENS, F.L. Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. **Ann. Rev. Nutr.**, v. 25, p. 261-295, 2005.

McGAHON, A.J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods in Cell Biol.**, v. 46, p. 153-185, 1995.

MEDINA, R.A.; OWEN, G.I. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. **Biol. Res.**, v. 35, p. 9-26, 2002.

MEISTER, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. **Pharmacol. Ther.**, v. 51, p. 155-194, 1991.

MEISTER, A.; GILBERT, H.F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v. 63, p. 69-172, 1990.

MEREDITH, M.E.; HARRISON, F.E.; MAY, J.M. Differential regulation of the ascorbic acid transporter SVCT2 during development and in response to ascorbic acid depletion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 414, p. 737-742, 2011.

MESSINA, J.P.; LAWRENCE, D.A. Cell cycle progression of glutathione-depleted human peripheral blood mononuclear cells is inhibited at S phase. **J. Immunol.**, v. 143, no. 6, p. 1974-1981, 1989.

MINOTTI, G. et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, p. 185-229, 2004.

MINOTTI, G. et al. The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. **FASEB J.**, v. 12, p. 541-552, 1998.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.**, v. 247, p. 188-192, 1972.

MONTENEGRO, R.C. et al. Cytotoxicity activity of naphthoquinone with special emphasis on juglone and its 5-o-methyl derivative. **Chem. Biol. Interact.**, v. 184, p. 439-448, 2010.

MORANDI, P. et al. Cardiac toxicity of high-dose chemotherapy. **Bone Marrow Transplant.**, v. 35, p. 323-334, 2005.

MORGAN, M.J.; KIM, Y.S. NOX1, reactive oxygen species, JNK, and necrotic cell death. **Cell Death Biol. Dis.**, p. 135-162, 2014.

MORGAN, M.J.; LIU, Z. Programmed cell death with a necrotic-like phenotype. **Biomol. Concepts**, v. 4, p. 259-275, 2013.

MORGAN, D.O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 13, p. 261-291, 1997.

MORRIS, D. et al. Unveiling the mechanisms for decreased glutathione in individuals with HIV infection. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2012, no. 734125, 2012.

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

MURRAY, A.W. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. **Cell**, v. 116, p. 221-234, 2004.

NAKANISHI, C; TOI, M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, p. 297-309, 2005.

NECKERS, L. Development of small molecule Hsp90 inhibitors: utilizing both forward and reverse chemical genomics for drug identification. **Curr. Med. Chem.**, v. 10, p. 733-739, 2003.

NEIDNICH, K.E.; SCHOBERT, R. Combinatorial effects of thymoquinone on the anti-cancer activity of doxorubicin. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 67, p. 867-874, 2011.

NGUYEN, M.V. et al. Quinone compounds regulate the level of ROS production by the NADPH oxidase Nox4. **Biochem. Pharmacol.**, v. 85, p. 1644-1654, 2013.

NIE, J. et al. Decitabine, a new star in epigenetic therapy: the clinical application and biological mechanism in solid tumors. **Cancer Lett**, DOI: 10.1016/j.canlet. 2014.08.010.

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

OCTAVIA, Y. et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 52, p. 1213-1225, 2012.

OLA, M.S. et al. Role of Bcl-2 family protein and caspases in the regulation of apoptosis. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 351, p. 41-58, 2011.

OLEINICK, N.L.; EVANS, H.H. Poly(ADP-ribose) and the response of cells to ionizing-radiation. **Radiat. Res.**, 101, p. 29-46, 1985.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS: http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/. Acesso eletrônico em 18 de agosto de 2015.

OTTO, M. et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, p. 913-922, 2007.

OZER, A.; BRUICK, R.K. Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one? **Nat. Chem. Biol.**, v. 3, p. 144-153, 2007.

PADAYATTY, S. et al. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. **Annals Internal Med.**, v. 140, p. 533-537, 2004.

PADAYATTY, S.J.; LEVINE, M. Reevaluation of ascorbate in cancer treatment: emerging evidence, open minds and serendipity. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 19, p. 423-425, 2000.

PAGE, E.L. et al. Hypoxia-inducible factor-1 α stabilization in nonhypoxic conditions: role of oxidation and intracellular ascorbate depletion. **Mol. Biol. Cell**, v. 19, p. 86-94, 2008.

PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P.J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action, **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 18, p. 497-503, 2007.

PAN, Y. et al. Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. **Mol. Cell Biol.**, v. 27, p. 912-925, 2007.

PARK, S.H. et al. CDK2-dependent phosphorylation of Suv39H1 is involved in control of heterochromatin replication during cell cycle progression. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, p. 6196-6207, 2014.

PARONS, D.W. et al. Colorectal cancer: mutations in a signaling pathway. **Nature**, v. 436, p. 792, 2005.

PAULL, T. et al. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. **Curr. Biol.**, v. 10, p. 886-895, 2000.

PAVLETICH, N.P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. **J. Mol. Biol.**, v. 287, p. 821-828, 1999.

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

PODHORECKA, M.; SKLADANOWSKI, A.; BOZKO, P. H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy. **J. Nucleic Acids**, v. 2011, 2011.

PORTA, E.A. et al. Acute adriamycin cardiotoxicity in rats. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 41, p. 125-137, 1983.

PORTER, L.A.; CUKIER, I.H.; LEE, J.M. Nuclear localization of cyclin B1 regulates DNA damage-induced apoptosis. **Blood**, v. 101, p. 1928-1933, 2003.

PRIOR, I.A.; LEWIS, P.D.; MATTOS, C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. **Cancer Res.**, v. 72, p. 2457-2467, 2012.

PUHAKKA, A. et al. Modulation of DNA single-strand breaks by intracellular glutathione in human lung cells exposed to asbestos fibers. **Mutat. Res.**, v. 514, p. 7-17, 2002.

RAHMANTO, A.S.; MORGAN, P.E.; HAWKINS, C.L.; DAVIES, M.J. Cellular effects of peptide and protein hydroperoxides. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 48, p. 1071-1078, 2010.

RASTOGI, S. et al. Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines. **Cancer Lett.**, v. 257, p. 244-251, 2007.

REBER, U. et al. Potentiation of treosulfan toxicity by the glutathione-depleting agent buthionine sulfoximine in human malignant glioma cells: the role of bcl-2. **Biochem. Pharmacol.**, v. 155, p. 349-359, 1998.

REDON, C.E. et al. Recent developments in the use of γ -H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. **Aging**, v. 2, p. 168-174, 2011.

REES, D.C.; KELSEY, H.; RICHARDS, J.D. Acute haemolysis induced by high dose ascorbic acid in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **BMJ**, v. 306, p. 841-842, 1993.

REQUENA, J.R.; LEVINE, R.L.; STADTMAN, E.R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 221-226, 2003.

REUBOLD, T.F.; ESCHENBURG, S. A molecular view on signal transduction by the apoptosome. **Cell Signal.**, v. 24, p. 1420-1425, 2012.

RHEE, S.G. et al. Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via

post-translational modification. **Antiox. Redox Signal.**, v. 7, p. 619-626, 2005.

RIORDAN, H.D. et al. A pilot clinical study of continuous intravenous ascorbate in terminal cancer patients. **P. R. Health Sci. J.**, v. 24, p. 269-276, 2005.

RIORDAN, H.D. et al. Intravenous vitamin C as a chemotherapy agent: a report on clinical cases. **P. R. Health Sci. J.**, v. 23, p. 115-118, 2004.

RIUS, J. et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. **Nature**, v. 453, p. 807-811, 2008.

ROBEY, I.F. et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha and the glycolytic phenotype in tumors. **Neoplasia**, v. 7, p. 324-330, 2005.

ROGAKOU, E.P. et al. Megabase chromatin domains involves in DNA double-strand breaks *in vivo*. **J. Cell Biol.**, v. 146, p. 905-916, 1999.

ROGAKOU, E.P. et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 5858-5868, 1998.

ROSS, G.M. et al. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. **Mutat. Res.**, v. 337, p. 57-60, 1995.

RUMSEY, S.C.; LEVINE, M. Absorption, transport and disposition of ascorbic acid in humans. **J. Nutrit. Biochem.**, v9, p. 116-130, 1998.

RUPNARAIN, C. et al. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biol. Chem.**, v. 385, p. 449-464, 2004.

SACHDEVA, U.M.; O'BRIEN, J.M. Understanding pRb: toward the necessary development of targeted treatments for retinoblastoma. **J. Clin. Invest.**, v. 122, p. 425-434, 2012.

SADLECKI, P. et al. The role of hypoxia-inducible factor-1 α , glucose transporter-1 (GLUT-1) and carbon anhydrase IX in endometrial cancer patients. **BioMed Res. Internat.**, v. 2014, 2014.

SAGAR, S.; GREEN, I.R. Pro-apoptotic activities of novel synthetic quinones in human cancer cell lines. **Cancer Letters**, v. 285, p. 23-27, 2009.

SAINI, K.S. et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. **Cancer Treat. Rev.**, v. 39, p. 935-946, 2013.

SALEH, A.M. et al. The anticancer activity of the substituted pyridine-annelated isoindigo (5'-Cl) involves G0/G1 cell cycle arrest and inactivation of CDKs in the promyelocytic leukemia cell line HL-60. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 35, p. 1943-1957, 2015.

SAMBAZIOTIS, D.; KAPRANOS, N.; KONTOTHEORGOS, G. Correlation of bcl-2 and bax with apoptosis in human pituitary adenomas. **Pituitary**, v. 6, p. 127-133, 2003.

SAMUELS, Y. et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science**, v. 304, p. 554, 2004.

SANO, T. et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. **Am. J. Pathol.**, v. 153, p. 1741-1748, 1998.

SCHNERCH, D. et al. Cell cycle control in acute myeloid leukemia. **Am. J. Cancer Res.**, v. 2, p. 508-528, 2012.

SCHULER, M.; MAURER, U.; GOLDESTINEIN, J.C. p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. **Cell Death Differ.**, v. 10, p. 451-460, 2003.

SEMENZA, G.L. HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 39, p. 231-234, 2007.

SEMENZA, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, p. 721-732, 2003.

SHERR, C.J.; ROBERTS, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev.**, v. 13, p. 1501-1512, 1999.

SHAHABUDDIN, M.S.; GOPAL, M.; RAGHAVAN, S.C. Intercalating and antitumor activity of 4-oxopyrimido[4',5':4,5]thieno(2,3-b)quinoline-4(3H)-one. **J. Cancer Mol.**, v. 3, p. 139-146, 2007.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; M.FOLEY, V.; DOWD, C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem. J.**, v. 360, p. 1-16, 2001.

SHERR, C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Res.**, v. 60, p. 3689-3695, 2000.

SHERR, C.J. Cancer cell cycles. **Science**, v. 274, p. 1672-1677, 1996.

SHIMIZU, T. et al. The clinical effect of the dual-targeting strategy involving PI3K/Akt/mTOR and RAS/MEK/ERK pathways in patients with advanced cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 18, p. 2316-2325, 2012.

SHIN, S.W. et al. 15d-PGJ2 induces apoptosis by reactive oxygen species-mediated inactivation of Akt in leukemia and colorectal cancer cells and shows in vivo antitumor activity. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, p. 5414-5425, 2009.

SHINOHARA, H. et al. Retinoblastoma protein-initiated cellular growth arrest overcomes the ability of contransfected wild-type p53 to induce apoptosis. **Br. J. Cancer**, v. 83, p. 1039-1046, 2000.

SHRIVASTAVA, S. et al. Anticancer effect of celastrol on human triple negative breast cancer: possible involvement of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis and PI3K/Akt pathways. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 98, p. 313-327, 2015.

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

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

SILVEIRA, V.C. et al. Binding of oxindole-Schiff base copper (II) complexes to DNA and its modulation by the ligand. **J. Inorg. Biochem.**, v. 105, p. 1692-1703, 2011.

SILVER, R.F.; HOLMES, H.L. Synthesis of some 1,4-naphthoquinones and reactions relating to their use in the study of bacterial growth inhibition. **Can. J. Chem.**, v. 46, p. 1859-1864, 1968.

SINGH, B.N. et al. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanism, perspectives and clinical applications. **Biochem. Pharmacol.**, v. 82, p. 1807-1821, 2010.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 91, p. 175-184, 1988.

SPENCER, W.A. et al. Oxidative DNA adducts after Cu(2+)-mediated activation of dihydroxy PCBs: role of reactive oxygen species. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 46, p. 1346-1352, 2009.

SZABLEWSKI, L. Expression of glucose transporters in cancer. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1835, p. 164-169, 2013.

SNYDER, R.D. Assessment of atypical DNA intercalating agents in biological and in silico systems. **Mut. Res.**, v. 623, p. 72-82, 2007.

SNYDER, R.D. et al. The influence of N-dialkyl and other cationic substituents on DNA intercalation and genotoxicity. **Mut. Res.**, v. 578, p. 88-99, 2005.

SONNA, L.A. et al. Effect of hypoxia on gene expression by human hepatocytes (HepG2). **Physiol. Genomics**, v. 12, p. 195, 207, 2003.

SONODA, E. et al. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. **DNA Repair**, v. 5, p. 1021-1029, 2006.

SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer, an overview. **Ageing Res. Rev.**, v. 12, p. 376-390, 2013.

SPAGNOLO, L. et al. Visualization of a DNA-PK/PARP1 complex. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. 4168-4177, 2012.

STADTMAN, E.R. role of oxidant species in aging. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1105-1112, 2004.

STAUFFER, F.; HOLZER, P.; GARCIA-ECHEYERRIA, C. Blocking the PI3K/PKB pathway in tumor cells. **Curr. Med. Chem. Anticancer Agents**, v. 5, p. 449-462, 2005.

STOKOE, D. PTEN. **Curr. Biol.**, v. 11, R502, 2001.

STRONACH, E.A. et al. DNA-PK mediates AKT activation and apoptosis inhibition in clinically acquired platinum resistance. **Neoplasia**, v. 13, p. 1069-1080, 2011.

SUDARSANAM, S.; JOHNSON, D.E. Functional consequences of mTOR inhibition. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel**, v. 13, p. 31-40, 2010.

SUGIE, S. et al. Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. **Cancer Lett.**, v. 127, p. 177-183, 1998.

SUH, D.; CHAIRES, J.B. Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 3, p. 723-728, 1995.

SZABLEWSKI, L. Expression of glucose transporters in cancers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1835, p. 164-169, 2013.

SZATROWSKI, T.P.; NATHAN, C.F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. **Cancer Res.**, v. 51, p. 794-798, 1991.

TAKAHASHI, A.; OHNISHI, T. Does YH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? **Cancer Lett.**, v. 229, p. 171-179, 2005.

TANAKA, T. et al. Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. **Cytometry Part A**, v. 71, p. 648-661, 2007a.

TANAKA, T. et al. Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation are strongly amplified during mitogenic stimulation of lymphocytes. **Cell Prolif.**, v. 40, p. 1-13, 2007b.

TANG, Y. et al. Natural compounds Alternol induces oxidative stress-dependent apoptotic cell death preferentially in prostate cancer cells. **Mol. Cancer Ther.**, v. 13, p. 1526-1536, 2014.

TANG, Y.; ENG, C. PTEN autoregulates its expression by stabilization of p53 in a phosphatase-independent manner. **Cancer Res.**, v. 66, p. 736-742, 2006.

TANEJA et al., 2004. Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 2273-2280, 2004.

TAPER, H.S.; KEYEUX, A.; ROBERFROID, M. Potentiation of radiotherapy by non-toxic pretreatment with combined vitamins C and K3 in mice bearing solid transplantable tumor. **Anticancer Res.**, v. 96, p. 499-503, 1996.

TAPER, H. et al. Non-toxic potentiation of cancer chemotherapy by combined C and K3 vitamin pre-treatment. **Int. J. Cancer**, v. 40, p. 575-579, 1987.

TAYA, Y. RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, p. 14-17, 1997.

TIAN, W.N. et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. C1121-C1131, 1999.

TOBIUME, K. et al. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. **EMBO Rep.**, v. 2, p. 222-228, 2001.

TONNA, S. et al. Metabolic memory and diabetic nephropathy: potential role for epigenetic mechanisms. **Nat. Rev. Nephrol.**, v. 6, p. 332-341, 2010.

TOPPO, S. et al. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1790, p. 1486-1500, 2009.

TRACOOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 8, p. 579-591, 2009.

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

TRAVERSO, N. et al. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. **Oxidat. Med. Cell. Longev.**, v. 2013, no. 972913, 2013.

TRNKOVA, L.; DRŠATA, J.; BOUSOVA, I. Oxidation as an important factor of protein damage: implications for Maillard reaction. **J. Biosci.**, v. 40, no. 2, p. 419-439, 2015.

TSAI, Y.P.; WU, K.J. Hypoxia-regulated target genes implicated in tumor metastasis. **J. Biomed. Sci.**, v. 19, p. 102, 2012.

ULLAH, M.F. et al. The antioxidant ascorbic acid mobilizes nuclear copper leading to a prooxidant breakage of cellular DNA: implications for chemotherapeutic action against cancer. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 67, p. 103-110, 2011.

VAFA, O. et al. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. **Mol. Cell.**, v. 9, p. 1031-1044, 2002.

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

VANDER HEIDEN, M.G.; CANTLEY, L.C.; THOMPSON, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, p. 1029-1033, 2009.

VAQUÉ, J.P. et al. c-Myc inhibits Ras-mediated differentiation of pheochromocytoma cells by blocking c-Jun up-regulation. **Mol. Cancer Res.**, v. 6, p. 325-339, 2008.

VÁSQUEZ, D.R. et al. Aminopyrimidoisoquinolinequinone (APIQ) redox cycling is potentiated by ascorbate and induces oxidative stress leading to necrotic-like cancer cell death. **Invest. New Drugs**, v. 30, p. 1003-1011, 2012.

VÁSQUEZ, D.R. et al. Studies on quinones: Part 46: Synthesis and in vitro antitumor evaluation of aminopyrimidoisoquinolinequinones. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 5234-5242, 2010.

VENTURA, J.J. et al. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. **Mol. Cell**, v. 21, p. 701-710, 2006.

VERMA, R.P. Anti-cancer activities of 1,4-naphthoquinones: a QSAR study. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 6, p. 489-499, 2006.

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

VERRAX, J. et al. Redox-active quinones and ascorbate: an innovative cancer therapy that exploits the vulnerability of cancer cells to oxidative stress. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 11, p. 213-221, 2011.

VERRAX, J. et al. In situ modulation of oxidative stress: a novel and efficient strategy to kill cancer cells. **Curr. Med. Chem.**, v. 16, p. 1821-1830, 2009.

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

VERRAX, J. et al. Oxidative stress by ascorbate/menadione association kills K562 human chronic myelogenous leukaemia cells and inhibits its

tumour growth in nude mice. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, p. 671-680, 2006.

VERRAX, J. et al. Enhancement of quinone redox cycling by ascorbate induces a caspase-3 independent cell death in human leukaemia cells. An in vitro comparative study. **Free Radic. Res.**, v. 39, p. 649-657, 2005.

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.

VIGLIETTO, G. et al. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. **Nat. Med.**, v. 8, p. 1136-1144, 2002.

VILENCHIK, M.M.; KNUDSON, A.G. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 12871-12876, 2003.

VISSERES, M.C. et al. Modulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha in cultured primary cells by intracellular ascorbate. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 42, p. 765-772, 2007.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C.L. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 489-501, 2002.

VOUSDEN, K.H.; RYAN, K.M. p53 and metabolism. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, p. 691-700, 2009.

WANG, Z.M. et al., 2014. Andrographolide radiosensitizes human esophageal cancer cell line ECA 109 to radiation in vitro. **Dis. Esophagus.**, 2014. *Artigo In Press.*

WANG, J. et al. Momordin Ic induces HepG2 cell apoptosis through MAPK and PI3K/Akt-mediated mitochondrial pathways. **Apoptosis**, v. 18, p. 751-765, 2013.

WANG, W.; HU, Y. Small molecule agents targeting the p53-MDM2 pathway for cancer therapy. **Med. Res. Rev.**, v. 32, p. 1159-1196, 2012.

WANG, F. et al. HIF-1 alpha-prolyl hydroxylase: molecular target of nitric oxide in the hypoxic signal transduction pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 295, p. 657-662, 2002.

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

WARBURG, O.; POSENER, K.; NEGELEIN, E. Ueber den stoffwechsel der tumoren. **Biochem. Z.**, v. 152, p. 319-344, 1924.

WARD, I.M.; CHEN, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 477-47762, 2001.

WEI, M.C. et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, v. 292, p. 727-730, 2001.

WEINBERG, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, p. 3230330, 1995.

WEIR, N.M. et al. Curcumin induces G2/M arrest and apoptosis in Cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by modulating Akt and p38 MAPK. **Cancer Biol. Ther.**, v. 6, p. 178-184, 2007.

WILSON, J.X. Regulation of vitamin C transport. **Annual Rev. Nutr.**, v. 25, p. 105-125, 2005.

WITTIG-BLAICH, S.M. et al. Matrix-dependent regulation of AKT in hepsin-overexpression PC3 prostate cancer cells. **Neoplasia**, v. 13, p. 579-589, 2011.

WONDRAK, G. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. **Antiox. Redox Signal.**, v. 11, p. 3013-3069, 2009.

WONG, K. et al. Acute oxalate nephropathy after a massive intravenous dose of vitamin C. **Aust. N. Z. J. Med.**, v. 24, p. 410-411, 1994.

WOO, J.H. et al. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-Xl and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. **Carcinogenesis**, v. 24, p. 1199-1208, 2003.

WOO, C.C. et al. Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. **Biochem. Pharmacol.**, v. 83, p. 443-451, 2012.

WOOD, D.E. et al. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. **Oncogene**, v. 17, p. 1069-1078, 1998.

WU, F.Y. et al. Interaction of a new fluorescent probe with DNA and its use in determination of DNA. **J. Fluoresc.**, v. 18, p. 175-181, 2008.

WU, S. et al. Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. **Oncogene**, v. 22, p. 351-360, 2003.

WU, W.S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 25, p. 695-705, 2006.

XIAO, H. et al. Chicoric acid induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes through ROS-mediated PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, p. 1509-1520, 2013.

XIAO, Z. et al. A small-molecule modulator of the tumor suppressor miRNA-34a inhibits the growth of hepatocellular carcinoma. **Cancer Res.**, v. 74, p. 6236-6247, 2014.

XU, Y.; HER, C. Inhibition of topoisomerase (DNA) I (TOP1): DNA damage repair and anticancer therapy. **Biomolecules**, v. 5, p. 1652-1670, 2015.

XU, H.L. et al. Antiproliferative effect of juglone from *Juglans mandshurica Maxim* on human leukemia cell HL-60 by inducing apoptosis through the mitochondria-depent pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 645, p. 14-22, 2010.

- XU, R.H. et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. **Cancer Res.**, v. 65, p. 613-621, 2005.
- XU, J.; LIU, D.; SONGYANG, Z. The role of Asp-462 in regulating Akt activity. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 35561-35566, 2002.
- YANG, E.S. et al. Withaferin A enhances radiation-induced apoptosis in Caki cells through induction of reactive oxygen species, Bcl-2 downregulation and Akt inhibition. **Chem. Boil. Interact.**, v. 190, p. 9-15, 2011.
- YANG, Y. et al. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. **Acta Biochem. Pol.**, v. 50, p. 319-336, 2003(a).
- YANG, J. et al. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. **Carcinogenesis**, v. 24, p. 1571-1580, 2003(b).
- YEO, J.K. et al. Se-methylseleno-cysteine induces apoptosis through caspase activation and Bax cleavage mediated by calpain in SKOV-3 ovarian cancer cells. **Cancer Lett.**, v. 182, p. 83-92, 2002.
- YIN, H., XU, L., PORTER, N.A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. **Chem. Rev.**, v. 111, n. 10, p. 5944-5972, 2011.
- YING, W.H. et al. NAD(+) as a metabolic link between DNA damage and cell death. **J. Neurosci. Res.**, v. 79, p. 216-223, 2005.
- YOU, B.R.; PARK, W.H. Arsenic trioxide induces human pulmonary fibroblast cell death via increasing ros levels and GSH depletion. **Oncol. Rep.**, v. 28, p. 749-757, 2012.
- YUAN, L. et al. Isoorientin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction and inhibition of PI3K/Akt signaling pathway in HepG2 cancer cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 265, p. 83-92, 2012.
- YUAN, T.L.; CANTLEY, L.C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. **Oncogene**, v. 27, p. 5497-5510, 2008.

YUAN, J.; ADAMSKI, R.; CHEN, J. Focus on histone variant H2AX: to be or not to be. **FEBS Lett.**, v. 584, p. 3717-3724, 2010.

YUAN, X.J.; WHANG, Y.E. PTEN sensitizes prostate cancer cells to death receptor-mediated and drug-induced apoptosis through a FADD-dependent pathway. **Oncogene**, v. 21, p. 319-327, 2002.

ZAMOCKY, M.; FURTMULLER, P.G.; OBINGER, C. Evolution of catalases from bacteria to humans. **Antiox. Redox Signal.**, v. 10, p. 1527-1548, 2008.

ZHANG, R. et al. In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. **Apoptosis**, v. 13, p. 1465-1478, 2008.

ZHANG, L. et al. Inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase/Akt or mitogen-activated protein kinase signaling sensitizes endothelial cells to TNF-alpha cytotoxicity. **Cell Death Differ.**, v. 8, p. 528-536, 2001.

ZHAO, Y. et al. Redox proteomic identification of HNE-bound mitochondrial proteins in cardiac tissues reveals a systemic effect on energy metabolism after doxorubicin treatment. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 72, p. 55-65, 2014.

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

ZHONG, H. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. **Cancer Res.**, v. 59, p. 5830-5835, 1999.

ZHOU, C. et al. RNA interference of Biot2 induces G1 phase arrest and apoptosis in mouse colorectal cancer cell line. **Oncol. Res.**, v. 22, p. 93-103, 2015.

ZHOU, Y. et al. Signal transduction pathways involved in oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis. **Pediatr. Res.**, v. 58, p. 1192-1197, 2005.

ZUO, L. et al. Biological and physiological role of reactive oxygen species – the good, the bad and the ugly. **Acta Physiol. (Oxf.)**, v. 214, p. 329-348, 2015.

PARTE II

**INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS MNT E CCDC6 E
INFLUÊNCIA SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR**

*Capítulo desenvolvido sob a orientação do **Dr. Javier León** no Instituto de Biomedicina e Biotecnologia de Cantabria (**IBBTEC**), Universidade de Cantabria, Espanha.*

RESUMO

Introdução. A proteína MNT (*Max network transcriptional repressor*) é membro do grupo de proteínas MXD da rede MYC/MAX/MXD expressa durante a quiescência, progressão do ciclo e diferenciação celular. A proteína CCDC6 está envolvida na morte celular por apoptose, sendo que em tumores encontra-se em um rearranjo com RET, formando o proto-oncogene RET/PTC1. Prévios ensaios de proteômica demonstraram a interação entre MNT e CCDC6. **Objetivo.** Identificar o domínio de MNT que interage com CCDC6 e avaliar a influência desta interação sobre a proliferação celular. **Metodologia.** Para verificar a interação entre os diferentes mutantes de MNT (MNT WT, MNT WT HA, MNT Δ SID, MNT Δ Ct, MNT Δ Ct-HA, MNT Δ Br-HA, MNT Δ bHLH-HA) e CCDC6 foram utilizadas técnicas de imunoprecipitação e *western blot*. Novos mutantes de MNT (MNT Δ Ct2-HA, MNT Δ Nt1-HA e MNT Δ Nt2-HA) foram construídos e obtidos por PCR (*polymerase chain reaction*). A expressão das proteínas oriundas dos novos mutantes em células HEK293T e HeLa foi confirmada pelos ensaios de imunofluorescência e imunoeletoforese. A influência da interação entre MNT e CCDC6, bem como a influência do silenciamento de MNT sobre a proliferação celular foram avaliadas em células TPC1 e HeLa shCCDC6. Os níveis de GSH, após o silenciamento de MNT, foram medidos por espectrofotometria. **Resultados.** A partir das análises realizadas não foi possível identificar o domínio de MNT que interage com CCDC6, por isso a construção de novos mutantes de MNT foi necessária. A proteína MNT inibe o efeito apoptótico de CCDC6. O silenciamento de MNT ocasiona a diminuição nos níveis de GSH, que pode estar relacionada com o aumento das espécies reativas de oxigênio intracelulares, provocando a morte celular.

Palavras-chave: MNT, CCDC6, câncer, inibição da proliferação celular

ABSTRACT

Introduction. The protein MNT belongs to the group of MXD proteins of the MYC/MAX/MXD network expressed during quiescence, cycle progression and cell differentiation. The protein CCDC6 is involved in cellular death by apoptosis with tumors rearranged with RET forming the RET/PTC1 proto-oncogene. Previous proteomic trials showed an interaction between MNT and CCDC6. **Objective.** To identify the MNT domain that interacts with CCDC6 and the influence of this interaction on cellular proliferation. **Methodology.** To verify the interaction among different MNT mutants (MNT WT, MNT WT HA, MNT Δ SID, MNT Δ Ct, MNT Δ Ct-HA, MNT Δ Br-HA, MNT Δ bHLH-HA) and CCDC6, immunoprecipitation and western blot techniques were used. New MNT mutants (MNT Δ Ct2-HA, MNT Δ Nt1-HA and MNT Δ Nt2-HA) were built and obtained by PCR (*polymerase chain reaction*). The expression of proteins from new mutants in HEK293T and HeLa cells was confirmed by immunofluorescence and western blot trials. The influence of the interaction between MNT and CCDC6 as well as the influence of MNT silencing on cellular proliferation were evaluated in TPC1 and HeLa shCCDC6 cells. Levels of GSH after MNT silencing were measured by spectrophotometry. **Results.** From the analyses performed, it was not possible to identify the MNT domain that interacts with CCDC6. Therefore the construction of new MNT mutants was needed. MNT protein inhibits the CCDC6 apoptotic effect. MNT silencing decreased GSH level, which can be related to the increase in cellular oxygen reactive species generation, promoting cell death.

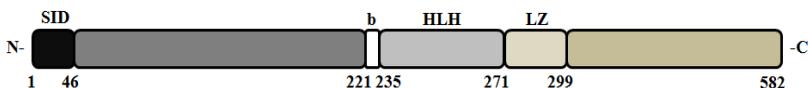
Keywords: MNT, CCDC6, cancer, inhibition of cell proliferation

1. INTRODUÇÃO

1.1 MNT: funções biológicas e câncer

O gene MNT foi identificado em 1997 (HURLIN; QUEVA; EISENMAN, 1997; MERONI et al., 1997). A proteína MNT de 582 aminoácidos (Figura 40) está localizada no núcleo celular e possui peso molecular de 72 e 74 kDa, de acordo com o estado de fosforilação, sendo assim pode migrar como um *doublet* em gel SDS-PAGE (POPOV et al., 2005).

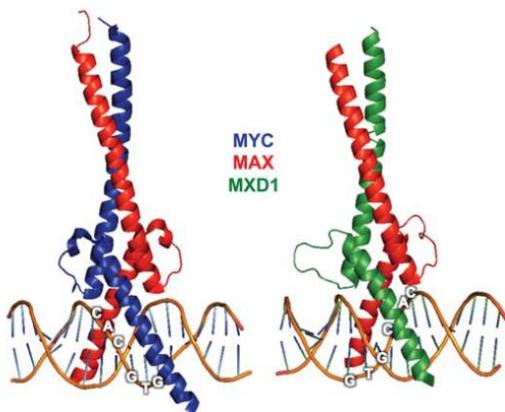
Figura 40 – Proteína MNT humana.



Fonte: Do autor.

A proteína MNT é membro do grupo de proteínas MXD, da rede MYC/MAX/MXD, expressa durante a quiescência, progressão do ciclo e diferenciação celular (HURLIN et al., 2004; HURLIN et al., 1999; HURLIN; QUEVA; EISENMAN, 1997). As proteínas da rede MYC/MAX/MXD são fatores de transcrição que possuem uma *basic-helix-loop-helix-leucine-zipper* (bHLHLZip) e atuam como reguladores da proliferação celular, diferenciação e apoptose (OSTER et al., 2002; GRANDORI et al., 2000). A proteína MNT forma heterodímeros com MAX através do sítio b-HLH-LZ para ligar ao DNA em sequências E-box com maior afinidade para sítios CACGCG do que CACGTG (WAHLSTRÖM; HENRIKSSON, 2007) (Figura 41). Alguns trabalhos descrevem que em algumas linhagens tumorais, MNT é o mais abundante par de MAX (LAFITA-NAVARRO, 2015; POPOV et al., 2005; SMITH et al., 2004).

Figura 41 – Estruturas de MYC-MAX (esquerda) e MXD1-MAX (direita) ligadas em sequências E-box (5'-CACGTC-3') do DNA.



MNT (membro do grupo de proteínas MXD) forma heterodímeros com MAX através do sítio b-HLH-LZ para ligar ao DNA em sequências E-box com maior afinidade para sítios CACGCG. Fonte: CONACCI-SORRELL; McFERRIN; EISENMAN, 2014.

A proteína MNT contém um domínio *Sin 3-interacting* (SID), o qual é capaz de recrutar histonas deacetilases (HDACs), através da interação com a *paired amphipathic helix 2* (PAH2) (HURLIN; QUEVA; EISENMAN, 1997; MERONI et al., 1997). Este domínio SID é responsável pela atividade de repressão transcricional de MNT (HURLIN et al., 1997; MERONI et al., 1997). A deleção de SID torna a proteína MNT uma ativadora transcricional. Este efeito pode estar associado a regiões ricas em prolina de MNT, as quais são responsáveis pela ativação de domínios de outros fatores de transcrição, como Box I de c-MYC (HURLIN; QUEVA; EISENMAN, 1997).

A fosforilação de MNT na entrada do ciclo celular resulta em rompimento da interação MNT-mSIN3-HDAC1. A proteína MNT não fosforilada é responsável pela interação mSIN3B e a repressão transcricional mediada por MNT para o gene de ciclina D2 é reduzida. A fosforilação de MNT resulta em aumento de ciclina D2. Também, uma vez que MYC está super expresso e ativo durante a proliferação celular, sugere-se que o heterodímero MYC-MAX aumenta nos mesmos níveis de ciclina D2, ocasionando a progressão do ciclo celular (POPOV et al., 2005).

A proteína MNT está expressa ao longo do ciclo celular e os dímeros MYC-MAX e MNT-MAX coexistem durante a proliferação celular (POPOV et al., 2005; PULVERER et al., 2000). Sugere-se então que a MNT atua como um modulador da atividade de MYC-MAX (WAHLSTRÖM; HENRIKSSON, 2007), inibindo a transformação celular induzida por MYC (HURLIN et al., 1997). Sendo assim, pode-se inferir que a MNT é um antagonista de MYC e ambos competem pela ligação com MAX (NAKAMURA; ROBERTS, 2011). Os genes MYC estão desregulados em vários tipos de tumores (BRETONE; DELGADO; LEÓN, 2015; ALBAJAR et al., 2011). As proteínas MYC ligam-se ao DNA e ativam a transcrição quando associadas com MAX (AMATI et al., 1992). Há evidências de que a desregulação dos fatores de transcrição MYC é determinante para a oncogênese (ARVANITIS; FELLSHER, 2006).

A MNT tem sido relacionada com a capacidade de regular a apoptose celular. Estudos mostram que a deficiência de MNT está relacionada à sensibilidade das células à apoptose, mas pode causar entrada precoce no ciclo celular e ocasionar a formação do tumor *in vivo* (HURLIN; HUANG, 2006; WALKER et al., 2005). Alguns estudos mostram o aumento da apoptose em células que possuem MNT silenciado, e este efeito é reproduzido também em fibroblastos com ausência de MYC, devido ao aumento dos níveis de p53 e diminuição da expressão e atividade da proteína Bcl-xL (WALKER et al., 2005; NILSSON et al., 2004). Link e colaboradores (2012) demonstraram que a deficiência de MNT está associada ao aumento da produção de EROs pela mitocôndria. Os mesmos autores descrevem que a ausência de MNT foi capaz de inibir a ação de importantes antioxidantes celulares como a glutatona reduzida (GSH) e a enzima tioredoxina redutase.

Por fim, prévios experimentos de proteômica buscando proteínas que interacionam com MNT, foi verificado que CCDC6 é uma das proteínas que mais interagem a MNT, e essa interação contribuiria para a atividade oncogênica (LAFITA-NAVARRO, 2015).

1.2 CCDC6: funções biológicas e câncer

O gene *Coiled Coil Domain Containing 6* (CCDC6), também conhecido como H4/PTC1, foi inicialmente identificado em um rearranjo com o proto-oncogene RET em células tumorais (FUSCO et al., 1987). Este rearranjo gera o oncogene RET/PTC1 detectável na maioria dos tumores de tireóide (PIEROTTI, 2001; GRIECO et al., 1990) (Figura 42).

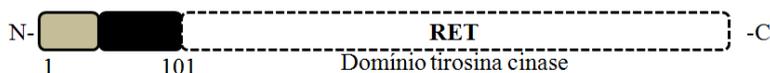
O gene *CCDC6* codifica uma proteína de 474 aminoácidos (65 kDa) de localização nuclear e citosólica, dependendo do estado de fosforilação (CELETTI et al., 2004). A fosforilação de *CCDC6* ocorre através de sinais extracelulares regulados por proteínas cinases ERK1/2 no resíduo 244 de serina (MEROLLA et al., 2012; CELETTI et al., 2004).

Figura 42 – Estrutura esquemática da proteína *CCDC6* e sua interação com o proto-oncogene *RET*.

Proteína *CCDC6*



Oncogene *RET/PTC1 = CCDC6-RET*



Translocação *RET/PTC1* somente ocorre entre os 101 primeiros aminoácidos de *CCDC6* e o domínio tirosina cinase de *RET*. Fonte: Do autor, segundo descrito por GRIECO et al., 1990.

Nas células cancerígenas o oncogene *RET/PTC1* é caracterizado pela fusão do domínio tirosina cinase da proteína *RET* com os 101 primeiros aminoácidos de *CCDC6* (*H4(1-101)*), que se localiza no citosol e corresponde à região de controle negativo da apoptose (CELETTI et al., 2004). Este domínio *coiled-coil* de *CCDC6* pertencente à fusão *RET/PTC1*, e é necessário para a homodimerização, ativação constitutiva e transformação em oncoproteína (LUISE et al., 2012; JHIANG, 2000; TONG; XING; JHIANG et al., 1997). Existem mais de 15 tipos de rearranjos *RET/PTC*, no entanto, a fusão *RET/PTC1* é a mais prevalente e desempenha um papel fundamental na tumorigênese (PORTELLA et al., 1996; PIEROTTI et al., 1992). Recentemente, a fusão *RET/CCDC6* e inativação de *CCDC6* foram encontradas também em câncer de pulmão (MORRA et al., 2015b; TAKEUCHI et al., 2012; IMIELINSKI et al., 2012). Além disso, rearranjos do gene *CCDC6* com outros genes, além de *RET*, têm sido identificados em tumores sólidos e não sólidos (TAKEUCHI et al.,

2012; KULKARNI et al., 2000), o que sugere que CCDC6 tem uma alta suscetibilidade para a recombinação.

Algumas das funções biológicas de CCDC6 estão sendo elucidadas. Sabe-se que CCDC6 está envolvida no controle da morte celular por apoptose (CELETTI et al., 2004). Segundo Morra e colaboradores (2015a), CCDC6 é controlada durante a progressão do ciclo celular, sendo a degradação controlada por FBXW7 (*F-Box and WD repeat domain containing 7*), e a estabilidade controlada por USP7 (*Ubiquitin-Specific-Processing Protease 7*), ambas subunidades de ubiquitina ligase E3 (*E3 Ubiquitin Protein Ligase*).

Leone e colaboradores (2010) descreveram que CCDC6 inibe a atividade transcricional dependente de CREB1. Este evento ocorre através da atividade da histona deacetilase 1 (HDAC1) e da proteína fosfatase 1 (PP1) que desfosforilam CREB1 e diminuem sua atividade. Em carcinomas papilares, o rearranjo RET/PTC1 aumenta os níveis de CREB1 fosforilada em Ser 133, elevando os níveis de genes alvo de CREB1, como AREG e ciclina A importantes para a proliferação celular. Também, células de tireóide dependem da tirotropina, que estimula a via da c-AMP ocasionando a fosforilação de CREB1 e ativação da via transcricional, importante para o crescimento e diferenciação celular (KIMURA et al., 2001). Merolla e colaboradores (2015) em um estudo com camundongos modificados geneticamente, confirmaram que a perda de atividade de CCDC6 aumenta a proliferação celular em câncer de tireóide pela amplificação da atividade de CREB1 e indução da atividade do oncogene RET/PTC1.

Uma das funções descritas para CCDC6 é de proteína protetora da integridade genômica. A fosforilação da histona H2AX na Ser 139 é a principal resposta celular ao dano ao DNA. A desfosforilação da histona H2AX e exclusão desta região da cromatina é crucial para a evolução normal do ciclo celular (FERNANDEZ-CAPETILLO et al., 2004). A proteína fosfatase 4C (PP4C) é uma das responsáveis pela desfosforilação da histona H2AX (EWING et al., 2007). CCDC6 interage com a subunidade catalítica da PP4C e modula negativamente a atividade desta proteína. Sendo assim, a perda de CCDC6 sugere o aumento da atividade de PP4C, que acaba ocasionando uma quantidade limitada de H2AX fosforilada, o que contribui para a instabilidade genômica, em virtude do não reparo ao DNA (MEROLLA et al., 2012; MEROLLA et al., 2007).

Conforme Merolla e colaboradores (2007), CCDC6 atua como proteína pró-apoptótica substrato para a proteína cinase ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), proteína que regula a reparação do DNA em

resposta a eventos genotóxicos. Ou seja, CCDC6 está envolvida na resposta celular ao dano ao DNA e é estabilizada por fosforilação em Thr 434 mediada por ATM (JUNGANG et al., 2012). Alguns trabalhos revelaram que o silenciamento de CCDC6 ou a mutação no sítio de reconhecimento para a ATM cinase em células germinativas GC1, aumenta as taxas de sobrevivência, prejudica a fosforilação da histona H2AX em Ser 139, afeta a produção de EROs e torna as células mais resistentes ao dano oxidativo e estresse genotóxico (STAIBANO et al., 2013; MEROLLA et al., 2007).

De acordo com o acima exposto, CCDC6 é um atrativo biomarcador de progressão tumoral cuja perda ou inativação está diretamente relacionada à progressão do tumor, pela perda da atividade pró-apoptótica, inibição do reparo ao dano ao DNA e aumento da proliferação celular. Ainda, conforme citado anteriormente, CCDC6 interage com MNT podendo favorecer a tumorigênese. Sendo assim, o aprofundamento dos estudos da interação entre as proteínas MNT e CCDC6 e as possíveis consequências dessa interação em células tumorais é de extrema importância.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a interação entre as proteínas MNT e CCDC6 e o efeito desta interação sobre a proliferação celular.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ocorrência de interação entre MNT e CCDC6;
- Identificar o domínio de MNT no qual ocorre a interação com CCDC6;
- Avaliar se MNT-CCDC6 é capaz de interferir no processo de proliferação celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivos celulares

Para o cultivo das células utilizadas para o desenvolvimento da segunda parte desta tese (Tabela 3) foi utilizado meio de cultura DMEM

(Lonza) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Lonza), 150 µg/mL de gentamicina (Lab. Normon) e 2 µg/mL de ciprofloxacino. Todas as linhagens celulares foram mantidas a 37 °C, 5% de umidade e níveis controlados de CO₂.

Tabela 3 – Linhagens celulares utilizadas na segunda parte desta tese.

Células	Origem	Procedência
HEK293T	Células embrionárias de rim humano com expressão constitutiva do antígeno SV40	Coleção do laboratório Dr. Javier León
TPC1	Papiloma de tireóide humano que contém o rearranjo RET/CCDC6	Coleção do laboratório Dr. Piero Crespo
HeLa shCCDC6	Câncer cervical humano com silenciamento do gene CCDC6	Coleção do laboratório Dra. Angela Celetti (MEROLLA et al., 2012)
HeLa	Câncer cervical humano	Coleção do laboratório Dr. Javier León

Fonte: Do autor.

3.2 Transformação de bactérias e purificação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi transformado em células competentes de bactérias *E. coli* DH5α (Life Technologies), através da amplificação do DNA usando o método de choque térmico. *E. coli* DH5α (30 µL) foram misturadas com 100-200 ng do DNA plasmidial de interesse. A mistura foi incubada em gelo por 30 min, posteriormente submetida ao choque térmico de 20 segundos a 37 °C, em seguida, mais 2 min de incubação em gelo. O meio LB (*Luria broth*) (1 mL), sem a adição de antibiótico, foi adicionado às células transformadas e esta mistura incubada a 37 °C durante 1 h sob agitação constante de 160 rpm. Após este procedimento, as células de *E. coli* foram semeadas em placas contendo meio LB agar previamente preparadas com antibiótico (120 µg/mL de ampicilina) para a seleção do plasmídeo de interesse e incubadas *overnight* a 37 °C.

No dia seguinte, algumas colônias isoladas foram selecionadas, coletadas e semeadas em erlenmeyer contendo 5 mL de meio de crescimento LB e o antibiótico correspondente para a seleção do plasmídeo desejado. Os recipientes foram incubados *overnight* a 37 °C e em agitação constante de 160 rpm.

Passado o tempo de incubação, o meio de crescimento LB foi centrifugado a 3000 rpm por 10 min e o plasmídeo contendo o DNA de

interesse foi purificado com o kit *NucleoSpin Plasmid Miniprep* (Macherey-Nagel) seguindo as instruções do fabricante. A eficiência da purificação dos plasmídeos foi verificada através de digestão por restrição enzimática usando endonucleases específicas de restrição (Fermentas) para cada plasmídeo seguindo as instruções do fabricante. Após a digestão, os fragmentos de DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose para verificar os tamanhos dos fragmentos de DNA. O gel de agarose para eletroforese foi preparado usando agarose (Pronadisa) diluída em tampão TAE (0,5x) (Bio-Rad) para alcançar concentrações entre 0,8-1% (peso:volume). Ainda durante a preparação do gel, foi utilizado o corante de ácido nucleico *Real safe reagent* (Durvitz) diluído 1:20.000 e adicionado antes da solidificação do gel. As amostras de DNA foram misturadas com DNA *mix* (5x) diluído em tampão até chegar à concentração final 1x contendo 30% glicerol, e então carregadas no gel. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram determinados usando um marcador padrão de 1 kb *DNA ladder* ou 100 bp *DNA ladder* (Fermentas). A eletroforese foi efetuada em um *iMupid Mini gel Electrophoresis system* a 100 V por 20 – 30 min em tampão TAE 0,5x. Finalmente, os géis foram visualizados e gravados usando um *Gel Doc™ EZ System* (Bio-Rad).

Uma vez que o plasmídeo foi verificado e confirmada a presença do DNA de interesse, colônias individuais positivas foram novamente semeadas em 5 mL de meio de crescimento LB contendo o antibiótico específico para a seleção. Logo, seguiu-se uma incubação *overnight* a 37 °C em agitação constante de 160 rpm.

Após o tempo de incubação, o meio de crescimento LB foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 min e o *pellet* com as bactérias transformadas foi resuspenso em LB-glicerol (1:1, v/v) para a conservação em temperatura de -80 °C.

Para preparar uma grande quantidade de DNA plasmidial, uma pequena quantidade do glicerol estoque (100 µL) foi inoculado em 5 mL de meio de crescimento LB contendo o antibiótico apropriado e incubado a 37 °C sob agitação constante de 160 rpm. Após 6-8 h, foram adicionados mais 200 mL de meio de crescimento LB e mantido *overnight* nas mesmas condições de temperatura e agitação anteriormente citados.

No dia seguinte, as bactérias em cultura foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 min e o DNA plasmidial foi purificado usando o kit *Plasmid Midi* (Qiagen) segundo as instruções do fabricante. A concentração de DNA plasmidial foi determinada pela medida da

absorbância em 260 nm usando o espectrofotômetro de microvolume *Thermo Scientific™ NanoDrop 2000*.

3.3 Clonagem do DNA de novos mutantes de MNT

Inicialmente foram utilizados sete clones de MNT gentilmente cedidos pelo Dr. Peter Hurlin (*Shriners Research Center*, Portland, Oregon, EUA) (Figura 43). No entanto, após os primeiros resultados, fez-se necessária a construção de novos mutantes com o intuito de elucidar a região exata de interação entre MNT e CCDC6.

Para gerar os novos mutantes de MNT (MNT Δ Nt1-HA, MNT Δ Nt2-HA e MNT Δ Ct2-HA) foram desenhados cinco novos *primers* alvejando o cDNA de *mouse Mus musculus* para amplificação desta região pela reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR). A sequência para o *promoter* de MNT para esta reação foi obtida no site *UCSC Genome* (<http://genome.uscs.edu/>). Sequências-alvo para as endonucleases de restrição EcoRI e BamHI foram adicionadas nas regiões 3' e 5' respectivamente. Os *primers* de MNT *forward* Δ Nt1 (mutante a partir da região *leucine zipper*), Δ Nt2 (mutante incluindo a região *leucine zipper*) e Δ Ct2 (mutante contendo os 46-221 aminoácidos de MNT), bem como o *primer reverse* estão representados abaixo:

- MNT Δ Nt1 BamHI *Forward* (5' → 3'):

TCGGATCC**ATGA**AGCATGAGCTGAGTCAGTGG

- MNT Δ Nt2 BamHI *Forward* (5' → 3'):

TCGGATCC**ATGT**CCTGAAGAGGAAGGAGAA

- MNT EcoRI *Reverse* (5' → 3'):

TGGAATTCT**CA**AGCGTAATCTGGAACATCGTA

- MNT Δ Ct2 BamHI *Forward* (5' → 3'):

TCGGATCC**ATG**CAACAGAGAGCACGTGAGGA

- MNT EcoRI *Reverse* (5' → 3'):

TGGAATTCT**CA**AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGG
TAGATCCCTCCAGGCCTTTTCTT

Para a confirmação da correta sequência dos *primers*, os mesmos foram enviados à empresa Stab Vida (Santander, Espanha) para a sequenciação. A reação de PCR foi realizada com *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. O DNA genômico (130 ng) foi misturado com 10 μ L de tampão HF 5x; 1 μ L de dNTPs 10 mM mix; 1,6 μ L dos *primers forward*

e *reverse*; 0,5 μL de DNApoly HF (*High Fidelity*) (2 U/ μL) e o volume final para 50 μL completo com água. Esta mistura foi conduzida a um termociclador e, conforme protocolo estabelecido, foi realizada a reação para a amplificação do DNA: 98 °C por 30 s / [98 °C por 15 s, 65 °C por 15 s, 72 °C por 30 s] 35 ciclos / 72 °C por 7 min, durante 3 h.

Após a reação de amplificação por PCR, o DNA foi purificado utilizando o kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente à eluição do DNA, as amostras foram submetidas a uma corrida em gel de agarose 0,8% (p:v) para verificar as amplificações da PCR através do tamanho do DNA usando os marcadores de 1 kb de DNA e 100 pb de DNA (Fermentas) como padrão de DNA.

Uma vez checados os fragmentos de DNA em aproximadamente 900 pb, digestões com as enzimas endonucleases EcoRI (*Fast Digest*) e BamHI (*Fast Digest*) (Thermo Scientific) foram conduzidas para cada produto *amplicon* da PCR e para o plasmídeo de MNT WT HA para obter o vetor pcDNA 3.1/Zeo, conforme as indicações do fabricante: 300 ng de DNA; 1 μL de EcoRI FD (10 U/ μL); 2 μL de BamHI FD (20 U/ μL); 4 μL de Buffer R 10x e o volume final para 20 μL completo com água. Esta mistura foi incubada durante 20 min a 37 °C.

Após a digestão enzimática do DNA, as amostras foram submetidas a uma corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% (p:v) para verificar a linearização do vetor e os fragmentos de restrição pelo tamanho do DNA. Feito isso, os fragmentos de DNA do gel foram purificados usando o kit *GeneJET Gel Extraction* (Thermo Scientific), conforme as instruções do fabricante.

O vetor digerido e purificado e os fragmentos oriundos da PCR (insertos) foram ligados para criar os novos plasmídeos mutantes de MNT (ΔNt1 , ΔNt2 e ΔCt2). Para a ligação do DNA, foi usada T4 DNA ligase (Thermo Scientific) seguindo as reações propostas pelo fabricante: 100 ng de pcDNA 3.1/Zeo e a concentração do inserto necessária para alcançar a razão vetor:inserto = 1:5; 2 μL de tampão 10x específico para T4 DNA ligase; 0,2 μL de T4 DNA ligase (5 U/ μL) e o volume final de 20 μL completo com água. Esta mistura foi incubada por 1 h a 22 °C, e após este período, seguiu-se uma incubação de 10 min a 65 °C para a inativação da enzima.

Posteriormente à ligação vetor/inserto, 5 μL da reação foram utilizados para a transformação de bactérias *E. coli* DH5 α pelo método de choque térmico, semeadas em placas contendo meio de crescimento LB-agar com 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina e incubadas *overnight* a 37 °C. No dia seguinte, algumas colônias foram isoladas e inoculadas em

erlenmeyer com 5 mL de meio de crescimento contendo 100 µg/mL de ampicilina e, posteriormente, submetidas a incubação à 37 °C com agitação constante de 160 rpm *overnight*. No dia seguinte, o meio contendo as bactérias transformadas foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 min e o DNA plasmidial foi purificado usando o kit *NucleoSpin Plasmid Miniprep* (Qiagen) conforme as instruções do fabricante.

O DNA plasmidial purificado das bactérias foi checado para a presença do inserto (800 pb *upstream* para o gene humano de MNT) por PCR usando as enzimas de restrição EcoRI (FD) e BamHI (FD).

3.4 Transfecção

Os vetores de expressão usados para as transfecções estão mostrados na Tabela 4. Os mutantes de MNT *mouse* (MNT WT HA, MNT ΔSID, MNT ΔCt, MNT ΔCt-HA, MNT ΔBr-HA, MNT ΔbHLH-HA) foram cedidos pelo Dr. Peter Hurlin, e estão esquematicamente representados na figura 43. Já os mutantes MNT ΔNt1-HA, MNT ΔNt2-HA e MNT ΔCt2-HA foram desenhados e obtidos como parte deste trabalho, com a colaboração da Dra. Maria Carmem Lafita-Navarro e da doutoranda Judit Liaño Pons, conforme descrito no item 3.3.

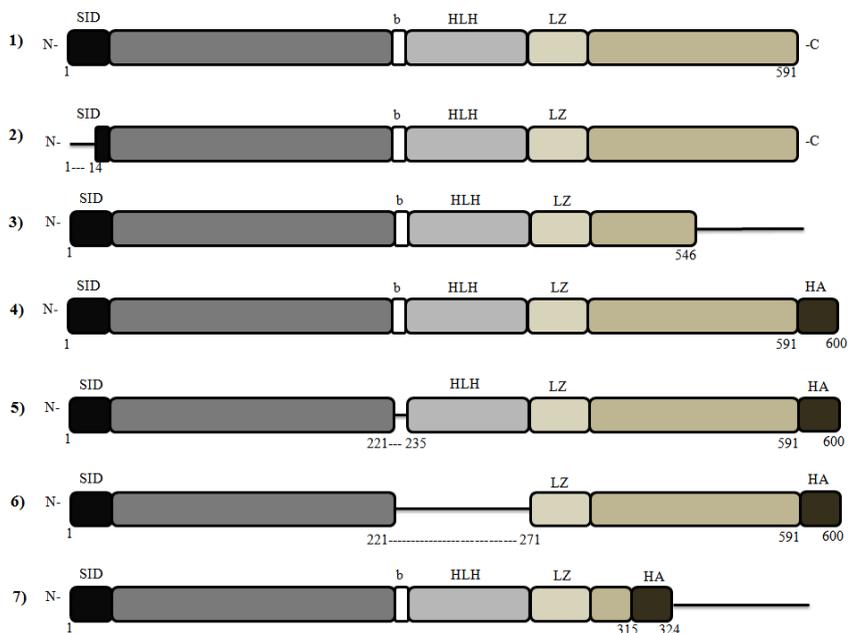
Tabela 4 – Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Construção	Procedência
pReceiver-Lv103	Vetor vazio que expressa o gene GFP	Genecopoeia (EX-Mm20333-Lv103)
pcEFLZ	Vetor vazio (<i>empty vector</i>)	Coleção de laboratório Dr. Piero Crespo
pcDNA3	Vetor vazio (<i>empty vector</i>)	Coleção laboratório Dr. Jorge Martín Perez
pLKO.1 controle	Vetor vazio (<i>empty vector</i>)	Sigma-MISSION
pLKO.5-shMNT humano	<i>Short hairpin</i> RNA TCR0000234788 contra MNT mRNA humano	Sigma-MISSION
pcDNA4-CCDC6 myc	CCDC6 <i>gene myc tagged</i>	Dra. Angela Celetti
pcMV-Sport6-MNT	Gene MNT wt	Origene
pcDNA 3.1/Zeo(+)	Vetor vazio usado para as construções de MNT	Invitrogen V860-20
pRC/CMV-MNT ΔCt	Excluído fragmento de 45 aminoácidos da porção –Ct de MNT	Dr. Peter Hurlin

pCS2(+)- MNT ΔSID	Excluído fragmento de 14 aminoácidos da porção –Nt de MNT	Dr. Peter Hurlin
pcDNA3.1/Zeo(+)- MNT WT HA	Gene MNT com epítopo HA <i>tag</i>	Dr. Peter Hurlin (Invitrogen V860-20)
pcDNA3.1/Zeo(+)- MNT ΔCt1 HA	Excluído fragmento de 45 aminoácidos da porção –Ct de MNT com epítopo HA <i>tag</i>	Dr. Peter Hurlin (Invitrogen V860-20)
pcDNA3.1/Zeo(+)- MNT ΔBr HA	Excluído fragmento entre 221-235 aminoácidos de MNT com epítopo HA <i>tag</i>	Dr. Peter Hurlin (Invitrogen V860-20)
pcDNA3.1/Zeo(+)- MNT ΔbHLH HA	Excluído fragmento entre 221-272 aminoácidos de MNT com epítopo HA <i>tag</i>	Dr. Peter Hurlin (Invitrogen V860-20)
pcDNA3.1/Zeo(+)- MNT ΔNt1 HA	Excluído fragmento referente aos 299 primeiros aminoácidos de MNT com epítopo HA <i>tag</i>	Mutante construído para esta tese (Invitrogen V860-20)
pcDNA3.1/Zeo(+)- MNT ΔNt2 HA	Excluído fragmento referente aos 272 primeiros aminoácidos de MNT com epítopo HA <i>tag</i>	Mutante construído para esta tese (Invitrogen V860-20)
pcDNA3.1/Zeo(+)- MNT ΔCt2 HA	Excluído fragmento referente aos 370 últimos aminoácidos de MNT, com epítopo HA <i>tag</i>	Mutante construído para esta tese (Invitrogen V860-20)

Fonte: Do autor.

Figura 43 – Desenho esquemático de mutantes de MNT utilizados nesta tese.



Mutantes de MNT cedidos pelo Dr. Peter Hurlin. 1. MNT WT (582 aa, ~64 kDa); 2. MNT Δ SID (577 aa, ~63,5 kDa); 3. MNT Δ Ct (531 aa, ~58 kDa); 4. MNT WT-HA (600 aa, ~66 kDa); 5. MNT Δ Br-HA (586 aa, ~64,5 kDa); 6. MNT Δ bHLH-HA (549 aa, ~60,4 kDa); 7. MNT Δ Ct1-HA (324 aa, ~35,6 kDa). HA tag em 3'(Ct) com a seqüência de DNA: TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT.

Para a transfecção foi utilizado o reagente PEI (polietilenimina). Células (1×10^6 de densidade) foram semeadas em placas tipo *Petri* de 100 mm. Após 24 h, ou quando as células atingiram entre 40-60% da confluência, a transfecção foi efetuada. O DNA de interesse ou o siRNA, em concentrações que variaram de 3 a 6 μ g, foram diluídos em 100 μ L de NaCl 150 mM. O volume de 2,5 μ L de PEI por μ g de DNA/siRNA foi diluído separadamente em 100 μ L de NaCl 150 mM. Ambas as diluições foram submetidas à agitação em vórtex e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Transcorrida a incubação, a diluição de PEI foi adicionada ao DNA, agitada em vórtex e incubada entre 30 e 60 min à temperatura ambiente. Posteriormente, foi efetuada a troca do meio de cultura das células e as diluições contendo DNA e/ou siRNA foram adicionadas nas respectivas placas. As células foram coletadas

para análise entre 24 e 72h após a transfecção. Quando necessário, 16h após a transfecção, foi adicionado Bortezomib 15 nM às células. O Bortezomib é um inibidor de proteassoma que evita a degradação de MNT, desta forma aumentando a eficiência da transfecção.

Para o controle da eficácia da transfecção as células foram transfectadas também com o *gene reporter* GFP (*Green Fluorescent Protein*). Uma maior quantidade de células positivas para GFP (células verdes) indica que não somente o gene GFP foi incorporado às células, mas também o DNA e/ou siRNA de interesse. Células positivas para GFP foram analisadas utilizando um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TS100.

3.5 Imunoelctroforese de proteínas

As células ($3-5 \times 10^6$) foram obtidas por tripsinização, centrifugadas durante 5 min a 4 °C a 1500 rpm e posteriormente lavadas com PBS. Em seguida foi feita uma nova centrifugação, o PBS retirado e as células ressuspensas em 200 µL de tampão de lise. Geralmente foi usado o tampão de lise NP-40 (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM, 1% IGEPAL (Sigma Aldrich), 0,2% SDS, NaF 20 mM, coquetel inibidor de proteases 1:100 (Calbiochem) e coquetel inibidor de fosfatase 1:100 (Sigma Aldrich)). Excepcionalmente o tampão de lise SDS foi usado para extração de proteína nuclear [NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM, 1% SDS, NaF 20 mM, coquetel inibidor de proteases 1:100 (Calbiochem) e coquetel inibidor de fosfatase 1:100 (Sigma Aldrich)].

Os lisados celulares foram incubados em gelo durante 30 min com agitação a cada 5 min. Após a incubação, os lisados foram sonificados usando o *Bioruptor*[®] *Plus Sonication Device* (Diagenode) com 15 ciclos (30 s). Posterior à sonicação, os lisados celulares foram centrifugados durante 20 min a 4 °C a 14000 rpm. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e armazenado até o momento do uso. As proteínas foram quantificadas no equipamento *Qubit*[®] *2.0 Fluorometer* (Life Technologies) utilizando 1 µL das amostras diluídas 10x, padrão de proteínas Qubit (1 µL) e tampão específico (*Buffer Molecular Probes*) (200 µL). As proteínas (50 – 100 µg) foram misturadas com água destilada e tampão Laemli 5x (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, 8% de 2-mercaptoetanol, 4% SDS, 0,1% de azul de bromofenol, 20% de glicerol) para uma concentração final de 2x. As amostras foram mantidas durante 5-10 min a 95 °C para a desnaturação das proteínas. Em seguida as amostras foram carregadas em gel de poli(acrilamida)-SDS

(SDS-PAGE), entre 8 e 12%, dependendo do tamanho da proteína a ser detectada. As proteínas foram separadas por eletroforese em tampão de corrida (10% SDS, TG 1x (Tampão Tris-glicina 10x Bio-Rad) usando uma cubeta *MiniProtean* (Bio-Rad) com voltagem constante de 180 V e marcador de proteína *Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards* (Bio-Rad).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Amersham Protran Supported 0.45 NC*, GE Healthcare, Life Sciences) com tampão específico para transferência (10% metanol, TG 1x (Bio-Rad)) usando uma cuba *MiniProtean* (Bio-Rad) com amperagem constante 400 mA por 1 h. Posterior à transferência, o gel de poliacrilamida-SDS foi corado com solução Azul Brilhante de Coomassie por 10 min a temperatura ambiente e descoradas com água até a perfeita visualização da integridade das bandas das proteínas. Enquanto isso, as membranas eram incubadas com solução de bloqueio (10% de leite em pó desnatado) (w:v) em tampão TTBS (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%) por 1 h a temperatura ambiente para evitar a ligação do anticorpo em proteínas não específicas.

Após o bloqueio, a membrana foi lavada a cada 10 min durante 1 h com TTBS. Soluções com os anticorpos primários foram preparadas (1% de BSA-albumina bovina) em TTBS com os anticorpos diluídos entre 1:500 e 1:3000. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários *overnight* a 4 °C. Após a incubação, as membranas foram lavadas com TTBS a cada 10 min durante 1 h, e em seguida incubadas com o anticorpo secundário diluído (1% BSA em TTBS) com os anticorpos secundários com fluorocromo conjugado IRDye680/IRDye800 (LI-COR Bioscience) diluídos a 1:10000. Imediatamente após a incubação do anticorpo secundário, as membranas foram lavadas duas vezes com TTBS e finalmente as bandas de proteínas de interesse foram detectadas através do equipamento *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Bioscience). Como controle de proteínas foi utilizada a β -actina.

Tabela 5 – Anticorpos primários e secundários utilizados nos experimentos da segunda parte desta tese.

Anticorpos primários	Tipo	Referência	Uso e diluição
Anti-MNT (M-132)	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-769)	WB (1:1000); IF (1:200); IP
Anti-MNT (F-11)	<i>Mouse monoclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-376708)	WB (1:1000)
Anti-MYC (A-14)	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-790)	WB (1:1000); IF (1:200); IP
Anti-MYC (9E10)	<i>Mouse monoclonal</i>	Dr. Javier León	WB (1:100); IP
Anti-HA (Y-11)	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-805)	WB (1:1000); IF (1:200); IP
Anti-HA-probe (F-7)	<i>Mouse monoclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-7392)	WB (1:1000)
Anti-CCDC6	<i>Rabbit polyclonal</i>	abcam (AB 128634)	WB (1:1000); IP
Anti-IgG	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-2027)	IP
Anti- β Actina (I-19)	<i>Goat polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (sc-1616)	WB (1:1000)
Anticorpo secundário	Tipo	Referência	Uso e diluição
Anti-Rabbit IRDye [®] 800	<i>Donkey polyclonal</i>	LI-COR (926-32213)	WB (1:10000)
Anti-Rabbit IRDye [®] 680	<i>Donkey polyclonal</i>	LI-COR (926-68073)	WB (1:10000)
Anti-Mouse IRDye [®] 800	<i>Donkey polyclonal</i>	LI-COR (926-32213)	WB (1:10000)
Anti-Mouse IRDye [®] 680	<i>Donkey polyclonal</i>	LI-COR (926-68072)	WB (1:10000)
Anti-Goat IRDye [®] 800	<i>Donkey polyclonal</i>	LI-COR (926-32214)	WB (1:10000)
Anti-Goat IRDye [®] 680	<i>Donkey polyclonal</i>	LI-COR (926-68074)	WB (1:10000)

WB (Western blot); IF (imunofluorescência); IP (imunoprecipitação). Fonte: Do autor.

3.6 Imunoprecipitação de proteínas

Foram utilizadas 5×10^6 células para a imunoprecipitação de proteínas. As células foram lavadas com PBS, coletadas das placas por tripsinização ou raspagem e centrifugadas durante 5 min a 4 °C a 1500 rpm. Ao *pellet* foi adicionado 1 mL do tampão de lise [Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,5% NP40 (v/v), EDTA 1mM, inibidor de proteases 1:100 (Calbiochem)]. As células do lisado foram passadas através de uma seringa G20 entre 4-5 vezes e incubadas a 4 °C por 30 min. Após a incubação, o lisado celular foi centrifugado a 4 °C por 20 min a 1500 rpm. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado para a imunoprecipitação das proteínas, para isso 25 μ L do lisado de células totais (*input*) foram mantidos a -80 °C para ser utilizado como controle.

O volume de 450 μ L do lisado celular foi usado para a imunoprecipitação e neste foram adicionados 3 μ g do anticorpo específico ou imunoglobulinas (IgGs) não específicas como controle. A este volume foi adicionado mais tampão de lise até completar o volume final de 1 mL. Então, esta mistura foi incubada em rotação constante, *overnight* a 4 °C.

No dia seguinte, 15 μ L de proteína-G ligadas a grânulos magnéticos (*Dynabeads[®]-protein G*, Invitrogen) foram previamente lavadas com tampão de lise e posteriormente utilizadas para a captura dos imunocomplexos proteína-anticorpo. A mistura imunocomplexos-*beads* foram incubadas sob rotação durante 2-3 h a 4 °C. Após a incubação, foram efetuados 3 lavados em rotação a 4 °C durante 10 min cada. Os lavados foram feitos com tampão (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) usando o *DynaMagTM Magnet* (Invitrogen) para recoletar as *dynabeads* ligadas aos imunocomplexos após as lavagens.

Finalmente, as proteínas foram eluídas com tampão Laemli 2x. Neste ponto o lisado total que não passou pela imunoprecipitação de proteínas (*inputs*) foi também misturado com Laemli 2x. As amostras foram mantidas entre 10-15 min a 95 °C, as *beads* foram removidas com magneto e o sobrenadante foi coletado para análise por imunoblot usando anticorpos específicos. O lisado total (*input*) foi utilizado como controle.

3.7 Ensaio de proliferação celular

Previamente foram realizados testes para a escolha das concentrações de antibióticos a serem utilizadas para a seleção das células no ensaio clonogênico de acordo com o vetor a ser transfectado.

Para tanto, foram testados os antibióticos Zeocina (Thermo Scientific) nas concentrações 100, 250, 500 e 1000 µg/mL e Geneticina G418 (Thermo Scientific) nas concentrações 50, 100, 250 e 500 µg/mL. Por fim, foi eleita a concentração 500 µg/mL para ambos os antibióticos.

As células (1×10^6) foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas com PEI. 24 h após a transfecção, as células foram tratadas com o antibiótico para seleção. O meio de cultura suplementado com o antibiótico foi trocado a cada 2 ou 3 dias para a seleção de células positivas para os clones transfectados.

Após aproximadamente 10 dias, as células foram fixadas com metanol por 10 min à temperatura ambiente e coradas durante 10 min com solução cristal violeta (1% ácido acético, 1% de metanol, 1% corante cristal violeta). Posteriormente, foram feitos vários lavados com água até que as colônias se tornassem claras e visíveis para serem escaneadas.

Em seguida, as placas foram tratadas com 1 mL de ácido acético 10% por 10 min, à temperatura ambiente e a absorbância foi medida a 590 nm em espectrofotômetro para quantificar o resultado.

3.8 Análise de imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados para confirmar a expressão das proteínas dos novos mutantes de MNT. Para tanto, células foram plaqueadas em lamínulas de vidro. Após a aderência, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% diluído em PBS (v:v) durante 15 min à temperatura ambiente. Após a fixação as células foram lavadas com PBS e incubadas com tampão de permeabilização (Triton X-100 1% em PBS, v:v) durante 30 min sob agitação contínua. Transcorrida a permeabilização as células foram incubadas com tampão de bloqueio (Triton X-100 0,1%, BSA 3%, ambos diluídos em PBS) durante 20 min, lavadas duas vezes com PBS por 5 min e 1 min com Triton X-100 0,1% em PBS.

Os anticorpos primários foram diluídos em tampão de bloqueio e as células foram incubadas *overnight* a 4 °C em câmara úmida, e posteriormente submetidas a duas lavagens de 5 min com PBS e uma lavagem com Triton X-100 0,1%. As soluções com os anticorpos secundários foram preparadas através da diluição de Texas-Red, FITC ou anticorpos conjugados com fluorocromo Alexa Fluor® em solução de bloqueio e as células incubadas por 1 h em câmara úmida ao abrigo da luz. Em seguida foram feitas três lavagens de 5 min com PBS e as

lamínulas foram montadas em placas de vidros usando o corante nuclear DAPI ProLong[®] Gold Antifade Mountant (Life Technologies).

As células foram visualizadas usando o microscópio de fluorescência Zeiss IMAGER M1. As imagens foram adquiridas e analisadas com o software ImageJ[®].

3.9 Conteúdo de GSH

De acordo com dados da literatura, o silenciamento de MNT provoca a diminuição nos níveis de glutathiona reduzida (GSH), indicando um aumento do estresse oxidativo intracelular em decorrência da depleção de MNT. Portanto, os níveis de GSH foram verificados segundo o método proposto por Beutler; Duron; Kelly (1963). A GSH reage com o DTNB e por redução da GSSG, a GSH total (GSH+GSSG) pode ser medida.

Células (5×10^5) foram semeadas em placas de 60 mm e transfectadas com os seguintes plasmídeos: pcEFLZ + pLKO, pcEFLZ + shMNT, CCDC6 + pLKO, CCDC6 + shMNT, nas concentrações 1 μ g + 5 μ g, respectivamente. Foi adicionado 0,5 μ g de GFP em cada placa para verificar a eficiência da transfecção. PEI foi utilizado como agente de transfecção.

48 h após as transfecções foi adicionado 200 μ L de Triton 0,5% em PBS em cada placa e efetuada a raspagem das células. O conteúdo da raspagem foi passado para eppendorf e separados 20 μ L para dosagem de proteínas. A cada eppendorf foi adicionado 180 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10%, agitado em vórtex e centrifugados a 5000 rpm durante 10 min. Após a centrifugação, em placa *multiwell* de 96 poços, uma alíquota de 100 μ L dos sobrenadantes das amostras foi acrescentada em 75 μ L de tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 8,0 e 25 μ L de ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) 2,5 mM (DTNB), diluído em citrato de sódio 1%. Para o branco foi realizado o mesmo procedimento das amostras, porém ao invés da amostra foram adicionados 10 μ L da solução TCA 12% e água destilada na proporção 3:2 v/v. A reação foi monitorada durante 3 min, e o maior valor de absorbância, que corresponde à máxima formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável a 412 nm em leitor Multiskan FC (Thermo Scientific), foi utilizado para o cálculo. Os resultados foram expressos como conteúdo de GSH em μ mol/mg proteína.

3.10 Análise estatística

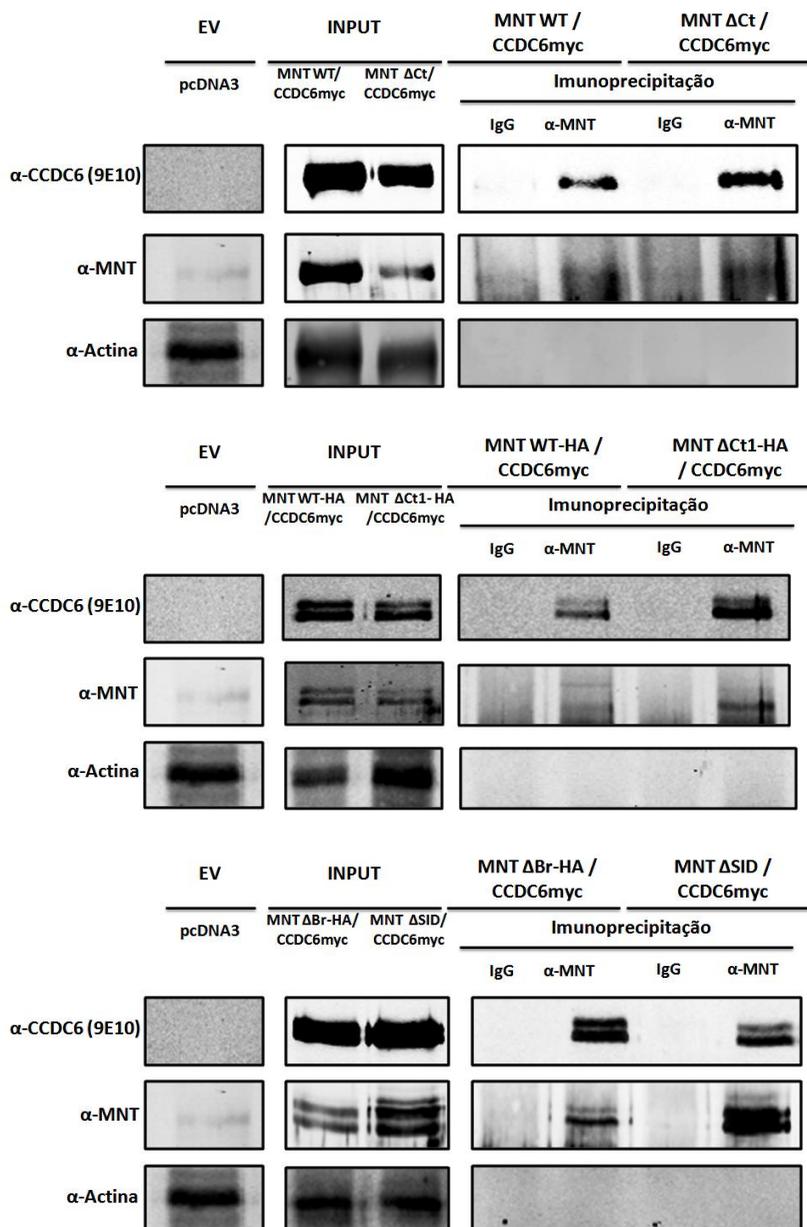
Quando necessário, os dados foram submetidos à análise de variância *one-way* ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni ou Tukey-Kramer. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

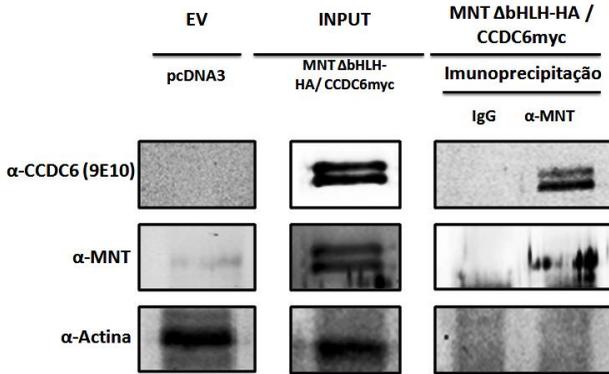
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Interação entre MNT e CCDC6

A região de CCDC6 que interage com MNT foi identificada por Lafita-Navarro (2015). Células HEK293T foram transfectadas com vetores de expressão para MNT WT e três diferentes mutantes de CCDC6-*myc*tagged: CCDC6 WT; CCDC6 (1-223) que contém os aminoácidos 1-223; e CCDC6 (1-101) que contém os aminoácidos 1-101. O mutante CCDC6 (1-223), mas não o CCDC6 (1-101) foi co-imunoprecipitado com MNT. Este resultado sugere que a interação MNT-CCDC6 ocorre na região entre 101-223 aminoácidos da proteína CCDC6. Para tentar elucidar o domínio de MNT que interage com CCDC6, células HEK293T foram transfectadas com vetores de diferentes mutantes de MNT e CCDC6-*myc*tagged. Após 24h da transfecção uma imunoprecipitação contra MNT foi realizada seguida da análise por *western blot* contra *myc-tag* e MNT usando anticorpos anti-epítipo Myc (9E10) e anti-MNT, respectivamente (Figura 44). Os resultados confirmaram que CCDC6 foi co-imunoprecipitado por todos os mutantes de MNT, não podendo ser definida a região exata de interação.

Figura 44 – Co-imunoprecipitação de MNT e CCDC6 em células HEK293T.

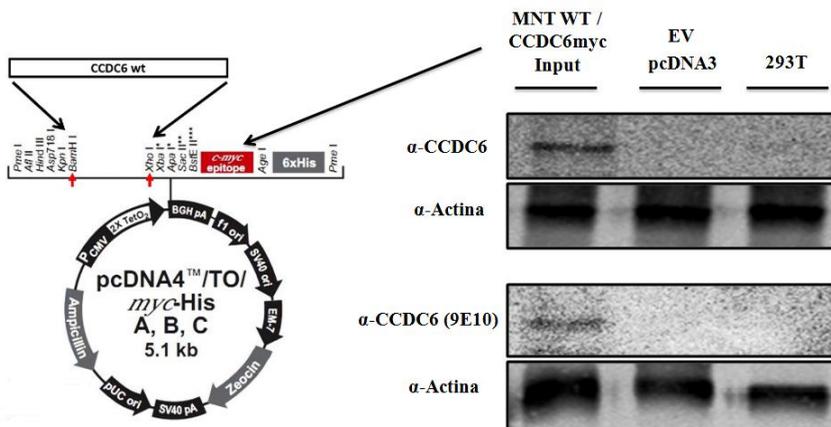




Células HEK293T foram transfectadas com os diferentes vetores de expressão dos mutantes de MNT e CCDC6 *myc-tagged*. As proteínas co-imunoprecipitadas foram analisadas posteriormente. Fonte: Do autor.

O anticorpo anti-epítipo Myc (9E10) foi analisado previamente para confirmar que o mesmo é capaz de identificar a proteína CCDC6 de origem exógena que contém o epítipo *myc tag*. Para tanto, foi realizada uma análise com lisado de células HEK293T e as mesmas transfectadas com vetor vazio pcDNA3 e com MNT WT HA/CCDC6-*myc-tagged* (Figura 45). Os resultados indicam que anti-myc (9E10) foi capaz de identificar CCDC6 exógeno, assim como o anticorpo anti-CCDC6, que não pode ser usado por ser do tipo policlonal de coelho, tal como o anticorpo anti-MNT.

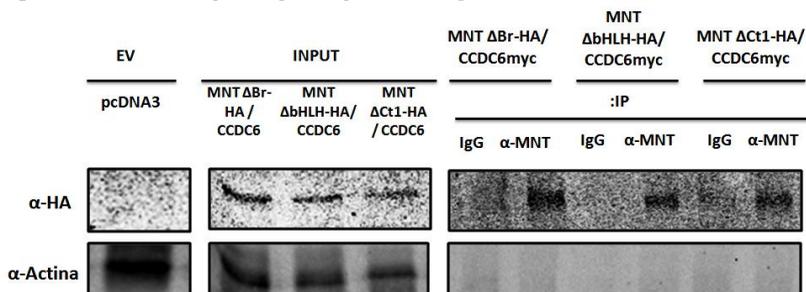
Figura 45 – Reconhecimento de CCDC6 exógeno pelo anticorpo anti-epítipo Myc (9E10).



Células HEK293T foram transfetadas com o vetor de expressão MNT WT, CCDC6 myc-tagged (gentilmente cedido pela Dra. Angela Celetti) e com o vetor vazio pcDNA3 (EV – *empty vector*). Fonte: Do autor.

A presença do domínio HA tag nos diferentes mutantes de MNT (MNT Δ Br-HA, MNT Δ bHLH-HA e MNT Δ Ct1-HA) foi confirmada por *western blot* a partir de lisados de células HEK293T transfetadas com os mutantes supracitados (Figura 46).

Figura 46 – Confirmação da presença de HA tag nos diferentes mutantes de MNT.



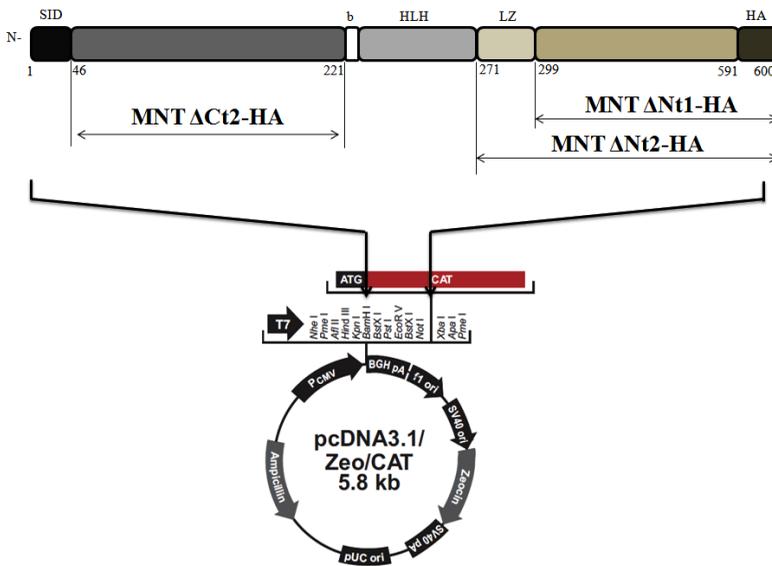
Células HEK293T foram transfetadas com os diferentes vetores de expressão dos mutantes de MNT que contêm HA tag e CCDC6 myc-tagged. As proteínas co-

imunoprecipitadas com MNT foram analisadas posteriormente por imunoelektroforese. Fonte: Do autor.

4.2 Construção de novos mutantes de MNT e confirmação da expressão das respectivas proteínas

Primers para os novos mutantes de MNT foram desenhados e sequenciados para a confirmação da ordem correta dos nucleotídeos do DNA dos novos mutantes (Figura 47). Em seguida os mutantes foram obtidos por PCR.

Figura 47 – Novos mutantes de MNT construídos para esta tese e obtidos por PCR (*polymerase chain reaction*).

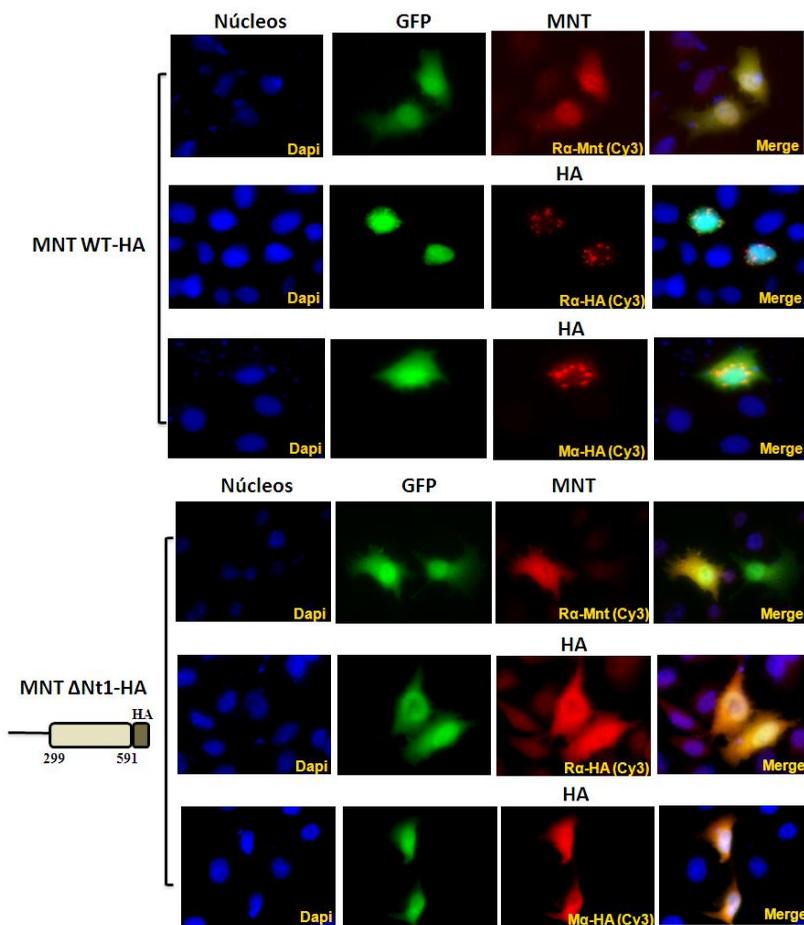


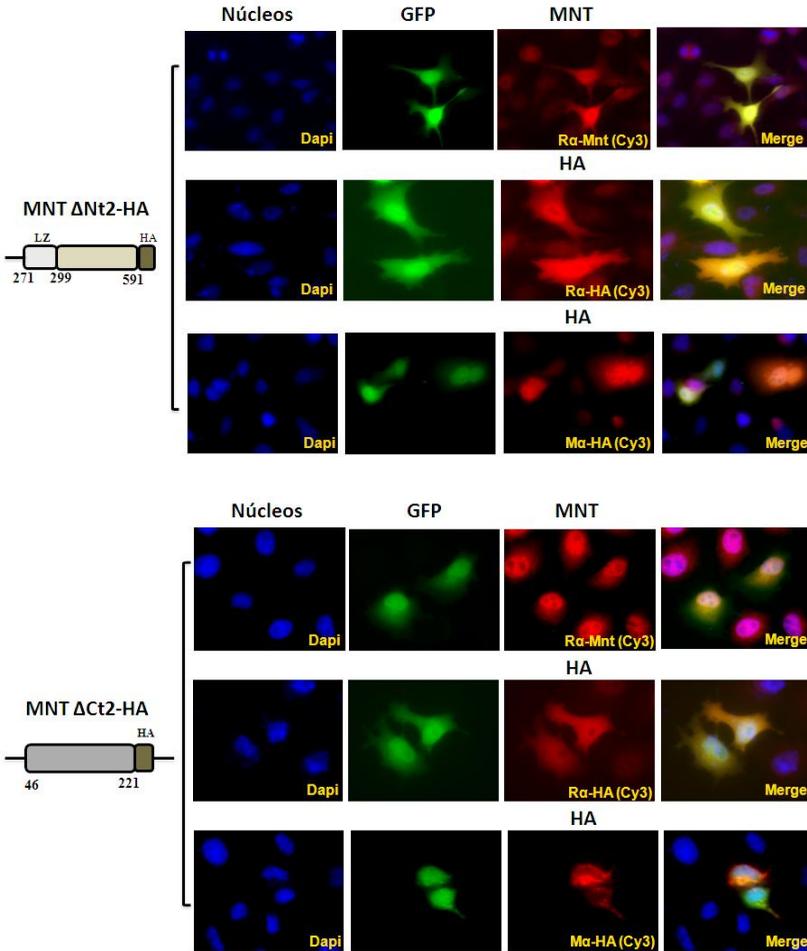
Mutantes de MNT construídos para esta tese: MNT ΔNt1-HA (300 aa, ~33 kDa), MNT ΔNt2-HA (330 aa, ~36 kDa) e MNT ΔCt2-HA (211 aa, ~23 kDa). Fonte: Do autor.

Após a clonagem, conforme descrito no item 3.3 da seção de Materiais e Métodos, os mutantes foram transfectados em células HEK293T e HeLa para a confirmação da expressão das proteínas por imunofluorescência e *western blot*. As análises de imunofluorescência (Figura 48) mostram que as proteínas oriundas dos novos mutantes de

MNT (MNT Δ Nt1-HA, MNT Δ Nt2-HA e Δ Ct2-HA) podem estar expressas em células HeLa, tendo como controle positivo MNT WT-HA. Vale ressaltar que o mutante MNT Δ Ct2-HA não foi detectado pelo anticorpo anti-MNT, uma vez que este anticorpo somente identifica a sequência entre os aminoácidos 226-361 de MNT, região esta ausente em MNT Δ Ct2-HA.

Figura 48 – Confirmação, por imunofluorescência, da expressão das proteínas oriundas dos mutantes de MNT (MNT Δ Nt1-HA, MNT Δ Nt2-HA e MNT Δ Ct2-HA) em células HeLa, usando MNT WT-HA como controle positivo.



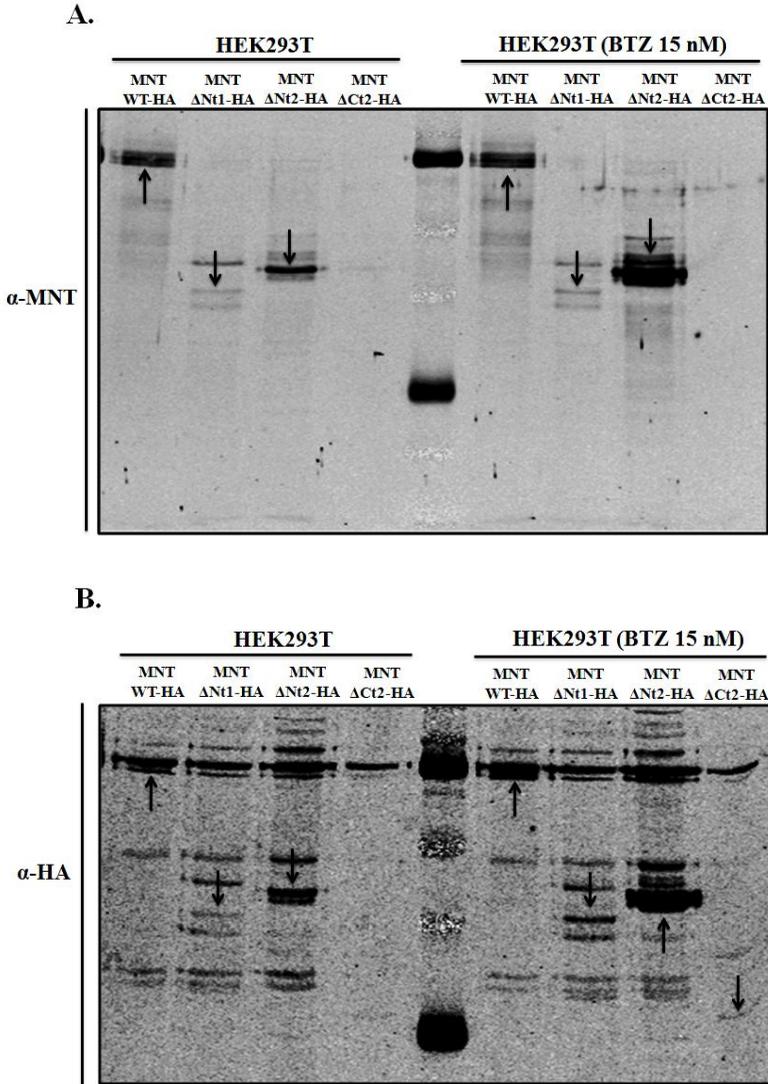


Células HeLa foram transfectadas com os diferentes mutantes de MNT e GFP utilizando PEI como agente de transfecção. Para a detecção por imunofluorescência foram utilizados anticorpos anti-*mouse* (Ma) e anti-*rabbit* (Ra) para HA e anti-*rabbit* (Ra) para MNT. Fonte: Do Autor.

A presença das proteínas oriundas dos mutantes MNT Δ Nt1-HA, MNT Δ Nt2-HA e MNT Δ Ct2-HA em células HEK293T foi confirmada por *western blot* utilizando os anticorpos anti-MNT e anti-HA (Figura 49). Nesta análise o mutante MNT WT-HA foi utilizado como controle positivo e as transfecções foram efetuadas com e sem Bortezomibe (15

nM) para retardar a degradação proteossomal de MNT. As proteínas foram identificadas de acordo com os respectivos pesos moleculares. A figura 49 (A) mostra a identificação das proteínas provenientes dos mutantes MNT Δ Nt1-HA (33 kDa) e MNT Δ Nt2-HA (36 kDa). A região de aminoácidos que compõem MNT Δ Ct2-HA (23 kDa) não é reconhecida pelo anticorpo anti-MNT, o qual reconhece o epítipo entre 226 e 361 aminoácidos de MNT. No entanto, a presença da proteína de MNT Δ Ct2-HA pode ser comprovada pela incubação com o anticorpo anti-HA (Figura 49 (B)). Porém, esta proteína pode ser observada somente quando as células foram incubadas com Bortezomibe. Tal resultado pode ser indicativo de que este mutante é mais suscetível à degradação proteossomal, por isso, menos estável. Para confirmar esta hipótese, através da análise de MNT no site <http://emboss.bioinformatics.nl> foi verificado que a região de MNT Δ Ct2-HA possui duas sequências consenso PEST uma delas entre os aminoácidos 46-102 e a outra entre os aminoácidos 123-137 de MNT. As sequências PEST são sequências polipeptídicas ricas em prolina, glutamato, serina e treonina que facilitam a degradação proteolítica (RECHSTEINER; ROGERS, 1996). Para facilitar a identificação de MNT Δ Ct2-HA um novo anticorpo anti-MNT que identifica a região entre 46 e 221 aminoácidos de MNT, está sendo gerado em coelhos. Por fim, os resultados são consistentes com a expressão que se detecta ao transfectar o mutante no qual falta a região N-terminal (Δ Nt2) (Figura 49).

Figura 49 – Presença das proteínas expressas pelos novos mutantes de MNT (MNT Δ Nt1-HA (~33 kDa), MNT Δ Nt2-HA (~36 kDa) e MNT Δ Ct2-HA (~23 kDa) em células HEK293T.



(A) Células HEK293T transfectadas com os novos mutantes de MNT com ou sem Bortezomibe (BTZ) 15 nM, seguido da identificação de MNT pelo anticorpo anti-

MNT *rabbit polyclonal*. **(B)** Células HEK293T transfectadas com os novos mutantes de MNT com ou sem BTZ 15 nM, seguido da identificação de MNT com HA *tag* pelo anticorpo anti-HA *rabbit polyclonal*. Fonte: Do autor.

4.3 Influência da interação entre MNT e CCDC6 sobre a proliferação celular

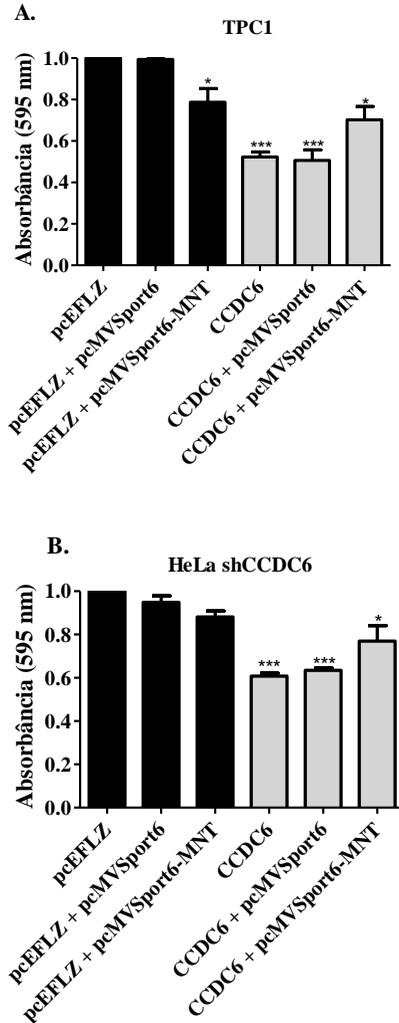
Ensaio de morte clonogênica foram conduzidos com o intuito de elucidar a influência de MNT-CCDC6 sobre a proliferação celular. Foram utilizadas células TPC1, que possuem o rearranjo RET/CCDC6 com perda de atividade de CCDC6, e células HeLa shCCDC6 que possuem o gene de CCDC6 silenciado. Conforme dados da literatura, CCDC6 desempenha um importante papel na indução da apoptose celular após danos ao DNA (MEROLLA et al., 2007; CELETTI et al., 2004). A depleção de CCDC6 em células HeLa afeta diretamente a fosforilação da histona H2AX no resíduo de Ser 139, em resposta ao dano ao DNA (MEROLLA et al., 2012). Morra e colaboradores (2015b) mostraram que a perda de CCDC6 causa alterações no ciclo celular, promovendo a tolerância celular ao dano ao DNA em células de câncer de pulmão. Ainda, a análise de células provenientes de pacientes com câncer de pulmão mostrou que a baixa expressão da proteína CCDC6 foi significativamente associada com a agressividade deste tipo de tumor (MORRA et al., 2015b).

MNT desempenha um importante papel na regulação do ciclo celular, pois é capaz de suprimir a entrada no ciclo e inibir a proliferação celular (HURLIN et al., 2003).

A figura 50 mostra os efeitos de MNT e CCDC6 sobre a proliferação celular. Células TPC1 e HeLa shCCDC6 foram transfectadas com os vetores de MNT WT (pcMVSPORT6-MNT) e para a superexpressão de CCDC6 em uma proporção de 1:5 (CCDC6:pcMVSPORT6-MNT), para garantir que células contendo CCDC6 também incorporassem o vetor de MNT WT. Também foram transfectados os vetores vazios para MNT e CCDC6, pcMVSPORT6 e pcEFLZ, respectivamente. Em células TPC1 (figura 50 (A)) a proliferação celular foi significativamente diminuída, quando transfectados MNT e CCDC6 isolados. Já em células HeLa shCCDC6 (Figura 50 (B)), MNT parece causar uma ligeira inibição da proliferação celular, porém segundo a análise estatística, não houve significância, como no caso de CCDC6. No entanto, em ambas as linhagens celulares analisadas quando transfectados juntos, os resultados indicam que as

proteínas interagem entre si e MNT impede o efeito antiproliferativo de CCDC6.

Figura 50 – Efeito de MNT e CCDC6 sobre a proliferação de células TPC1 e HeLa shCCDC6.



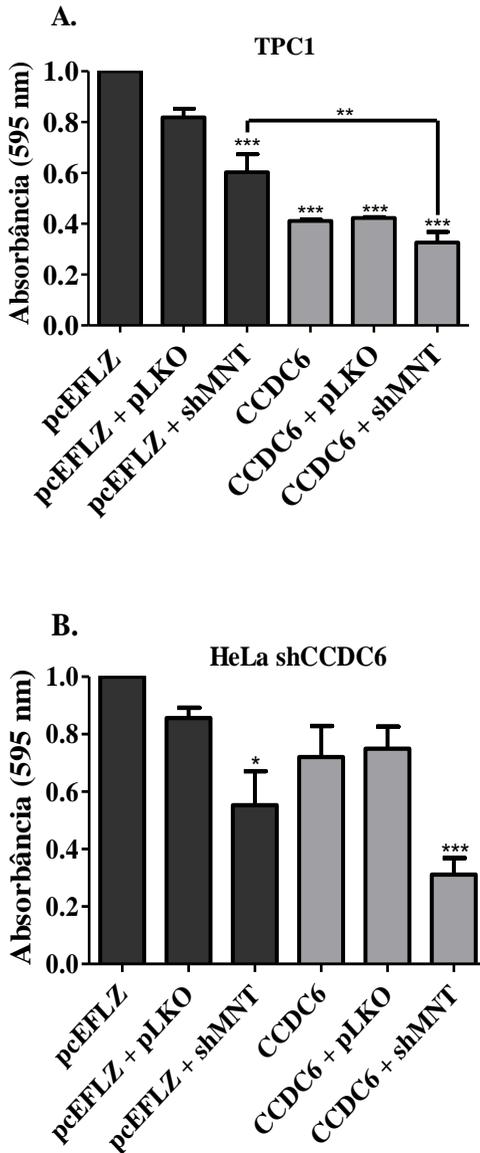
Células TPC1 (**A**) e HeLa shCCDC6 (**B**) foram transfectadas com os vetores para MNT e CCDC6 e seus respectivos vetores vazios. Após 36 h da transfecção, o meio

foi trocado e acrescentada Zeocina 500 µg/mL para a seleção das células transfectadas com os vetores de interesse. O mesmo procedimento foi repetido a cada 3 dias durante 12 dias. Após os 12 dias da seleção as células foram coradas com cristal violeta e descoradas com ácido acético para a medida da absorbância em um colorímetro (595 nm). Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. (*) representa diferença estatística significativa de $p < 0,05$ e (***) representa diferença estatística significativa de $p < 0,001$ entre os grupos transfectados com os vetores de MNT e CCDC6 e o grupo controle transfectado com pcEFLZ. Fonte: Do autor.

Conforme dados da literatura, a deleção de MNT aumenta o índice de apoptose celular (LINK et al., 2012). Sendo assim, células TPC1 e HeLa shCCDC6 foram transfectadas com os vetores para silenciamento de MNT (shMNT) e para a superexpressão de CCDC6 em uma proporção de 1:5 (CCDC6:shMNT) para garantir que células contendo CCDC6 também incorporassem o vetor de shMNT. Também foram transfectados os vetores vazios para shMNT e CCDC6, pLKO e pCEFLZ, respectivamente (figura 51).

Tanto em células TPC1 (Figura 51 (A)) quanto em células HeLa shCCDC6 (Figura 51 (B)) o silenciamento de MNT causou uma considerável diminuição da proliferação celular. A superexpressão de CCDC6 não ocasionou um efeito antiproliferativo significativo em células HeLa shCCDC6 como ocorreu em células TPC1. No entanto, o efeito antiproliferativo foi notoriamente evidente quando ambas as células foram submetidas de forma concomitante ao silenciamento de MNT e a superexpressão de CCDC6.

Figura 51 – Efeito do silenciamento de MNT e expressão de CCDC6 sobre a proliferação em células TPC1 e HeLa shCCDC6.



Células TPC1 (A) e HeLa shCCDC6 (B) foram transfectadas com os vetores para shMNT e CCDC6 e seus respectivos vetores vazios. Após 36 h da transfecção o

meio foi trocado e acrescentada Zeocina 500 µg/mL para a seleção das células transfectadas com os vetores de interesse. O mesmo procedimento foi repetido a cada 3 dias durante 12 dias. Após os 12 dias da seleção, as células foram coradas com cristal violeta e descoradas com ácido acético para a medida da absorbância em um colorímetro (595 nm). Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. (*) representa diferença estatística significativa de $p < 0,05$, (**) representa diferença significativa de $p < 0,01$ e (***) representa diferença estatística significativa de $p < 0,001$ entre os grupos transfectados com os vetores de MNT e CCDC6 e o grupo controle transfectado com pcEFLZ, ou entre os grupos pcEFLZ+shMNT e CCDC6+shMNT. Fonte: Do autor.

São vários os mecanismos descritos pelos quais CCDC6 pode causar a apoptose celular. Celetti e colaboradores (2004) constataram que os índices de apoptose aumentaram consideravelmente em células TPC1 transfectadas com CCDC6 WT. Em contrapartida, o mutante CCDC6 (1-101) tornou as células resistentes à morte, elevando a taxa de sobrevivência celular a 97%. Tal fato pode ser explicado porque a fosforilação de CCDC6 no resíduo de Ser 244 é requerida para a função apoptótica e tal resíduo está ausente no mutante CCDC6 (1-101). Ainda, a apoptose induzida por CCDC6 envolve a ativação de caspases associada com o aumento dos níveis da Bax e diminuição dos níveis da Bcl-2 (CELETTI et al., 2004).

Staubano e colaboradores (2013) mostraram que os níveis das proteínas caspase-3 e PARP clivada foram reduzidos em células GC1 (testículos – *Mus musculus*) com CCDC6 silenciado. Também, células HeLa shCCDC6 tratadas com etoposídeo entraram em mitose claramente mais cedo do que células HeLa CCDC6 submetidas ao mesmo tratamento (MEROLLA et al., 2012). Estes resultados sugerem que a depleção de CCDC6 induz uma fraca resposta celular à apoptose e induz a tolerância celular ao dano ao DNA.

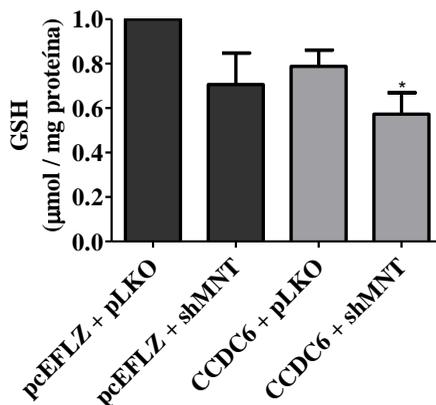
Recentemente Merolla e colaboradores (2012) descreveram que CCDC6 pode interagir com a subunidade catalítica da proteína PP4 (PP4C), impedindo a ação da mesma e desta forma facilitando a morte celular após danos ao DNA. Os autores transfectaram células HEK293T com CCDC6 WT ou dois mutantes diferentes de CCDC6 (CCDC6 1-101 e CCDC6 1-223). A co-precipitação com PP4C foi detectada apenas com a proteína CCDC6 WT, indicando que a interação CCDC6 e PP4C ocorre na porção carboxi-terminal de CCDC6. A superexpressão de PP4C já foi descrita em alguns tumores (WANG et al., 2008). A subunidade catalítica de PP4 (PP4C), um membro da família serina-treonina fosfatase (PPP), tem sido relacionada com a resposta de dano ao DNA estando relacionada com a desfosforilação da histona H2AX,

resultando em quantidade limitada de γ H2AX, contribuindo para a instabilidade genética e câncer (CHOWDHURY, 2008; COHEN; PHILP; VÁZQUEZ-MARTIN, 2005). Conforme reportado pelo *The Cancer Genome Atlas* (<http://cancergenome.nih.gov/>), pode existir uma correlação entre a perda ou inativação de CCDC6 e o aumento da atividade PP4C, tendo como resultado a alteração da fase G2 do ciclo celular, contribuindo para a transformação neoplásica.

Resultados descritos na literatura indicam que a perda de MNT conduz à apoptose celular (VASILEVSKY et al., 2011; NILSSON et al., 2004; HURLIN et al., 2003). Nilsson e colaboradores (2014) mostraram que a ausência de MNT direciona a resposta de MYC, incluindo a transcrição de genes para apoptose, proliferação e transformação. Altos níveis de MYC tem a habilidade de competir com MNT (LINK et al., 2012; MURPHY et al., 2008; WALKER et al. 2005) pela interação com MAX, em teoria, bloqueando a função de MNT (NILSSON et al., 2004). Sendo MYC um indutor de inúmeras vias metabólicas, inclusive a fosforilação oxidativa (LIU et al., 2012; DANG; LE; GAO, 2009) que aumenta a geração de EROs (VAFA et al., 2012). Link e colaboradores (2012) revelaram que células deficientes em MNT apresentam redução do conteúdo da GSH e tioredoxina redutase, que ocasionam um aumento dos níveis intracelulares de EROs, conduzindo a morte celular por apoptose. Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a diminuição significativa da proliferação celular após o silenciamento de MNT pode ter ocorrido devido à diminuição nos níveis de GSH e consequente aumento dos níveis de estresse oxidativo intracelular.

Levando-se em consideração o supracitado, para verificar se a inibição da proliferação celular após o silenciamento de MNT foi decorrência do aumento do estresse oxidativo intracelular, os níveis de GSH foram medidos em células TPC1, conforme apresentado na figura 52. A figura 52 mostra que o silenciamento de MNT ocasiona uma tendência à diminuição nos níveis de GSH, porém neste caso sem diferença estatística significativa em relação ao controle. Quando as células foram transfectadas com CCDC6 parece ter ocorrido uma tendência à indução do estresse oxidativo. No entanto, a transfecção concomitante de shMNT e CCDC6 ocasionou uma diminuição significativa nos níveis de GSH ($p < 0,05$), indicando um possível estresse oxidativo intracelular.

Figura 52 – Níveis de GSH em células TPC1 após o silenciamento de MNT e superexpressão de CCDC6.



Células TPC1 foram transfectadas com os vetores de shMNT e CCDC6 e seus respectivos vetores vazios (pLKO e pcEFLZ). 48 h após a transfecção, os lisados celulares foram preparados para os ensaios de GSH. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=3$. (*) representa diferença estatística significativa de $p < 0,05$ em relação ao controle (pcEFLZ + pLKO). Fonte: Do autor.

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com Link e colaboradores (2012) que relataram que a superprodução de EROs é decorrência de alterações aberrantes no metabolismo mitocondrial, sendo o excesso de EROs responsável pela apoptose em células MEFs (fibroblastos) deficientes em MNT. Tem sido proposto que a desregulação de MYC eleva os níveis de EROs em células deficientes em MNT tornando as células mais propensas à apoptose (GAO et al., 2007; WALKER et al., 2005; HURLIN et al., 2003).

Staibano e colaboradores (2013) verificaram que o silenciamento de CCDC6 ocasiona uma diminuição na forma oxidada de citocromo *c* e baixa detecção das proteínas Bad, PARP e caspase-3. Além disso, o mesmo silenciamento diminui a liberação de EROs pela mitocôndria, prejudica a ativação de γ H2AX e aumenta a viabilidade celular. Estes dados sugerem que a expressão de CCDC6 pode estar relacionada à produção de EROs intracelular, conforme resultados obtidos neste trabalho, e conseqüente dano ao DNA.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A localização nuclear de MNT depende da região HLH.
- No domínio C terminal de MNT residem regiões que regulam a sua degradação.
- MNT interage com CCDC6 e esta interação pode ser responsável pela inibição dos efeitos antiproliferativos de CCDC6. Os resultados corroboram dados da literatura os quais evidenciam que a deleção de MNT em tumores humanos pode refletir numa profunda resposta apoptótica. Porém, a inibição da proliferação celular diminui de forma significativa quando MNT é silenciado e CCDC6 superexpresso, sendo este efeito relacionado ao aumento do estresse oxidativo intracelular.

Como perspectivas sugere-se:

- Avaliar a interação dos novos mutantes de MNT (MNT Δ Nt1-HA, MNT Δ Nt2-HA e MNT Δ Ct2-HA) com CCDC6 para elucidar o domínio de MNT que interage com CCDC6;
- Avaliar a influência dos novos mutantes de MNT e CCDC6 sobre a proliferação celular;
- Avaliar a interferência de MNT e CCDC6 sobre o ciclo celular;
- Avaliar a expressão de proteínas pró-apoptóticas em células transfectadas com MNT e CCDC6;
- Melhor avaliar a influência da indução do estresse oxidativo sobre a morte celular causada pela interação entre MNT-CCDC6;
- Avaliar danos ao DNA causados pela interação MNT-CCDC6.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAJAR, M. et al. MYC in chronic myeloid leukemia: induction of aberrant DNA synthesis and association with poor response to imatinib. **Mol. Cancer Res.**, v. 9, p. 564-576, 2011.

AMATI, B. et al. Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. **Nature**, v. 359, p. 423-426, 1992.

ARVANITIS, C.; FELSHER, D.W. Conditional transgenic models define how Myc initiates and maintains tumorigenesis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 16, p. 313-317, 2006.

BRETONES, G.; DELGADO, M.D.; LEÓN, J. Myc and cell cycle control. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1849, p. 506-516, 2015.

CELETTI, A. et al. H4(D10S170), a gene frequently rearranged with RET in papillary thyroid carcinomas: functional characterization. **Oncogene**, v. 23, p. 109-121, 2004.

CHOWDHURY, D. et al. A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. **Mol. Cell**, v. 31, p. 33-46, 2008.

COHEN, P.T.; PHILP, A.; VÁZQUEZ-MARTIN, C. Protein phosphatase 4—from obscurity to vital functions. **FEBS Lett.**, v. 579, p. 3278-3286, 2005.

CONACCI-SORRELL, M.; McFERRIN, L.; EISENMAN, R.N. An overview of MYC and its interactions. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 4, p. a014357, 2014.

DANG, C.V.; LE, A.; GAO, P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, p. 6479, 2009.

EWING, R.M. et al. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. **Mol. Syst. Biol.**, v. 3, p. 89, 2007.

FERNANDEZ-CAPETILLO, O. et al. H2AX: the histone guardian of the genome. **DNA Repair**, v. 3, p. 959-967, 2004.

FUSCO, A. et al. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. **Nature**, v. 328, p. 170-172, 1987.

GAO, P. et al. HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. **Cancer Cell**, v. 12, p. 230-238, 2007.

GRANDORI, C. et al. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 16, p. 653-699, 2000.

GRIECO, M. et al. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. **Cell**, v. 60, p. 557-563, 1990.

HURLIN, P.J.; HUANG, J. The Max-interacting transcription factor network. **Semin. Cancer Biol.**, v. 16, p. 265-274, 2006.

HURLIN, P.J. et al. Evidence of mnt-myc antagonism revealed by mnt gene deletion. **Cell Cycle**, v. 3, p. 97-99, 2004.

HURLIN, P. et al. Deletion of Mnt leads to disrupted cell cycle control and tumorigenesis. **EMBO J.**, v. 22, p. 4584-4596, 2003.

HURLIN, P.J. et al. Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. **EMBO J.**, v. 18, p. 7019-7028, 1999.

HURLIN, P.J.; QUEVA, C.; EISENMAN, R.N. MNT, a novel Max-interacting protein is coexpressed with Myc in proliferating cells and mediates repression at Myc binding sites. **Genes Dev.**, v. 11, p. 44-58, 1997.

IMIELINSKI, M. et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. **Cell**, v. 150, p. 1107-1120, 2012.

JHIANG, S.M. The RET proto-oncogene in human cancers. **Oncogene**, v. 19, p. 5590-5597, 2000.

JUNGANG, Z. et al. FBXW7-mediated degradation of CCDC6 is impaired by ATM during DNA damage response in lung cancer cells. **FEBS Lett.**, v. 586, p. 4257-4263, 2012.

KIMURA, T. et al. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. **Endocr. Rev.**, v. 22, p. 631-656, 2001.

KULKARNI, S. et al. Fusion of H4/D10S170 to the platelet-derived growth factor receptor beta in BCR-ABL-negative myelo-proliferative disorders with a t(5;10)(q33;q21). **Cancer Res.**, v. 60, p. 3592-3598, 2000.

LAFITA-NAVARRO, M.C.L. UNIVERSIDADE DE CANTABRIA. **Nuevas funciones biológicas de MXD1 y MNT, proteínas de la red MYC-MAX-MXD.** Santander, Espanha, 2015, 266 f. Tese de Doutorado – Universidade de Cantabria, Espanha.

LEONE, V. CCDC6 represses CREB1 activity by recruiting histone deacetylase 1 and protein phosphatase 1. **Oncogene**, v. 29, p. 4341-4351, 2010.

LINK, J.M. et al. A critical role for Mnt in Myc-driven T-cell proliferation and oncogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 109, p. 19685-16690, 2012.

LIU, W. et al. Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 109, p. 8983-8988, 2012.

LUISE, C. et al. Identification of sumoylation sites in CCDC6, the first identified RET partner gene in papillary thyroid carcinoma, uncovers a mode of regulating CCDC6 function on CREB1 transcriptional activity. **PLoS One**, v. 7, p. e49298, 2012.

MEROLLA, F. et al. Loss of CCDC6, the first identified RET partner gene affects pH2AX S139 levels and accelerates mitotic entry upon DNA damage. **PLoS One**, v. 7, p. e36177, 2012.

MEROLLA, F. et al. Involvement of H4(D10S170) protein in ATM-dependent response to DNA damage. **Oncogene**, v. 26, p. 6167-6175, 2007.

MERONI, G. et al. Rox, a novel bHLHZip protein expressed in quiescent cells that heterodimerizes with Max, binds a non-canonical E box and acts as a transcriptional repressor. **EMBO J.**, v. 16, p. 2892-2906, 1997.

MORRA, F. et al. FBXW7 and USP7 regulate CCDC6 turnover during the cell cycle and affect cancer drugs susceptibility in NSCLC. **Oncogene**, v. 6, p. 12697-12709, 2015a.

MORRA, F. et al. New therapeutics perspectives in CCDC6 deficient lung cancer cells. **Int. J. Cancer**, v. 136, p. 2146-2157, 2015b.

MURPHY, D.J. et al. Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo. **Cancer Cell**, v. 14, p. 447-457, 2008.

NAKAMURA, I.; ROBERTS, L.R. Myc, Max, and Mnt: molecular mechanisms of enhancement of cholangiocarcinogenesis by cholestasis. **Gastroenterology**, v. 141, p. 32-34, 2011.

NILSSON, J.A. et al. Mnt loss triggers Myc transcription targets, proliferation, apoptosis and transformation. **Mol. Cell. Biol.**, v. 24, p. 1560-1569, 2004.

OSTER, S.K. et al. The Myc oncogene: MarvelousMY Complex. **Adv. Cancer Res.**, v. 84, p. 81-154, 2002.

PIEROTTI, M.A. Chromosomal rearrangements in thyroid carcinomas: a recombination or death dilemma. **Cancer Lett.**, v. 166, p. 1-7, 2001.

PIEROTTI, M.A. et al. Characterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and RET and creating the oncogenic sequence RET/PTC. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 1616-1620, 1992.

POPOV, N. et al. Mnt transcriptional repressor is functionally regulated during cell cycle progression. **Oncogene**, v. 24, p. 8326-8337, 2005.

PORTELLA, G. et al. Development of mammary and cutaneous gland tumors in transgenic mice carrying the Ret/PTC1 oncogene. **Oncogene**, v. 13, p. 2021-2026, 1996.

PULVERER, B. et al. Analysis of Myc/Max/Mad network members in adipogenesis: inhibition of the proliferative burst and differentiation by ectopically expressed Mad1. **J. Cell Physiol.**, v. 183, p. 399-410, 2000.

RECHSTEINER, M.; ROGERS, S.W. PEST sequences and regulation by proteolysis. **Trends Biochem.**, v. 21, p. 267-271, 1996.

SMITH, A.G. et al. Expression and DNA-binding activity of MYCN/Max and Mnt/Max during induced differentiation of human neuroblastoma cells. **J. Cell Biochem.**, v. 92, p. 1282-1295, 2004

STAIBANO, S. et al. Critical role of CCDC6 in the neoplastic growth of testicular germ cell tumors. **BMC Cancer**, v. 13, p. 433, 2013.

TAKEUCHI, K. et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. **Nat. Med.**, v. 18, p. 378-381, 2012.

TONG, Q.; XING, S.; JHIANG, S.M. Leucine zipper-mediated dimerization is essential for the PTC1 oncogenic activity. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 9043-9047, 1997.

VAFSA, O. et al. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species and mitigate p53 function: A mechanism for oncogene-induced genetic instability. **Mol. Cell**, v. 9, p. 1031-1044, 2002.

VASILEVSKY, N.A. et al. OX40 engagement stabilizes MXD4 and Mnt protein levels in antigen-stimulated T cells leading to an increase in cell survival. **Eur. J. Immunol.**, v. 41, p. 1024-1034, 2011.

WAHLSTRÖM, T.; HENRIKSSON, M. Mnt takes control as key regulator of the Myc/Max/Mxd network. **Adv. Cancer Res.**, v. 97, p. 61-80, 2007.

WALKER, W. et al. Mnt-Max to Myc-Max complex switching regulates cell cycle entry. **J. Cell Biol.**, v. 169, p. 405-413, 2005.

WANG, B. et al. Protein phosphatase PP4 is overexpressed in human breast and lung tumors. **Cell Res.**, v. 18, p. 974-977, 2008.

ANEXO 1

Hindawi Publishing Corporation
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Volume 2015, Article ID 465305, 10 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/465305>



Research Article

DNA Damage and Inhibition of Akt Pathway in MCF-7 Cells and Ehrlich Tumor in Mice Treated with 1,4-Naphthoquinones in Combination with Ascorbate

Fabiana Ourique,¹ Malcon R. Kvcleinski,² Karina B. Felpe,¹
João Francisco Gomes Correia,¹ Mirelle S. Farias,¹ Lulza S. E. P. W. Castro,¹
Valdelúcia M. A. S. Grinevicius,¹ Jaime Valderrama,³ David Rios,³ Julio Benites,³
Pedro Buc Calderon,⁴ and Rozangela Curí Pedrosa¹

¹Laboratório de Bioquímica Experimental, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), SC, Brazil

³Departamento de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad Arturo Prat, 2120 Avenida Arturo Prat, Iquique, Chile

⁴Toxicology and Cancer Biology Research Group, Louvain Drug Research Institute, Université Catholique de Louvain, 73 Avenue E. Mounier, GTOX 7309, 1200 Brussels, Belgium

Correspondence should be addressed to Rozangela Curí Pedrosa; rozangela pedrosa@gmail.com

Received 29 November 2014; Revised 19 January 2015; Accepted 19 January 2015

Academic Editor: Ryuichi Morishita

Copyright © 2015 Fabiana Ourique et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The aim of this study was to enhance the understanding of the antitumor mechanism of 1,4-naphthoquinones and ascorbate. Juglone, phenylaminonaphthoquinone-7, and 9 (Q7/Q9) were evaluated for effects on CT-DNA and DNA of cancer cells. Evaluations in MCF-7 cells are DNA damage, ROS levels, viability, and proliferation. Proteins from MCF-7 lysates were immunoblotted for verifying PARP integrity, γ H2AX, and pAkt. Antitumor activity was measured in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. The same markers of molecular toxicity were assessed *in vivo*. The naphthoquinones intercalate into CT-DNA and caused oxidative cleavage, which is increased in the presence of ascorbate. Treatments caused DNA damage and reduced viability and proliferation of MCF-7 cells. Effects were potentiated by ascorbate. No PARP cleavage was observed. Naphthoquinones, combined with ascorbate, caused phosphorylation of H2AX and inhibited pAkt. ROS were enhanced in MCF-7 cells, particularly by the juglone and Q7 plus ascorbate. Ehrlich carcinoma was inhibited by juglone, Q7, or Q9, but the potentiating effect of ascorbate was reproduced *in vivo* only in the cases of juglone and Q7, which caused up to 60% inhibition of tumor and the largest extension of survival. Juglone and Q7 plus ascorbate caused enhanced ROS and DNA damage and inhibited pAkt also in Ehrlich carcinoma cells.

1. Introduction

Current chemotherapy for cancer has limited efficacy and safety. It causes side effects, and the tumor cells often become resistant [1]. Studies dedicated to the development of novel agents for the treatment of cancer are highly encouraged. Quinoid compounds have been widely studied for potential cancer therapies [2–4]. It is known that some quinoid compounds can induce oxidative stress lethal to cancer cells.

Some quinoid compounds can also bind to DNA due to their electrical charge. Doxorubicin is an example of that: it can increase the generation of reactive oxygen species (ROS) and bind to DNA [5].

DNA is the target for most anticancer drugs. In cancer cells, the interactions between such drugs and DNA result in cell damage, block cell division, and lead to cell death [6]. These molecules can bind DNA by externally interacting with the minor or major grooves. They can also act as intercalating



In vivo inhibition of tumor progression by 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone) and 2-(4-hydroxyanilino)-1,4-naphthoquinone (Q7) in combination with ascorbate

Fabiana Ourique^a, Maicon R. Kwiecinski^b, Guilherme Zirbel^a, Luiza S.E.P.W. Castro^a, Allison Jhonatan Gomes Castro^a, Fátima Regina Mena Barreto Silva^a, Jaime A. Valderrama^c, David Rios^c, Julio Benites^c, Pedro Buc Calderon^d, Rozangela Curi Pedrosa^{a,*}

^a Department of Biochemistry, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

^b Postgraduate Program of Health Sciences, Universidade do Sul de Santa Catarina (UNESUL), Palhoça, SC, Brazil

^c Department of Chemical and Pharmaceutical Science, Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile

^d Toxicology and Cancer Biology Research Group (TOXCB), Leuven Drug Research Institute, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 June 2016
Accepted 23 June 2016
Available online xxx

Keywords:
Juglone
Q7 (2-(4-hydroxyanilino)-1,4-naphthoquinone)
Ascorbate
Apoptosis
Antitumor
Oxidative stress

ABSTRACT

The purpose of the study was to obtain further *in vivo* data of antitumor effects and mechanisms triggered by juglone and Q7 in combination with ascorbate. The study was done using Ehrlich ascites to mouse-bearing mice. Treatments were intraperitoneal every 24 h for 9 days. Control group was treated with recipient. Previous tests selected the doses of juglone and Q7 plus ascorbate (1 and 100 mg/kg, respectively). Samples of ascitic fluid were collected to evaluate carbonyl proteins, GSH and activity of antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase. Hypoxia-inducible factor HIF-1 α , GLUT1, protein regulating cell cycle (p53, p16 and cyclin A) and apoptosis (poly-ADP-ribose polymerase PARP, Bax and Bcl-2), were assessed by western blot. Tumor cells were categorized by the phase of cell cycle using flow cytometry and type of cell death using acridine orange/ethidium bromide. A glucose uptake assessment was performed by liquid scintillation using Ehrlich tumor cells cultured with ¹⁴C-deoxyglucose. Treatments caused increased protein carbonylation and activity of antioxidant enzymes and decreased levels of GSH, HIF-1 α , GLUT1 and glucose uptake in tumor cells. They also caused increased number of tumor cells in G1, p53 and p16 activation and increased cyclin A, but only when combined with ascorbate. Apoptosis was induced mostly when treatments were done with ascorbate, causing PARP and Bax cleavage, and increased Bax/Bcl-2 ratio. Juglone and Q7 in combination with ascorbate caused inhibition of tumor progress *in vivo* by triggering apoptosis and cell cycle arrest associated with oxidative stress, suppression of HIF-1 and uncoupling of glycolytic metabolism.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Some important drugs used for the treatment of cancer belong to the quinone class of organic compounds (e.g. doxorubicin and daunorubicin) [1]. Several quinoid compounds keep on being

isolated or synthesized and screened for antitumor activities. The studies have also evaluated the interactions occurring between some quinoid compounds and ascorbate [2,3]. In fact, it has been shown that ascorbate at pharmacological concentrations enhances the activity of drugs such as doxorubicin, among others [4].

Some 1,4-naphthoquinones seem to be promising for targeting cancer cells [5]. In general, these quinones possess a redox potential that allows inducing an oxidative stress responsible for damage in tumor cells [6]. As part of our ongoing studies, a series of 1,4-naphthoquinones, including juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone), Q7 (2-(4-hydroxyanilino)-1,4-naphthoquinone),

* Corresponding author. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina CEP: 88040-900, Brazil.

E-mail address: rcuri@pedra.ufsc.br, rcuri@pedra.ufsc.br (R.C. Pedrosa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.113>
0006-295X/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.