



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
FARMACÊUTICA

ESTUDO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE UMA
NOVA NAFTOQUINONA SINTETIZADA A PARTIR DA
LAUSONA

PATRÍCIA DANIELLE OLIVEIRA DE ALMEIDA

MANAUS
2017



PATRÍCIA DANIELLE OLIVEIRA DE ALMEIDA

ESTUDO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE UMA
NOVA NAFTOQUINONA SINTETIZADA A PARTIR DA
LAUSONA

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Inovação
Farmacêutica da Universidade Federal
do Amazonas para a obtenção do grau
de Doutor em Inovação Farmacêutica.

Orientador:

Prof. Dr. Emerson Silva Lima

Co-orientadora:

Prof^ª. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos

MANAUS

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A447e Almeida, Patrícia Danielle Oliveira de
Estudo do potencial antineoplásico de uma nova naftoquinona sintetizada a partir da Lausona / Patrícia Danielle Oliveira de Almeida. 2017
134 f.: il. color; 31 cm.

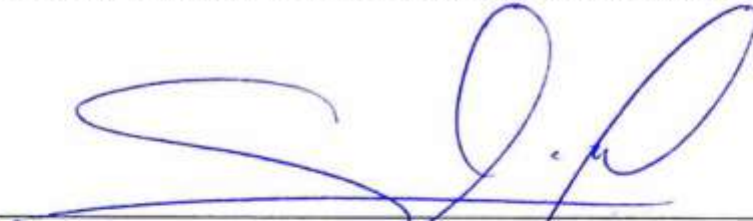
Orientador: Emerson Silva Lima
Coorientadora: Marne Carvalho de Vasconcellos
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. naftoquinona. 2. Lausona. 3. antitumoral. 4. carcinogênese. 5. câncer de mama. I. Lima, Emerson Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título


Patrícia Danielle Oliveira de Almeida

ESTUDO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE UMA
NOVA NAFTOQUINONA SINTETIZADA A PARTIR DA
LAUSONA.

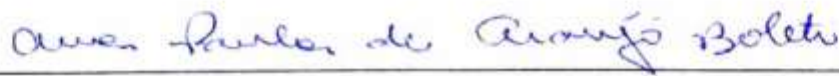
Tese aprovada como requisito para obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica, no Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, pela seguinte banca examinadora:



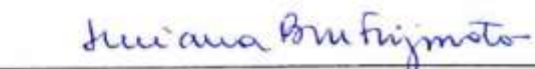
Prof. Dr. Emerson Silva Lima (Orientador)
Universidade Federal do Amazonas – UFAM




Prof.ª. Dr.ª. Carolina Rosal Teixeira de Souza
Universidade Federal do Pará – UFPA



Prof.ª. Dr.ª. Ana Paula de Araújo Boleti
Universidade Federal Grande Dourados – UFGD



Prof.ª. Dr.ª. Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto
Universidade Federal do Amazonas – UFAM



Prof. Dr. Antônio Luis Boechat Lopes
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Dedicatória

Dedico esta importante conquista à Sabedoria Divina, que sempre se fez presente:
Na minha intenção de fazer o certo e o melhor,
Nas pessoas que eu convivi durante todo este tempo,
Nas lições que aprendi conhecendo colegas, ajudando e sendo ajudada,
No crescimento profissional e pessoal ao longo desta caminhada
Na luz que surgia quando tudo parecia escuro,
Na força que me empurrava para frente quando o desânimo não me permitia avançar,
Na alegria que sentia em cada resultado alcançado,
No conhecimento e apoio dos professores que orientaram este estudo.
Na conquista de mais um ideal em minha vida.
Ao meu anjo da guarda, meu zeloso guardador, que me ilumina e protege agora e sempre.

Aos meus pais Walter e Nazaré, por tudo que me ensinaram, pelo Amor que me tornou o que sou hoje, pela gratidão que sinto por vocês. Obrigado pelo sentido maravilhoso de família que vocês me mostraram.

Dedico toda alegria de ter conseguido chegar até aqui as meus irmãos que desde cedo foram fontes de minha inspiração.

À minha amiga que o doutorado me deu de presente Gleyce Barbosa pelos momentos de apoio, carinho e confiança.

Gostaria de dedicar este trabalho aos que sofrem com o câncer, seus familiares e amigos e também a todos os profissionais de saúde que de uma forma ou de outra acompanham a dor e o sofrimento de quem tem esta doença tão agressiva e angustiante. Que a misericórdia Divina esteja sempre presente em vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Amazonas, onde iniciei minha vida acadêmica e pude ingressar nos cursos de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica (mestrado) e Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica (doutorado), foi graças a essa oportunidade que hoje eu cheguei até aqui.

Meus sinceros agradecimentos ao professor Dr. Emerson Silva Lima (orientador), pela dedicação ao ensino, à pesquisa e pela orientação segura e paciente que possibilitou a realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos à professora Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos co-orientadora dessa tese. O destino foi o responsável em me dar de presente este projeto, uma vez que nunca imaginei trabalhar com a linha de pesquisa relacionada ao câncer, e pela qual eu me encantei.

Meus agradecimentos ao professor e pesquisador Dr. Daniel Pereira Bezerra pela parceria firmada junto ao Instituto Gonçalo Moniz - FIOCRUZ / BA (Salvador, Bahia). Pelo acolhimento, pela disponibilidade e por nós fornecer todas as ferramentas possíveis para a realização deste trabalho.

Meus agradecimentos à professora Dra. Lirlândia Pires de Sousa pela parceria firmada junto a Universidade Federal de Minas Gerais e que mesmo diante das

dificuldades me acolheu de forma carinhosa, permitindo a realização dos experimentos de western blotting.

Agradeço a todos os amigos que conheci ao longo dessa jornada, em especial a todos que fazem parte do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Instituto Gonçalo Moniz - FIOCRUZ / BA: Larissa, Rosane, Ludmila, Thaís, Carol, Nana, Diogo, Cassinho, Cinara, Sara, Mayara.

Agradeço as meninas do laboratório em Belo Horizonte a qual a força que vocês me deram naquele momento foi muito importante: Juliana, Michele, Grazi, Kátia e Larissa (você é minha parceira para a vida inteira).

Obrigada a todos os companheiros de caminhada do Laboratório Biophar, cada um teve sua parcela de contribuição direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho. Não quero citar nomes para não ser injusta e esquecer alguém, afinal foram tantas as pessoas que passaram no laboratório ao longo desses 4 anos.

E finalizo com a seguinte mensagem: Não sou e nunca fui o melhor exemplo de aluna, tenho minhas dificuldades e minhas limitações, mas gostaria de ser uma fonte de incentivo aos demais colegas que continuam na pesquisa, afinal todos nós sabemos que a caminhada não é fácil.

Sou muito grata a todos vocês!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via apoptótica mediada por receptor de morte e via mitocondrial	27
Figura 2 – Esquema simplificado da morte celular induzido por necrose.....	29
Figura 3 – Etapas gerais da autofagia.....	32
Figura 4 – Catástrofe mitótica	34
Figura 5 - Fases do ciclo celular.....	36
Figura 6 - Distribuição de ciclinas/CDKs nas diferentes fases do ciclo celular.....	37
Figura 7 - Três mecanismos de morte celular induzido por EROs.....	40
Figura 8 - Processo ciclo redox de quinona.....	41
Figura 9 - Delineamento experimental do presente estudo	49
Figura 10 - Via de síntese utilizada para a preparação de α - e β -2,3 furano naftoquinonas.	50
Figura 11 - Efeito de CNFD na morfologia de células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.	70
Figura 12 - Efeito de CNFD na motilidade de células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.	72
Figura 13 - Efeito de CNFD sobre a produção de $O_2^{\bullet-}$ em células MFC-7 de adenocarcinoma de mama humano.	79
Figura 14 - Efeito de CNFD na expressão de fosfo-MAP quinases em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.	89
Figura 15 - Histopatologia de tumores extirpados, pulmões, fígados e rins de camundongos tratados com CNFD.....	97
Figura 16 – Mecanismo proposto pela ação de CNFD.....	112

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito de CNFD na viabilidade de células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano	68
Gráfico 2 - Padrão de morte celular induzido por CNFD em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.	75
Gráfico 3 - Efeito de CNFD na ativação de caspases em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano	77
Gráfico 4 - Efeito de CNFD nos níveis de EROs intracelulares em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.	78
Gráfico 5 - Efeito de CNFD sobre a produção de NO em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano	80
Gráfico 6 - Efeito de CNFD na indução de morte celular com o co-tratamento utilizando o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.	81
Gráfico 7 - Efeito de CNFD sobre a despolarização da membrana mitocondrial em células MCF-7 de adenocacinoma de mama humano	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade citotóxica de CNFD sobre linhagens de células neoplásicas e em célula normal.	66
Tabela 2 - Atividade citotóxica de doxorrubicina sobre linhagens de células neoplásicas e em célula normal e paclitaxel em células MCF7.	66
Tabela 3 - Índice de seletividade (IS*) para o composto CNFD e doxorrubicina.	67
Tabela 4 - Efeito de CNFD sobre a distribuição de DNA em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano após 24 e 48 h de incubação.	73
Tabela 5 - Efeito de CNFD sobre a expressão de genes relacionados à carcinogênese em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.	84
Tabela 6 - Efeito de CNFD sobre a massa tumoral em camundongos inoculados com células B16F10.	90
Tabela 7 - Efeito de CNFD sobre a massa corpórea e a massa úmida dos órgãos de camundongos inoculados com células B16F10.	92
Tabela 8 - Efeito de CNFD sobre os parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos inoculados com células B16F10.	92
Tabela 9 - Efeito de CNFD sobre os parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos inoculados com células B16F10.	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Vários tipos de agentes antitumorais com seus mecanismos e usos clínicos.	23
Quadro 2: Estudos publicados evidenciando a ação naftoquinonas como agentes antitumorais.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD - Morte celular accidental.

AP-1 - Proteína ativadora 1.

CAN - Nitrato de amônio.

CCND1 - Ciclina D1.

CDK2 - Ciclina dependente de quinase 2.

CDKN1A - Ciclina dependente de quinase inibidor A1.

CDKs - quinases dependentes das ciclinas.

CI₅₀ - Índice de citotoxicidade que causa morte celular de 50%.

CNFD - 6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) -diona

DCF-DA - 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato.

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico.

ERK1/2 - Proteína quinase regulada por sinal extracelular.

EROS - Espécies Reativas de Oxigênio.

Fas-L - Ligante de Fas.

FCCP - Carbonil cianeto rtrifluoro-metoxi fenilhidrazona.

FOS - Proto-oncogene fator de transcrição para AP-1.

GRB2 - Proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2.

IS - Índice de Seletividade.

IV - Cério.

JNK - Proteína c-Jun N-terminal quinase.

KRAS - Kras proto-oncogene GTPase.

MAX - MYC associado ao fator X.

NAC - N-acetilcisteína.

NCCD - Comitê de Nomenclatura de Morte Celular.

NO[•] - Óxido nítrico.

NO²⁻ - Nitrito.

O₂^{•-} - Ânion radical superóxido.

PI - Iodeto de propídio.

PI3K III - Fosfatidilinositol 3-cinase de classe III.

RAC1 - Substrato 1 de toxina botulínica C3 relacionado com Ras.

RCD - Morte celular regulada.

RHOA - Ras homólogo família membro A.

SFB - Soro Fetal Bovino.

SOS1 - SOS Ras/Rac guanina nucleotídeo fator de troca 1.

TNF- α - Fator de necrose tumoral α .

TRAIL - Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF.

RESUMO

As quinonas são metabólitos secundários derivados de plantas que apresentam diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiinflamatórias, antipiréticas e anticancerígenas. No presente estudo, foi avaliado o efeito citotóxico de uma nova naftoquinona 6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) -diona (CNFD) em diferentes linhagens tumorais. CNFD apresentou atividade citotóxica em todas as linhagens tumorais testadas, especialmente em células de adenocarcinoma de mama humano - MCF-7, as quais apresentaram valores de CI_{50} de 3,06 e 0,98 μ M durante 24 e 48 horas de incubação, respectivamente. Em ensaios de migração e cicatrização de feridas, o CNFD exibiu inibição da motilidade celular. Além disso, foi observado características típicas da apoptose, como o encolhimento das células, condensação da cromatina, exposição à fosfatidilserina, aumento da ativação das caspases 9 e 3, aumento da fragmentação do DNA internucleosomal sem afetar a permeabilização da membrana celular, aumento da produção de EROS e a perda do potencial da membrana mitocondrial. As experiências de expressão de genes indicaram que CNFD aumentou a expressão dos genes CDKN1A, FOS, MAX e RAC1 e baixou o nível de transcritos de mRNA de vários genes, incluindo CCND1, CDK2, SOS1, RHOA, GRB2, EGFR e KRAS. O tratamento de CNFD em células MCF-7 causou a ativação da proteína quinase c-jun ativada pelo estresse (JNK) e da proteína quinase ativada por mitógenos p38 e inativação da proteína quinase 1/2 regulada por sinal extracelular (ERK1/2). Em estudo *in vivo* utilizando o modelo murino de melanoma, CNFD induziu potente atividade antitumoral. Neste trabalho, descreveu-se pela primeira vez a citotoxicidade e atividade antitumoral de CNFD e os mecanismos sequenciais de apoptose em células MCF-7. Esses resultados sugerem que o CNFD é um candidato potencial para uso na terapia antitumoral.

Palavras chave: naftoquinona, Lausona, apoptose, antitumoral, carcinogênese, câncer de mama

ABSTRACT

Quinones are plant-derived secondary metabolites that present diverse pharmacological properties, including antibacterial, antifungal, antiviral, antiinflammatory, antipyretic and anticancer activities. In the present study, we evaluated the cytotoxic effect of a new naftoquinona 6b,7-dihydro-5H-cyclopenta[b]naphtho[2,1-d]furan-5,6(9aH)-dione (CNFD) in different tumor cell lines. CNFD had cytotoxic activity against different tumor cell lines, especially in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells, which showed IC₅₀ values of 3.06 and 0.98 μM for 24 and 48 h incubation, respectively. In wound-healing migration assays, CNFD exhibited inhibition of cell migration. Typical hallmarks of apoptosis, such as cell shrinkage, chromatin condensation, phosphatidylserine exposure, increase of the caspases 9 and 3 activation, increase of internucleosomal DNA fragmentation without affecting the cell membrane permeabilization, increase production of ROS and loss of mitochondrial membrane potential were found. Moreover, gene expression experiments indicated that CNFD increased the expression of the genes CDKN1A, FOS, MAX and RAC1 and lowered the level of mRNA transcripts of several genes, including CCND1, CDK2, SOS1, RHOA, GRB2, EGFR and KRAS. The treatment of CNFD in MCF-7 cells caused the activation of c-jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and inactivation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2). In *in vivo* study using a melanoma murine model, CNFD induced potent anti-tumor activity. Here, we describe for the first time the cytotoxicity and anti-tumor activity of CNFD and sequential mechanisms of apoptosis in MCF-7 cells were related. Our results suggest that CNFD is potential candidate in the anti-tumor therapy.

Keywords: naphthoquinone, Lawsone, apoptosis, anticancer drugs, carcinogenesis, breast cancer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1	CÂNCER	20
2.2	O PAPEL DA MORTE CELULAR NA RESPOSTA A TERAPIA ANTITUMORAL	24
2.2.1	Apoptose.....	25
2.2.2	Necrose.....	28
2.2.3	Autofagia.....	30
2.2.4	Catástrofe mitótica	33
2.3	ALVOS CELULARES DE COMPOSTOS ANTITUMORAIS	35
2.3.1	Ciclo celular	35
2.3.2	Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e o estado Redox Celular	38
2.4	NAFTOQUINONAS COMO NOVOS AGENTES ANTITUMORAIS.....	43
3	OBJETIVOS	48
3.1	Objetivo Geral:	48
3.2	Objetivos Específicos:	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1	Delineamento experimental	49
4.2	Obtenção da droga	50
4.3	Cultivo celular.....	51
4.4	Avaliação do potencial citotóxico <i>in vitro</i>	51
4.4.1	Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue®.....	51
4.4.2	Avaliação da citotoxicidade pelo método de exclusão de azul de tripano	52
4.4.3	Análise morfológica pela coloração por hematoxilina e eosina.....	53
4.4.4	Avaliação da motilidade celular pelo método cicatrização de feridas	54
4.4.5	Avaliação do ciclo celular.....	54
4.4.6	Avaliação do tipo de morte celular – Externalização de fosfatidilserina	55
4.4.7	Avaliação da atividade de caspases.....	55
4.4.8	Determinação dos níveis de EROs usando DCF-DA (2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato).....	56

4.4.9	Determinação da produção do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	57
4.4.10	Determinação da produção de óxido nítrico (NO^{\bullet})	57
4.4.11	Ensaio de proteção com N-acetilcisteína (NAC)	58
4.4.12	Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial.....	58
4.4.13	Avaliação da expressão gênica.....	59
4.4.13.1	Análise da expressão gênica por PCR Array.....	59
4.4.13.2	Isolamento de RNA total e transcrição reversa	59
4.4.13.3	PCR Array	60
4.4.14	Preparação de lisado e análise de Western blotting	61
4.5	Avaliações do potencial antitumoral <i>in vivo</i>	62
4.5.1	Animais	62
4.5.2	Protocolo experimental	62
4.5.3	Avaliação da toxicidade sistêmica	63
4.6	Análise Estatística.....	64
5	RESULTADOS	65
5.1	Efeito citotóxico de CNFD em diferentes linhagens tumorais	65
5.2	Efeito antiproliferativo de CNFD em células MCF-7	67
5.3	Efeito de CNFD sobre a morfologia de células MCF-7	69
5.4	Efeito de CNFD sobre a motilidade de células MCF-7	71
5.5	Efeito de CNFD na fragmentação de DNA internucleossomal de células MCF-7	72
5.6	Efeitos de CNFD na indução de apoptose em células MCF-7	74
5.7	Efeito de CNFD na ativação de caspases em células MCF-7	76
5.8	Efeitos de CNFD sobre a produção de EROs em células MCF-7	77
5.9	Efeitos de CNFD sobre a produção de ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em células MCF-7.....	78
5.10	Efeitos de CNFD sobre a produção de óxido nítrico em células MCF-7	80
5.11	Efeito de CNFD com o co-tratamento utilizando o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) em célula MCF-7	
5.12	Avaliação do efeito de CNFD sobre a despolarização da membrana mitocondrial em células MFC-7.....	82
5.13	Efeito de CNFD na expressão de genes relacionados a carcinogênese em células MCF-7.....	83

5.14 Efeito de CNFD na ativação das vias de sinalização das MPKs: p-38, JNK e ERK1/2	88
5.15 Efeito antitumoral de CNFD em modelo murino de melanoma experimental ..	90
5.16 Efeito de CNFD na toxicidade sistêmica de camundongos inoculados com células B16F10	91
5.16.1 Análises histológicas dos tumores e órgãos relacionados ao metabolismo de fármacos	94
6. DISCUSSÃO	98
8. CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

1 INTRODUÇÃO

O câncer, doença classificada como neoplasia maligna ou tumor maligno, é o termo genérico para definir um amplo grupo de doenças que acometem diversas células e tecidos. As características básicas do câncer consistem no rápido surgimento de células anormais a um determinado tecido, capazes de se multiplicar desordenadamente, de forma acelerada, com potencial para invadir e se multiplicar em tecidos adjacentes e/ou distantes do seu local de surgimento (SEYFRIED et al., 2014).

Nas últimas décadas apesar da redução da mortalidade por câncer observada em países desenvolvidos, o número de casos e de óbitos para os próximos 20 a 40 anos será o dobro das estimativas atuais (BARBOSA et al., 2015). Recentemente, uma atenção considerável foi elaborada na busca de novas drogas anticâncer, a fim de melhorar as taxas de sobrevivência e bem-estar (PRACHAYASITTIKUL et al., 2014). Somando-se a estes fatos, o incentivo às pesquisas oncológicas são de grande relevância, principalmente no Brasil, pois embora alguns estudos mostrem o aumento da sobrevida (por exemplo, no câncer de mama) (WEGWARTH, 2015)(WEGWARTH, 2015), na maioria dos casos a sobrevida de uma pessoa com câncer no país é em torno de 2 a 4 anos, enquanto nos países desenvolvidos esse índice sobe para 12 a 16 anos (INCA, 2003).

A busca por medicamentos antitumorais tem aumentado com vistas a se encontrar tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que visem à descoberta de novas estratégias que impeçam a progressão da doença. Baseadas em avanços significativos na biologia do câncer, as pesquisas buscam moléculas que atuem com mecanismos específicos para cada tipo da enfermidade, como inibição da polimerização da tubulina

atuação no DNA, bloqueadores enzimáticos ou de microtúbulos celulares (KALIA, 2015). Para identificar novos compostos com possível potencial antitumoral, foi selecionada uma classe descrita como promissora para essa atividade, as naftoquinonas. As naftoquinonas estão amplamente distribuídas na natureza e desempenham papéis fisiológicos importantes em animais e plantas (KANAAAN et al., 2009). Atualmente, há um grande interesse pelo conhecimento da farmacologia e do mecanismo de ação das naftoquinonas. Estudos mostram que compostos naturais e os derivados sintéticos de naftoquinonas, demonstram ter atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antimalárica, entre outras (DA SILVA ET AL., 2003; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2014).

Derivados de quinonas podem ser tóxicos para as células devido a vários mecanismos, incluindo ciclos redox, arilação, intercalação, indução de quebras de DNA, geração de radicais livres e a alquilação através da formação de hidroquinona. Além disso, um certo número de análogos de naftoquinona como a plumbagina, shikonina e naftazarina, bem como β -lapachona, também foram encontrados como inibidores da topoisomerase, cuja a ação provoca o desencadeamento da apoptose celular (KANAAAN et al., 2009).

Neste contexto, o presente trabalho propõe a investigação do potencial antineoplásico de 6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) -diona, denominada como CNFD. Este composto foi sintetizado a partir da 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (Lausona). Trabalhos anteriores comprovam a atividade antifúngica exercida por CNFD, entretanto, até o momento não há estudos envolvendo seu potencial antitumoral. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade citotóxica de CNFD em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* e o possível mecanismo envolvido na morte celular.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER

Câncer é um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e disseminação de células anormais, além disso novas evidências indicam que o câncer é uma doença metabólica envolvendo distúrbios na produção de energia através da respiração e fermentação (KALIA, 2015; SEYFRIED et al., 2014).

Diversas alterações genéticas e epigenéticas direcionam células normais à malignidade. Tais alterações participam em vias oncogênicas, permitindo a proliferação e disseminação das células malignas (MANUEL; VALDESPINO-CASTILLO; EDMUNDO, 2010). Associados aos fatores genéticos existem componentes externos que contribuem para a carcinogênese, como: o uso do tabaco, o consumo de álcool, o hábito alimentar e sedentarismo (FEIL; FRAGA, 2012). Além destes fatores, agentes físicos, como a radiação, e agentes biológicos, como os vírus podem influenciar o processo carcinogênico, induzindo mutações em genes que codificam oncoproteínas e proteínas supressoras de tumor (LUO et al., 2013; RALPH et al., 2010).

Com base no document *World Cancer Report 2014* da International Agency for Research on Cancer (IARC) da Organização Mundial de Saúde (OMS), é inquestionável que o cancer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que, nas próximas décadas, o impacto do cancer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025. A estimativa para o Brasil, biênio 2016/2017, aponta a ocorrência de cerca é de 600 mil casos novos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama

(58 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurão entre os principais (INCA, 2016). No estado do Amazonas a estimativa é de mais de 5 mil novos casos de câncer, entre estes, 440 novos casos de câncer de mama, sendo 380 novos casos na cidade de Manaus (INCA, 2015).

No tratamento do câncer as principais terapias utilizadas são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia citotóxica. Nas últimas décadas a hormonioterapia e a imunoterapia, vem ganhando espaço no tratamento das diferentes formas da doença (ALVARENGA; CAIRES, 2014).

No início de 1900, o famoso químico alemão Paul Ehrlich, começou a desenvolver medicamentos para tratar doenças infecciosas. Ele foi quem cunhou o termo "quimioterapia" e definiu-o como o uso de compostos para tratar a doença. Também foi a primeira pessoa a documentar a eficácia de modelos animais para rastrear uma série de compostos com potencial atividade contra doenças, uma realização que teve ramificações importantes para o desenvolvimento de medicamentos contra o câncer. A cirurgia e a radioterapia dominaram o campo da terapia contra o câncer em 1960 até que se tornou claro que as taxas de cura após tratamentos locais cada vez mais radicais estabilizavam em cerca de 33%. Devido à presença de micrometástases e de novos dados mostrando que a combinação de quimioterapia poderia curar pacientes com câncer avançado, possibilitou a oportunidade de aplicar medicamentos em conjunto com a cirurgia e/ou radioterapia para lidar com a questão de micrometástases, inicialmente em pacientes com câncer de mama, surgindo desta forma a chamada quimioterapia adjuvante, tornando-se prática clínica normal (DEVITA; CHU, 2008).

A descoberta de drogas antitumorais tem tradicionalmente focado em alvejar a síntese de DNA e divisão celular, resultando em medicamentos, tais como antimetabolitos e agentes alquilantes. Embora estes fármacos mostrem eficácia, a sua falta de seletividade para células tumorais podem resultar em efeitos colaterais graves. No entanto, a crescente associação de genes específicos com os diferentes tipos de câncer abriram portas para uma abordagem mais racional (ATKINS; GERSHELL, 2002).

Apesar do tratamento do câncer favorecer uma abordagem direcionada, a eficácia da terapêutica difere em grande parte entre os indivíduos e o tipo do câncer. Neste contexto, as células tumorais muitas vezes residem em microambientes únicos armados com uma variedade de respostas adaptativas e com presença de mutações. Assim, os principais objetivos no desenvolvimento de agentes anticâncer hoje, é melhorar a eficácia terapêutica; a seletividade e superar o fenômeno de resistência aos medicamentos (INDRAN et al., 2011a).

O sucesso de agentes direcionados molecularmente, tais como imatinib, levou à expectativa de uma nova era no desenvolvimento de drogas anticâncer, e a um aumento na estratégia de terapia alvo. No entanto, o número de sucessos até à data é pequeno, e resultados recentes sugerem que o sucesso de imatinib, por exemplo, no tratamento da leucemia mielóide crônica e tumor estromal gastrointestinal podem ser a exceção e não a regra. Desta forma, há sempre uma necessidade constante de desenvolver fármacos antineoplásicos, e essa busca precisa continuar em tantas frentes que possível, e não ser focada em uma estratégia por si só (HAMBLEY; HAIT, 2009). No quadro 1 estão sumarizados alguns agentes atuais usados na quimioterapia.

Quadro 1: Vários tipos de agentes antitumorais com seus mecanismos e usos clínicos.

Classe	Subclasse com exemplos	Mecanismos de Ação	Usos clínicos
ANTIMETABÓLITOS	Antagonistas de folato: Metotrexato	Inibe a di-hidrofolato redutase, afetando o metabolismo nucleosídico.	Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), Coriocarcinoma, Câncer de mama, cabeça; pulmão; cervical.
	Antagonistas de pirimidina: 5-Fluorouracil; Citarabina; Gemcitabina; Capecitabina	Bloqueia a formação de nucleótidos de pirimidina por incorporação em DNA recém-sintetizado.	Câncer de pele de células basais, adenocarcinoma; Cânceres de mama-colon; estômago; reto; pâncreas; Câncer de Próstata e bexiga.
	Antagonistas de purina: 6-mercaptopurina; 6-Tioguanina	Agem como substrato falso para reações bioquímicas e inibem a fase S de replicação.	Leucemia mielóide aguda e crônica, Leucemia linfocítica aguda, Leucemia mielomonocítica aguda.
AGENTES GENOTOXICOS (Ligam-se ao DNA e afetam direta / indiretamente a replicação que induz a apoptose.)	Agentes alquilantes: Cisplatina; Ciclofosfamida Melfalan; Temazolomida Carmustina; Ifosfamida Estreptozotocina	Introduzir grupos alquilo no DNA e criar reticulação entre duas cadeias de DNA e inibir a síntese protéica.	Tumor cerebral, câncer testicular, câncer da cabeça e pescoço, doença de Hodgkin, carcinoma do pâncreas, câncer do ovário e da bexiga.
	Agentes intercalantes: Epirrubicina; Doxorubicina Dactinomicina	Ligam-se ao DNA através da intercalação entre pares de bases específicos, bloqueando assim a síntese de DNA.	Câncer de mama, leucemia aguda; Câncer de endométrio, Câncer de tireoide; Tumor de Wilm's; Sarcoma de Ewing; Sarcoma de Rbdomiolo; Neuroblastoma
	Inibidores enzimáticos: Etoposido; Topotecano Irinotecan	Etopósido: Inibe a topoisomerase II Topotecan / Irinotecan: Inibe a topoisomerase I	Câncer de pulmão de células pequenas, sarcoma de Kaposi; Câncer de mama. Câncer de ovário, pulmão, cólon e Câncer de pulmão de células pequenas
INIBIDORES MITÓTICOS	Alcalóides da vinca: Vincristina Vinblastina	Parada da divisão celular em metafase ligando-se à tubulina.	Vincristina: Leucemia Linfocítica Aguda (ALL), tumor de Wilms, sarcoma de Rbdomelo, Câncer de mama; cervical; ovário. Vinblastina: Carcinoma testicular, doença de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de mama; pulmão.
	Derivados taxanos: Paclitaxel; Docetaxel	Estabilizar a polimerização das tubulinas e inibir a desmontagem dos microtúbulos.	Câncer de mama, ovário, pulmões, cabeça e pescoço.
NOVOS AGENTES	Inibidores da proteína tirosina quinase: Imatinib	Inibindo esta enzima, inibe a proliferação de células mielóides.	Leucemia mielóide crônica (CML), tumor de células estromais do trato gastrointestinal
	Inibidores do fator do receptor do fator de crescimento (EGFR): Gefitinib; Erlotinib	A ativação de EGFR induz dimerização e ativação intracelular de proteína tirosina quinase (igual à anterior).	Câncer de pulmão metastático de células não pequenas; Tumores sólidos.
	Inibidor do Proteosoma Bortezomib	Previne a degradação da proteína intracelular levando à ativação da cascata de sinalização, parada do ciclo celular e apoptose	Mieloma múltiplo refratário e recidivante.
	Anticorpos Monoclonais: Rituximab; Alemtuzumab; Trastuzumab	Este agente tem como alvo CD20, CD52, antígenos de células B que ativa a apoptose. Trastuzumab alveja contra a proteína 2 do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) e induz a apoptose no câncer de mama.	Linfoma de células B, leucemia linfocítica crônica, linfoma de células T e cancro da mama
	Inibidores da Aromatase: Anastrozol Letrozole Exemestano	Aromatase, responsável pela conversão da testosterona em estradiol	Receptor de Estrogênio (ER) positivo Câncer de mama metastático no pós Mulheres menopáusicas que são resistentes ao Tamoxifeno.

Fonte: Adaptado de (CHORAWALA; OZA; SHAH, 2012)

2.2 O PAPEL DA MORTE CELULAR NA RESPOSTA A TERAPIA ANTITUMORAL

A morte celular desempenha um papel importante no crescimento e progressão do câncer, bem como na eficácia da quimioterapia. Embora a apoptose seja geralmente considerada como o principal mecanismo de morte celular programada, há muitos relatos que vários agentes anticâncer não induzem unicamente a apoptose, mas outras formas de morte celular, tais como a necrose, autofagia e a catástrofe mitótica, bem como o estado de permanente perda de capacidade proliferativa conhecida como senescência (MANSILLA; LLOVERA; PORTUGAL, 2012).

Em 2009, o Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (NCCD) propôs um conjunto de recomendações para a definição de morte celular baseada em critérios morfológicos (KROEMER et al., 2009). Em 2012, uma nova classificação foi proposta tendo em vista o progresso substancial na exploração bioquímica e de marcadores moleculares, desta forma, outros modelos de morte celular foram descritos, incluindo a necroptose, paraptose, piroptose, dentre outras, cujas as características podem variar das definições atuais das principais vias de morte celular (GALLUZZI et al., 2012).

Em 2014, uma nova revisão foi realizada pelo NCCD no qual abordam novos termos relacionados a morte celular, como por exemplo, a "morte celular acidental" (ACD) refere-se a células expostas a estímulos físico-químicos ou mecânicos extremos e que morrem de forma incontrolável, como resultado da sua ruptura estrutural imediata e a "morte celular regulada (RCD) que pode ocorrer como parte de programas fisiológicos ou pode ser ativada quando as respostas adaptativas a perturbações do microambiente extracelular ou intracelular falharem (GALLUZZI et al., 2014).

Em uma tentativa de simplificar essa discussão, apenas os eventos de morte celular e os mecanismos bem compreendidos serão aqui apresentados.

2.2.1 Apoptose

O processo de apoptose é uma forma de morte celular programada que é necessária como um mecanismo complementar da proliferação celular para assegurar a homeostase dos organismos vivos. A apoptose contribui para a sensibilidade em geral de células a agentes quimioterapêuticos, tal como avaliado por ensaios *in vitro* ou baseado em tratamentos *in vivo* (ELMORE, 2007).

As células submetidas a apoptose apresentam características morfológicas e bioquímicas, que incluem a condensação da cromatina; perda de pontes citoplasmáticas, retração celular e surgimento de corpos apoptóticos. A fosfatidilserina, um fosfolípido incorporado na membrana plasmática, é exposto para o lado externo, age como meio de sinalização atraindo os macrófagos e as células são eficientemente fagocitadas (CHAABANE et al., 2013).

Existem dois mecanismos apoptóticos parcialmente interligados: apoptose clássica dependente de caspase e a forma programada independente de caspase, às vezes chamada necroptose. A apoptose clássica dependente de caspase pode ser iniciada por fatores extrínsecos ou intrínsecos (GALLUZZI et al., 2012).

- **Apoptose via extrínseca:** A morte celular por apoptose via extrínseca é desencadeada por sinais extracelulares, os quais sensibilizam receptores específicos na membrana plasmática responsáveis por propagar os sinais. Os principais ligantes envolvidos na iniciação destes sinais através de receptores de morte são: Fas-L (ligante de Fas), TNF- α (fator de necrose tumoral α) e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF) (CIRCU; AW, 2010).

- **Apoptose via intrínseca dependente ou independente de caspases:** Diversos fatores podem desencadear a via apoptótica intrínseca, como danos ao DNA,

estresse oxidativo, acúmulo de Ca^{2+} no citosol, aumento de proteínas mal enoveladas no retículo endoplasmático, entre outros. Embora os diferentes estímulos ativem uma cascata de sinalização celular, tanto de proteínas pró-apoptóticas (ex: BAK, BAX), quanto antiapoptóticas (ex: Bcl-2, Bcl-XL), a via intrínseca se caracteriza pelo envolvimento direto com a mitocôndria, por isso muitos autores denominam a via intrínseca, como via mitocondrial (INDRAN et al., 2011b). Como consequência das alterações na permeabilidade mitocondrial pode se verificar: (i) Dissipação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$), (ii) liberação de proteínas mitocondriais para o citosol, como é o caso do citocromo *c* e AIF (fator indutor de apoptose), entre outras, (iii) inibição da cadeia respiratória, agravando e amplificando os sinais de morte celular (KROEMER et al., 2009). Em alguns casos de apoptose via intrínseca, observa-se a dependência do envolvimento de caspases (confirmado por inibição farmacológica através do uso de inibidores químicos ou genética, através de RNAi), caracterizando assim a via intrínseca dependente de caspases. Já em outros casos, se observa eventos semelhantes aos citados acima, porém sem o envolvimento de caspases, caracterizando a via intrínseca independente de caspases (GALLUZZI *et al.*, 2012).

Na figura 1 pode-se observar a via proposta por Circu e Aw (2010), interligando a via apoptótica mitocondrial e a mediada por receptor de morte. Na via extrínseca os ligantes reconhecem seus respectivos receptores ativando a sinalização celular culminando na ativação do fator de transcrição NF- κ B. A ativação de NF- κ B por essa via aumenta a transcrição de proteínas anti-apoptóticas, como a FLIPL ou MnSOD, responsáveis pelo bloqueio da apoptose. Contudo, a via de morte celular via receptor de morte pode envolver a caspase-8, que pode ativar a caspase-3 ou ainda ativar a via mitocondrial. A via intrínseca da apoptose, com o envolvimento mitocondrial, pode ser desencadeada por diferentes fatores, como por exemplo; EROs, mediando a

permeabilização mitocondrial e liberação de proteínas pró-apoptóticas. No citosol, o citocromo *c* liberado, juntamente com Apaf-1 e ATP, formam o apoptossomo, um complexo que vai ser o responsável por ativar a caspase-9, que subsequentemente vai ativar a caspase-3. A via dependente de caspases ainda pode ser potencializada pela neutralização de inibidores de caspases por proteínas apoptogênicas como a Smac/Diablo e Omi/HtrA2, as quais são também liberadas da mitocôndria. A proteína AIF e a Endo G são cruciais na via independente de caspases, por mediar fragmentação do DNA.

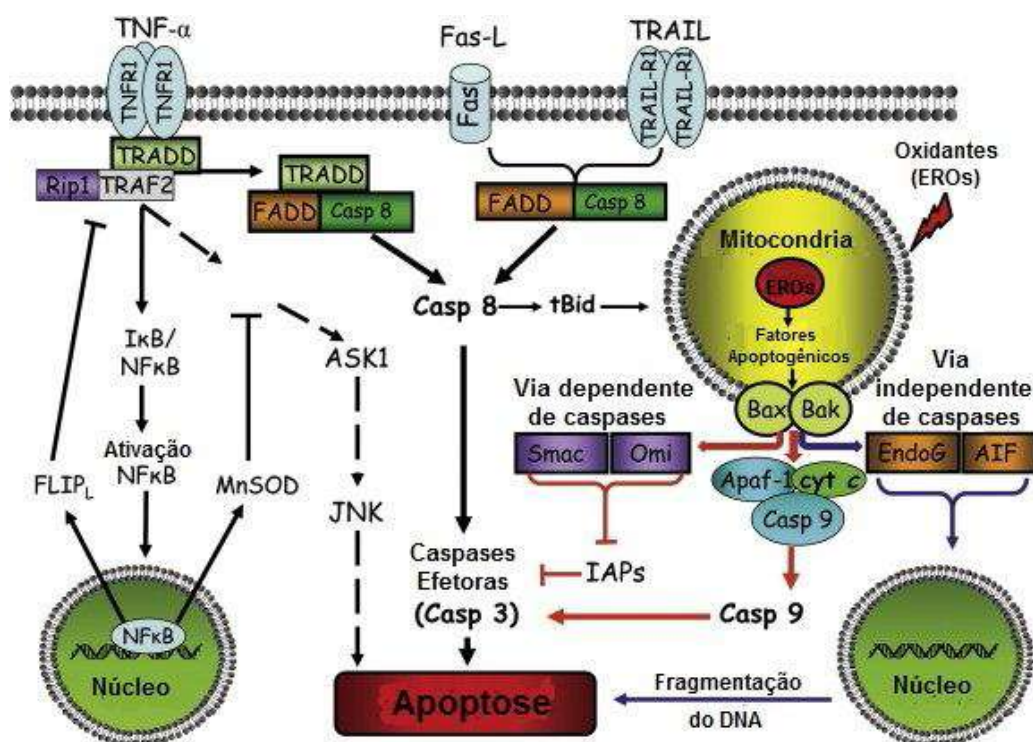


Figura 1 – Via apoptótica mediada por receptor de morte e via mitocondrial
 Fonte: Adaptado de CIRCUS;AW, 2010

2.2.2 Necrose

Durante muito tempo, a necrose foi considerada meramente como um mecanismo de morte celular acidental e foi definida pela ausência de características morfológicas de apoptose ou autofagia. Morfologicamente as células em processo de necrose exibem vacuolização citoplasmática, degeneração de organelas, danos aos lipídeos da membrana celular com o inchaço e ruptura, e indução da inflamação, devido à liberação de conteúdo celular (CHAABANE et al., 2013; DORN, 2013).

Hoje, sabe-se que a necrose pode ocorrer de uma forma regulada, sendo induzida por diferentes maneiras, como danos ao DNA; exotoxinas e ligação de moléculas aos receptores de morte, e pode ser controlada pela interação de diferentes vias de sinalização (FESTJENS; VANDEN BERGHE; VANDENABEELE, 2006; GOLSTEIN; KROEMER, 2007). A proteína que interage com receptor de morte (RIP), bem como o fator 2 associado ao receptor de TNF, são importantes reguladores da necrose celular induzida por receptores de morte (HE et al., 2009; HOLLER et al., 2000). Quando RIP é ativada, é translocada para a mitocôndria e promove o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e depleção de ATP (TEMKIN et al., 2006).

Outra via que reduz a produção de ATP em células com DNA danificado envolve a ativação da poli-ADP-ribose polimerase a qual depleta o cofator da glicólise NAD^+ (FOUQUEREL; SOBOL, 2008; YING et al., 2005). Como ilustra a figura 2, o subsequente aumento do conteúdo intracelular de cálcio e de espécies reativas de oxigênio promove a ativação de calpaínas, proteases citoplasmáticas, e de fosfolipase A2. A proteólise e a peroxidação das membranas que resultam da atividade dessas enzimas levam à permeabilização da célula e à morte por necrose (AMARAVADI; THOMPSON, 2007).

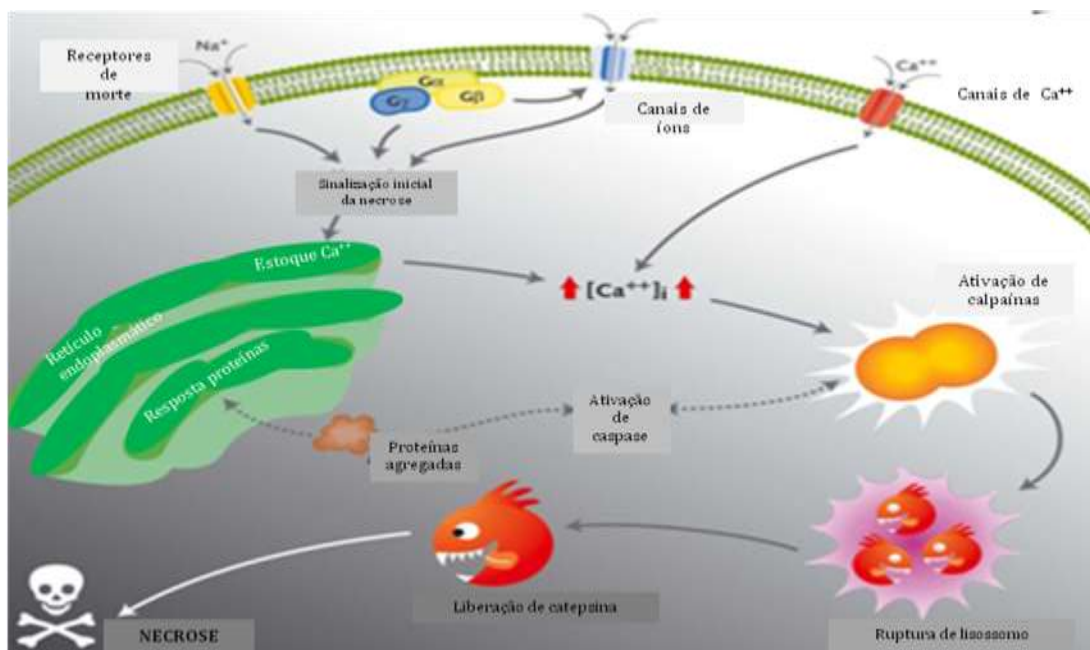


Figura 2 – Esquema simplificado da morte celular induzido por necrose.

Inicialmente danos causados por traumas (produtos químicos tóxicos, mecânico, térmico, hipóxia) ocasiona a perda da capacidade de regular o ambiente interno; influxo de Ca^{++} acompanhado de inchaço; alteração da atividade das proteína calpaína; catepsina; caspase, resulta na proteólise e a peroxidação das membranas que levam à permeabilização da célula e à morte por necrose.

Fonte: Adaptado de <http://drrajivdesaimd.com/wp-content/uploads/2013/12/necrosis-cascade-1.png> acesso 10.11.2015 as 17:08 h.

Apesar de se sobrepôr a apoptose em células submetidas ao tratamento com radiação ionizante e quimioterápicos, a necrose possui sistemas regulatórios e conseqüências diferentes da morte programada. Por exemplo, a resposta do sistema imune à necrose é bastante diferente daquela que ocorre em conseqüência da apoptose (GALLUZZI et al., 2012). Durante a necrose há liberação das chamadas alarminas, moléculas endógenas normalmente ausentes no meio extracelular (OPPENHEIM; YANG, 2005). As alarminas podem ser moléculas de RNA, DNA genômico, proteínas de choque térmico ou ácido úrico e recrutam macrófagos, células NK e dendríticas iniciando um processo inflamatório no sítio da necrose (ROCK; LAI; KONO, 2005). As células dendríticas, por sua vez, estimulam linfócitos T e a resposta imune adquirida (TRINCHIERI; SHER, 2007). A estimulação da resposta imune pode favorecer o controle do tumor. Entretanto, estudos com fármacos que interferem com estimuladores

das vias de necrose ainda não estão disponíveis, em parte devido à falta de marcadores moleculares de necrose de utilidade comprovada (AMARAVADI; THOMPSON, 2007).

2.2.3 Autofagia

Com base nas características morfológicas, o termo "morte celular autofágica" tem sido amplamente utilizado para indicar casos de morte celular que são acompanhadas por uma vacuolização massiva citoplasmática (SHIMIZU et al., 2014).

Brevemente, o processo autofágico envolve a formação de vacúolos ligados à membrana dupla citoplasmática denominados autofagossomas, que sequestram carga citosólica para enviar aos lisossomas. A via autofágica prossegue através de vários passos definidos: (i) a fase de iniciação que envolve a formação de uma membrana de isolamento ou fagóforo, (ii) o alongamento do fagóforo, (iii) a maturação de um autofagossomo com assimilação de uma carga citosólica, (iv) a fusão do autofagossomo maduro para o lisossoma, e, finalmente, (v) a fase de degradação, onde os conteúdos são digeridos por proteases lisossomais (por exemplo, catepsinas) outras enzimas hidrolíticas (RYTER; MIZUMURA; CHOI, 2014).

O mecanismo celular da autofagia está ilustrado na figura 3. O fagóforo inicia-se com uma estrutura denominada PAS ("Phagophore Assembly Site"). As proteínas envolvidas nesta etapa inicial são a PI3K III (fosfatidilinositol 3-cinase de classe III) também designada Vps34, beclina 1 (mAtg6), p150 (subunidade reguladora da Vps34) e mAtg14L, entre outras. O complexo formado pelas proteínas beclina 1, p150, Vps34 e Atg14L leva à formação de fosfatidilinositol-3-fosfato, o que resulta no local de nucleação do fagóforo (formação do PAS) (MURROW; DEBNATH, 2013). A partir do

PAS, ocorre reconhecimento dos materiais a incluir no fagóforo e segue-se a fase de alongamento (RAVIKUMAR et al., 2010).

O posicionamento do complexo beclina-1-p150-Vps34-Atg14L está sob o controlo de Ulk-1/-2 (mAtg1), mAtg13 e FIP200 (MURROW; DEBNATH, 2013). A proteína mTOR, é um regulador da fase de iniciação. mTOR é um inibidor da autofagia quando na forma ativada. Porém, em condições de ausência de nutrientes, mTOR é inibida, permitindo deste modo a ativação da proteína Ulk 1, o que conduz ao início do processo de autofagia (DERETIC, 2010).

A expansão da membrana autofágica é mediada pela interação inicial de Atg5 com Atg12, a qual de seguida interage com Atg10 e Atg7, conduzindo à formação do complexo Atg16L1. A Atg7 e Atg10, são também importantes para o recrutamento de outras proteínas para a membrana, tal como a LC3 (equivalente ao Atg8). Esta proteína (LC3) existe em duas formas, a LC3-I (citosol) e a sua derivada proteolítica LC3-II (membrana do fagóforo). Após a fusão do autofagossoma com o lisossoma, esta proteína é degradada (GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010).

Conforme mostra na figura 3, na fase de maturação, os autofagossomas movem-se ao longo de microtúbulos por meio do centro organizador dos mesmos, designado de MTOC (“microtubule organizing center”), responsável pela organização e direção dos microtúbulos, de vesículas e organelas. Sendo através da proteína motora - dineína, que este transporte se realiza (RAVIKUMAR et al., 2010). Os autofagossomas, formados aleatoriamente no citoplasma, fundem-se com organelas endossomais e lisossomais ou recebem intermediários produtores de lisossomas para formar um estado denominado anfissoma que, eventualmente, torna-se num organela pleno de atividade lítica denominado autolisossomas. Os autofagossomas fundem primeiro com endossomas e depois com lisossomas. A fusão ocorre por atuação de diversas proteínas, tais como

Rab7, SNAREs (“soluble NSF attachment protein receptors”), ESCRT (“endosomal sorting complex required for transport”) e proteínas Vps (“vacuolar protein sorting”) classe C. A proteína UVRAG recruta proteínas Vps da classe C e por via dessa interação ativa Rab7, promovendo a fusão com endossomas tardios e lisossomas. Na fusão também está envolvida Rubicon, uma proteína que interage com Becln1 (RAVIKUMAR et al., 2010).

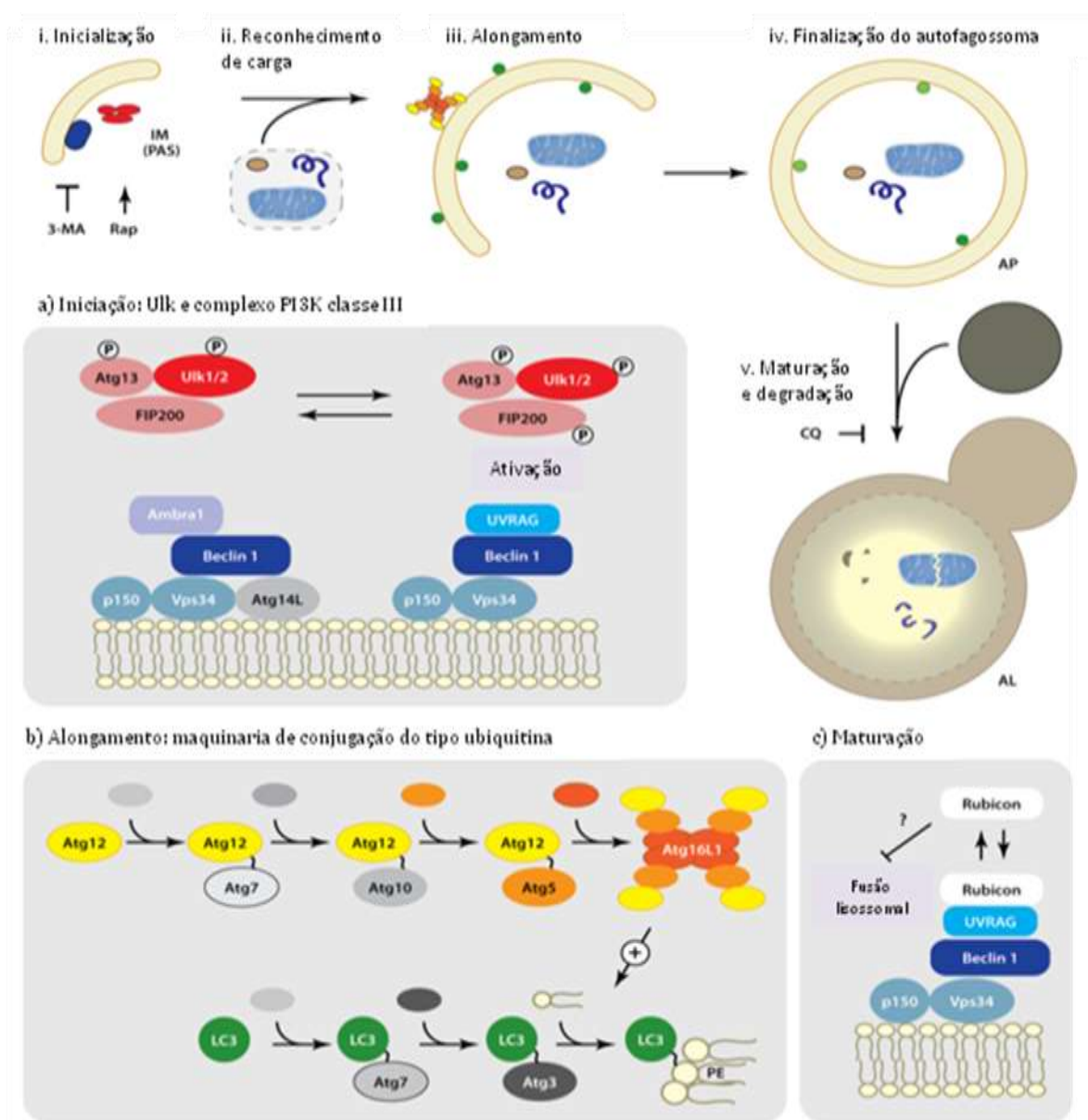


Figura 3 – Etapas gerais da autofagia

i) Iniciação ii) Reconhecimento de Carga iii) Alongamento iv) Finalização do autofagossoma v) Maturação a) Iniciação: Ulk e complexo PI3K classe III b) Alongamento: maquinaria de conjugação do tipo ubiquitina c) Maturação. Fonte: Adaptado de MURROW; DEBNATH, 2013.

Após observarem (*in vivo*) que a autofagia pode mediar à morte celular em certos organismos como *D. melanogaster* (NEZIS et al., 2010) e que a autofagia era responsável pela morte celular induzida por alguns quimioterápicos (*in vitro*), somado ao aparecimento de marcadores bioquímicos que caracterizam a via (ex: mutações ou RNAi de proteínas essenciais como AMBRA1, ATG5, ATG12 e beclina 1), hoje a autofagia é considerada um mecanismo de morte celular (GALLUZZI et al., 2012).

2.2.4 Catástrofe mitótica

Durante a última década, várias tentativas têm sido feitas para delinear as vias moleculares que levam a catástrofe mitótica. Ocasionalmente, os pesquisadores restringem empregar o termo para a morte celular que ocorre na mitose. Mais freqüentemente, refere-se a casos de morte celular que são acionadas e executadas por mitose aberrante, quer durante a mitose ou na subsequente interfase. Conforme ilustra a figura 4, brevemente, a catástrofe mitótica pode ser representada pelas seguintes fases: (i) é iniciada por perturbações do aparelho mitótico; (ii) é iniciado durante a fase M do ciclo celular; (iii) é acompanhada por algum grau de parada da mitose; e (iv), em última análise provoca a morte celular ou a senescência (GALLUZZI et al., 2012; KIMURA et al., 2013).

Do ponto de vista morfológico, as células apresentam alterações características podendo observar a presença de células gigantes, multinucleadas e com cromossomos descondensados. No entanto, características apoptóticas e necróticas também foram detectadas em tais células (SINGH; GEORGE; SHUKLA, 2010).

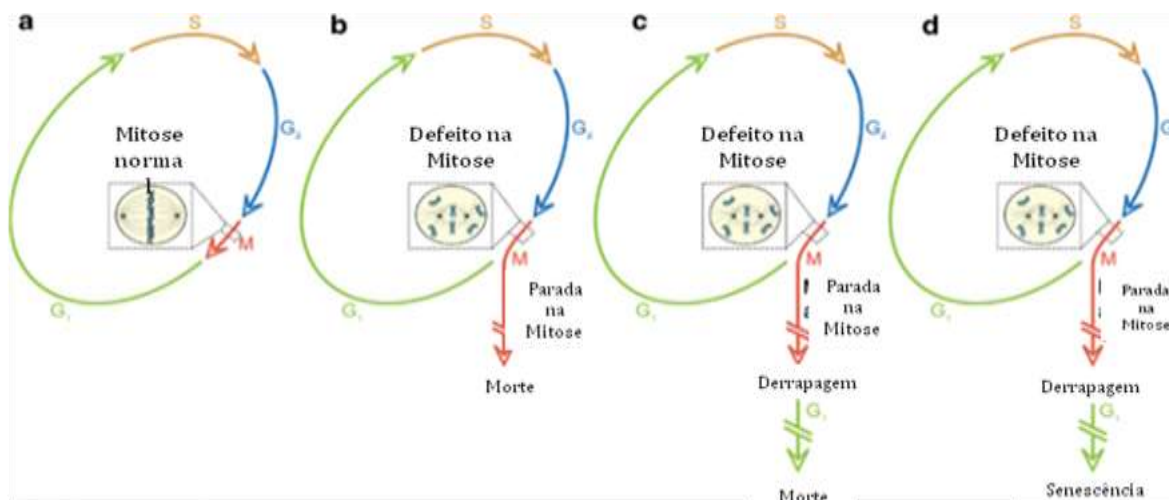


Figura 4 – Catástrofe mitótica

a) Na ausência de perturbações genéticas as células progridem por todas as fases do ciclo celular. Caso um defeito mitótico seja detectado: b) As células morrem sem sair da mitose, c) células sofrem parada da mitose, podendo sair (derrapagem mitótica) e ao chegar em G₁ morrem ou d) Entram em senescência. Fonte: Adaptado de GALLUZZI *et al.* 2012.

A catástrofe mitótica pode ocorrer após exposição a fármacos que induzem hiperpolimerização de microtúbulos, como os taxanos, ou que causam despolimerização, como os alcalóides vincristina e vimblastina. A catástrofe mitótica representa um dos principais mecanismos de morte celular associado à radioterapia. Além disso, a catástrofe mitótica pode resultar em morte celular por necrose (CHAN; KOH; LI, 2012; MANCHADO; GUILLAMOT; MALUMBRES, 2012).

Embora a apoptose represente o mecanismo predominante pelo qual as células cancerosas são eliminadas, outros modos de morte celular, tais como a necrose, autofagia e catástrofe mitótico também são considerados como resposta a morte celular às terapias citotóxicas. O que determina a forma da morte celular induzida por um agente anticâncer particular depende do tipo de célula, o genótipo da célula, o tipo de dano celular que a droga induz, a dose do agente utilizado, assim como o microambiente. Assim, uma melhor compreensão destes diversos tipos de morte celular na terapia do câncer pode levar a novas abordagens para superar o fenômeno de resistência aos medicamentos (JAIN *et al.*, 2013).

2.3 ALVOS CELULARES DE COMPOSTOS ANTITUMORAIS

2.3.1 Ciclo celular

A divisão celular ocorre por uma série de eventos bem elaborados, em que os cromossomos e outros componentes são duplicados e uniformemente distribuídos em duas células filhas. É um processo altamente ordenado e bem regulado, que provoca uma mudança irreversível e unidirecional no estado da célula (PINHEIRO; SUNKEL, 2012). Essas reações bioquímicas complexas ocorrem em um período de cerca de 24 horas, dependendo do tipo de célula, sendo denominado ciclo celular (GARAY et al., 2003). Este processo é dividido em quatro fases sequenciais: G1 (fase de crescimento 1), S (fase de síntese de DNA), G2 (fase de crescimento de 2) e M (mitose), que integram as vias de sinalização de crescimento e proliferação celular. A maioria das células normais, diferenciadas, e não divididas, está na fase G0, momento em que as células permanecem em um estado de repouso, latência ou quiescência. A fase G1 representa o período no qual a célula está se preparando para a síntese de DNA, e precede a fase de síntese (S). Nesta fase, ocorre a replicação dos cromossomos, resultando em uma fita recém sintetizada, exatamente complementar à matriz. Após a fase S, inicia-se a fase G2, momento em que é sintetizado o RNA e muitas proteínas necessárias para as duas células que serão geradas, bem como a preparação para a próxima etapa, a mitose (M). Na mitose ocorre a condensação dos cromossomos, formação dos fusos mitóticos e alinhamento dos microtúbulos e finalmente, a citocinese: separação das células recém formadas (GARRETT; WORKMAN, 1999). Em uma típica divisão celular eucariótica, a fase G1 dura aproximadamente 12 horas, a fase S de 6 a 8 horas, a fase G2 de 3 a 6

horas e a mitose cerca de 30 minutos, embora a duração exata de cada etapa varie com o tipo celular e com as condições de crescimento (GARAY et al., 2003).

Diferentes pontos de checagem (*checkpoints*), presentes no ciclo celular são os responsáveis pela progressão ou parada do ciclo (BERTHET; KALDIS, 2007). Na figura 5 podem-se observar os *checkpoints* e também o ponto de restrição “R”, localizado entre o meio e o final da fase G1, onde a célula confere se todos os sinais de crescimento necessários estão presentes e só então prossegue o ciclo celular para fase de replicação (fase S). Existem 3 checkpoints descritos: checkpoint de dano do DNA, que está apto a bloquear o ciclo celular nas fases G1, S, G2 e mitose; checkpoint de replicação do DNA, que monitora a progressão através da fase S; checkpoint do fuso mitótico (“mitotic spindle checkpoint”), que monitora a ligação dos cromossomos aos microtúbulos (GARRETT, 2001).

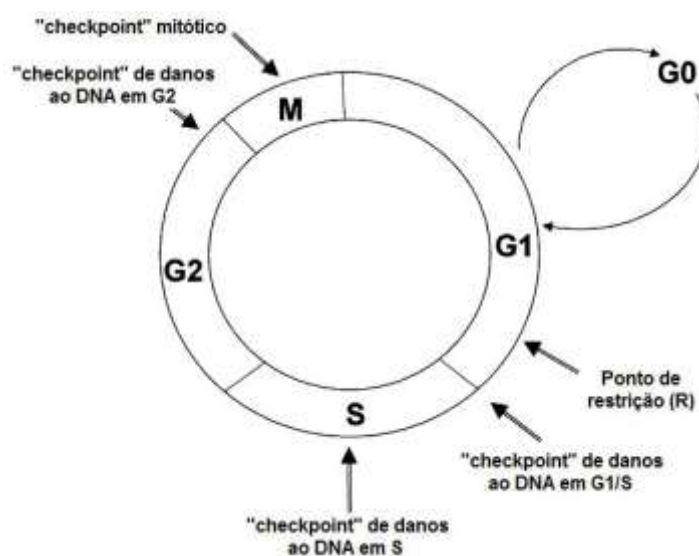


Figura 5 - Fases do ciclo celular

Diferentes pontos de checagem (*checkpoints*) presentes no ciclo celular são os responsáveis pela progressão ou parada do ciclo. Fonte: Adaptado de GARRETT, 2001.

A transição de uma fase do ciclo celular para outra ocorre de maneira ordenada e é regulada por diferentes proteínas celulares. As principais proteínas reguladoras são as quinases dependentes das ciclinas (CDKs), que correspondem a uma família de proteína

serina/treonina quinases ativadas em pontos específicos do ciclo celular. Os níveis de proteínas CDK permanecem estáveis durante o ciclo celular, em contraste com suas proteínas de ativação, as ciclinas. As ciclinas são sintetizadas e destruídas em períodos específicos durante o ciclo celular, regulando assim a atividade das quinases de uma forma conveniente. Como mostra a figura 6, as três ciclinas do tipo D (ciclina D1, ciclina D2 e ciclina D3) se ligam a CDK4 e CDK6, e os complexos CDK-ciclina D são essenciais para a entrada na fase G1. A ciclina E se associa com CDK2 para regular a progressão do ciclo da fase G1 para a fase S. A ciclina A se liga com CDK2 e esse complexo é necessário para a fase S. No final da interfase (fase G2), a ciclina A se complexa com CDK1 para promover a entrada na fase M. A mitose é ainda regulada pela ciclina B em complexo com CDK1 (MALUMBRES; BARBACID, 2009; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

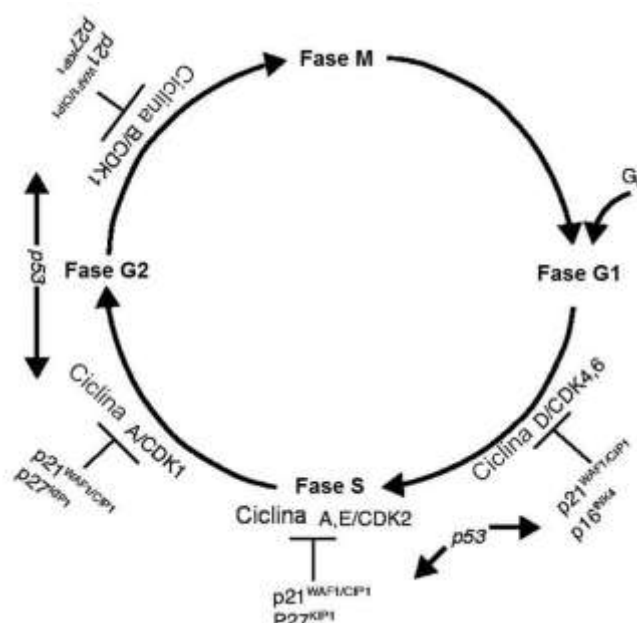


Figura 6 - Distribuição de ciclinas/CDKs nas diferentes fases do ciclo celular

Fonte: Adaptado de GARRETT, 2001.

As células tumorais frequentemente desregulam o ciclo celular e induzem divisões celulares não programadas, por conseguinte, a inibição do ciclo celular representa uma oportunidade para intervenção terapêutica no tratamento de doenças

proliferativas como o câncer (SENESE et al., 2014). Os esforços na pesquisa estão focados na identificação de compostos que interrompem os pontos de verificação do ciclo celular. Estas investigações incluem: (1) o desenvolvimento de inibidores químicos baseados na estrutura, design racional de medicamentos; (2) o uso de ensaio de rastreio de alto rendimento; e (3) a manipulação de tecnologias de rastreamento de origem genética para identificar novos tratamentos anticancerígenos (STEWART; WESTFALL; PIETENPOL, 2003).

Várias drogas que alvejam o ciclo celular entraram em ensaios clínicos. Estes agentes incluem o flavopiridol, indisulam, AZD5438, SNS-032, briostatina-1, seliciclib, PD 0332991, e SCH 727965. Estudos de fase I têm demonstrado que estas drogas podem geralmente ser administradas com segurança. Estudos de fase II têm mostrado pouca atividade do único agente em tumores sólidos, mas os estudos de combinação com quimioterapia citotóxica demonstram ser mais promissores. Estudos mostram que aspectos farmacodinâmicos como dose e cronograma dessas drogas são cruciais para permitir o efeito terapêutico máximo (CICENAS; VALIUS, 2011; DICKSON; SCHWARTZ, 2009; LE TOURNEAU et al., 2010; STONE; SUTHERLAND; MUSGROVE, 2012).

2.3.2 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e o estado Redox Celular

Radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados e são capazes de desencadear diversos danos ao organismo (WOJNÁROVITS, 2011). Entretanto, existem compostos que não são radicais livres e que também podem ocasionar danos oxidativos às estruturas biológicas. Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERNs) abrangem espécies radicalares como

o ânion superóxido, radical hidroxila e óxido nítrico ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , NO^{\bullet} respectivamente) e espécies não radicalares como peróxido de hidrogênio e peróxinitrito (H_2O_2 , $ONOO^{\bullet}$) (HALLIWELL, 2006).

A indução da morte em células tumorais pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um método direto, que está sendo empregado como uma estratégia anticâncer. A figura 7 ilustra três mecanismos existentes pelos quais EROs pode afetar uma célula. O primeiro mecanismo envolve danos celulares causados por EROs que são gerados como um subproduto de citotoxinas ou pela combinação com outro mecanismo primário que pode envolver um agente anticancerígeno (exemplo a cisplatina e a camptotecina). Neste caso as EROs produzidas durante o tratamento com cisplatina, assim como a ligação cruzada de cisplatina e DNA, provavelmente contribuem mas estas não são a causa primária para a indução da morte celular. O segundo mecanismo envolve a exposição a compostos que induzem a produção de uma pequena quantidade de EROs, sendo o estímulo suficiente para a ativação da via de indução da morte celular. O terceiro, mecanismo mais direto, ocorre quando macromoléculas são danificadas por EROs, como resultado da redução e oxidação de um composto, por exemplo menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona), no qual uma quantidade suficiente de EROs são gerados e armazenados intracelularmente, as moléculas antioxidantes são consumidas e as células não conseguem se recuperar dos danos induzidos por EROs (WELLINGTON, 2015).

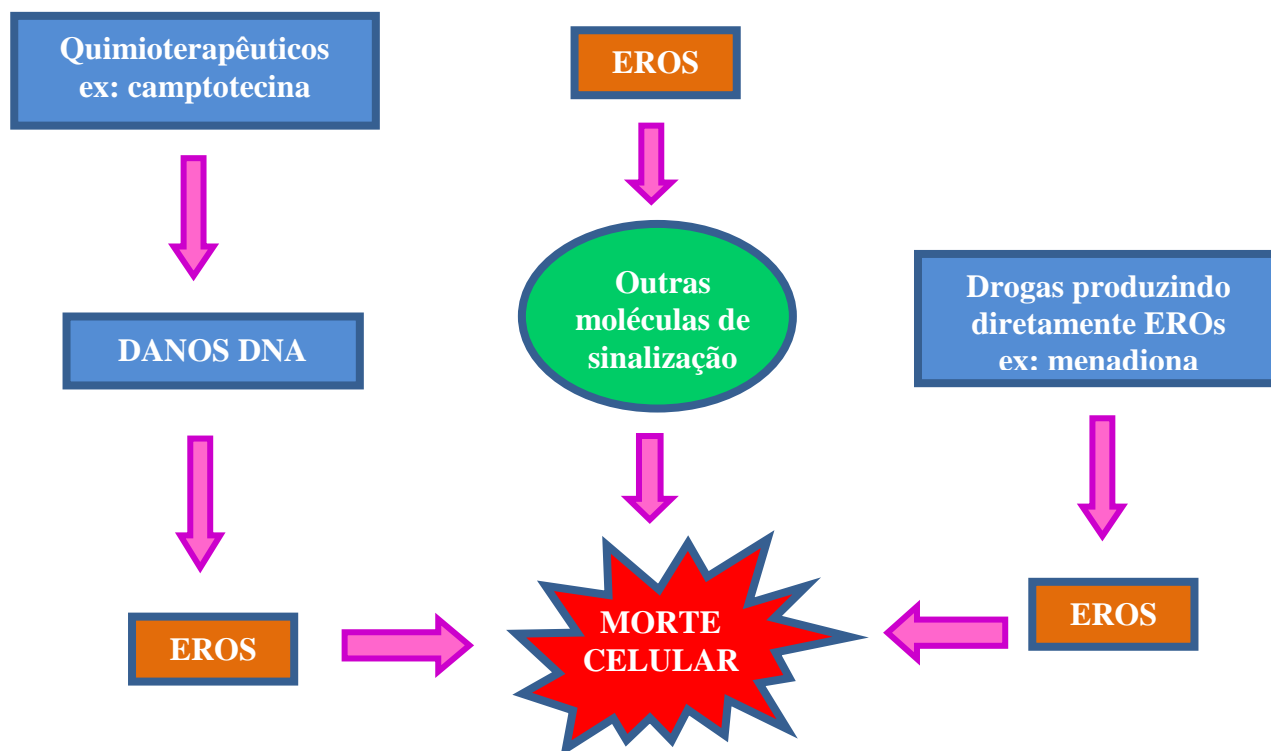


Figura 7 - Três mecanismos de morte celular induzido por EROs

Fonte: Adaptado de WELLINGTON, 2015

Estudos sobre o mecanismo de ação biológica das quinonas destacam a importância do grupo quinonoídico como grupo farmacofórico imprescindível para a geração de espécies reativas de oxigênio que induzem a apoptose (DA SILVA ET AL., 2003). Conforme ilustra a figura 8, as quinonas podem sofrer ativação biorredutora por duas vias, ou seja, pela redução de um ou de dois elétrons. A redução de um elétron de quinona forma um radical semi-quinona e uma redução de dois elétrons formam o radical hidroquinona. Ambos radicais podem ser reoxidados para a sua forma inicial quinona por intermédio do oxigênio molecular da formação de espécies reativas de oxigênio, formando desta forma um ciclo redox. Os anions de superóxido formados durante o ciclo redox são conhecidos por causar danos no DNA, peptídeos e proteínas. Uma vez que as células são incapazes de reparar esses danos a apoptose então é desencadeada. O ciclo redox pode ser facilitado por ação de enzimas redutases celulares

ou perda de elétrons a partir de mitocôndrias (SHRESTHA et al., 2015).

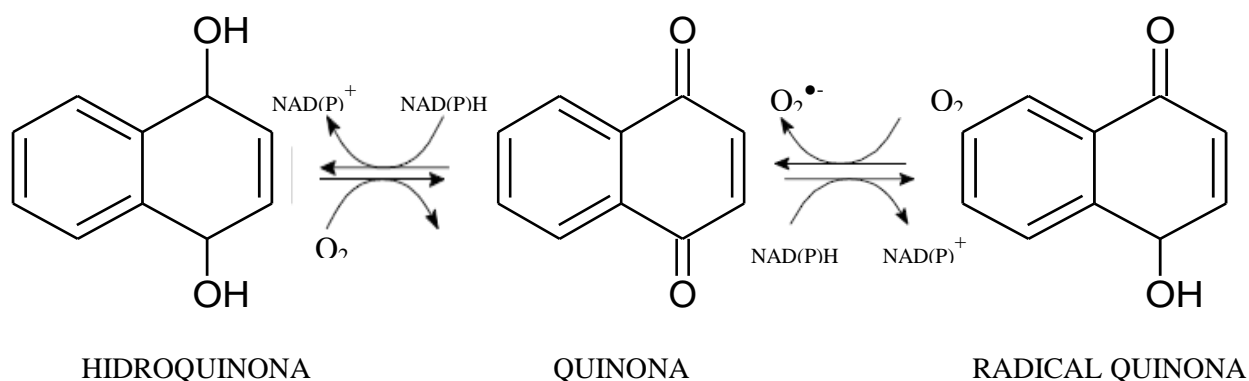


Figura 8 - Processo ciclo redox de quinona

Fonte: Adaptado de (JIMÉNEZ-ALONSO; GUASCH, 2011; WELLINGTON, 2015)

O controle da homeostase do estado redox celular é realizado principalmente por glutatona (GSH) e uma série de enzimas antioxidantes como: superóxido dismutase (SOD) (que catalisa a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ em O_2 e H_2O_2), catalase (que decompõe o peróxido de hidrogênio), glutatona redutase (que reduz a glutatona dissulfeto (GSSG) para a forma sulfidril (GSH)), glutatona peroxidase (GPx) (que promove detoxificação de peróxidos), tioredoxina (Trx) (que reduz pontes dissulfeto), entre outras (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004; LAU; WANG; CHIU, 2008). Apesar de vários sistemas de defesa estar envolvidos na manutenção do estado redox celular, em algumas situações, não são suficientes para equilibrar o sistema, sendo que nesses casos onde a formação de EROs é maior que a capacidade das defesas celulares, observa-se um quadro de estresse oxidativo (LAU; WANG; CHIU, 2008).

Em sistemas onde ocorre uma persistência do ciclo redox, ou então faltam mecanismos de proteção, há aumento intracelular dos oxidantes $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , promovendo a danificação de componentes celulares vitais como as membranas, através da peroxidação dos lipídios e a diminuição da capacidade antioxidante celular. Em

resumo, uma série de processos como a indução da apoptose e os danos provocados pelo estresse oxidativo estão entre os principais efeitos que as quinonas induzem em sistemas biológicos (DA SILVA *et al.*, 2003).

De fato, uma abordagem terapêutica usando agentes pró-oxidantes para o tratamento do câncer pode ser promissora, no qual muitas estratégias têm sido exploradas baseadas nessa ideia. Pode-se explorar o potencial de EROs em induzir morte em células tumorais de duas maneiras: indução na geração de EROs diretamente nas células tumorais ou pela inibição de sistemas de defesa antioxidante (enzimático) nas células tumorais. Desta forma, o uso de agentes moduladores dos níveis de EROs tem aumentado consideravelmente (REUTER *et al.*, 2010; WANG; YI, 2008).

Vários medicamentos antineoplásicos que são atualmente utilizados para quimioterapia do câncer induzem altos níveis de estresse oxidativo. Drogas tais como taxanos, alcalóides de vinca e antimetabolitos (anti-folatos) promovem a liberação de citocromo c das mitocôndrias - que induz a morte celular - e também interfere com a cadeia de transporte de elétrons, resultando na produção de radicais superóxido. Outras drogas, tais como complexos de platina (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina) e antraciclinas (doxorrubicina, epirrubicina e daunorrubicina) geram níveis extremamente elevados de EROs. Por exemplo, a doxorrubicina penetra na membrana interna de mitocôndrias cardíacas e compete com a coenzima Q10 na cadeia de transporte de elétrons para induzir a produção do radical superóxido, que é a base da cardiotoxicidade destas drogas. O trióxido de arsênio (As_2O_3) foi utilizado de forma eficiente para o tratamento de leucemia promielocítica aguda. Induz a morte celular por apoptose em vários tipos de câncer, incluindo leucemia, mieloma e câncer de pulmão através da indução de EROs. 5-fluorouracilo (5-FU) gera EROs mitocondrial através de uma via dependente de p53. As células tumorais que se adaptam ao estresse oxidativo,

umentando a produção de SOD2, peroxiredoxina 1 e proteínas antiapoptóticas como a BCL-2 tornaram-se resistentes ao 5-FU (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013).

A atividade anticancerígena e pró-oxidantes de derivados de quinona têm sido documentadas em diversos estudos, mas o papel potencial no ciclo redox pela produção de EROs não é sempre estabelecida. Por exemplo, a atividade anticâncer do derivado de naftoquinona plumbagina parece resultar da formação de EROs que induz a ativação das vias de morte celular, incluindo a inibição da topoisomerase II seguido por quebras na cadeia de DNA e a indução de apoptose. Da mesma forma, shikonina, outra naftoquinona natural, induz estresse oxidativo apoptogênico em células de hepatoma humano; por ativação de EROs dependente da via JNK relacionadas com o stress e subsequente disfunção mitocondrial, liberação de citocromo c, ativação de caspases e a apoptose foram observados em células de LMC (WONDRAK, 2009).

2.4 NAFTOQUINONAS COMO NOVOS AGENTES ANTITUMORAIS

Os primeiros relatos da utilização pelo homem de extratos de plantas que possuem naftoquinonas datam do antigo Egito (cerca de 4000 anos). O extrato da folha de *Lawsonia inermis* L., popularmente conhecida como Mehndi ou Henna era empregado como “cosmético”. Alguns anos depois, o extrato também passou a ser utilizado no tratamento de micoses e feridas (SINGH; LUQMAN, 2014).

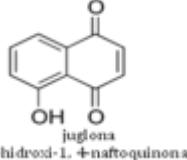
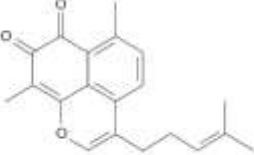
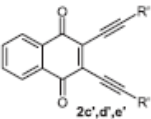
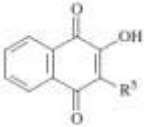
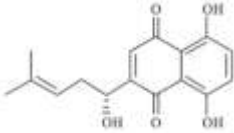
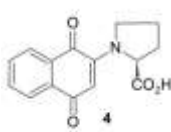
A fitoquímica de henna foi amplamente estudada e revelou informações interessantes. Em 1920 o princípio do corante foi conhecido, a lausona, $C_{10}H_6O_3$, constituía o composto contido nas folhas de henna, que se fixava na lã, seda e na pele. Em 1973, quatro frações com atividade antibacteriana foram isolados por cromatografia em camada fina do extracto de etanol de folhas *Lawsonia inermis* dos quais foram

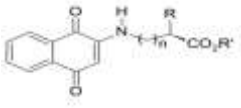
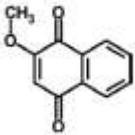
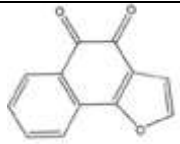
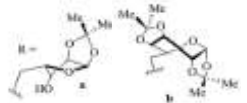
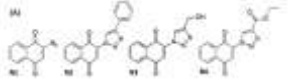
identificados o ácido gálico, lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) (I) e 1,4-naftoquinona (EL BABILI, 2013). Vale ressaltar que o nome desse composto é ácido henotânico, os fitoquímicos passaram a denominar de lausona devido a sua origem. A lausona é utilizada como um material de partida na síntese de uma variedade de compostos que apresentam em sua estrutura molecular o anel naftoquinononico (SINGH; LUQMAN, 2014).

Do ponto de vista estrutural as quinonas podem ser divididas em vários grupos por suas diferenças moleculares, usando-se como critério o tipo de anel quinonoídico: benzoquinonas – um anel benzênico, naftoquinonas – um anel naftalênico; antraquinonas – um anel antracênico linear ou angular. Em decorrência de diferentes arranjos isoméricos, pode-se ter com um mesmo anel e com carbonilas em diferentes posições, diferentes quinonas. Estas formas isoméricas diferem muito em suas propriedades físicas, químicas e quanto a sua atuação biológica. Numa observação mais apurada sobre a importância das quinonas, pode-se citar o grande número de drogas neste grupo que possuem aplicações práticas reconhecidas, algumas, inclusive, chegaram à produção industrial, como por exemplo, antraciclina, daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina, mitoxantrone, e saintopina, todos os quais são utilizados na terapia clínica de tumores sólidos (DA SILVA ET AL., 2003; KOYAMA; MORITA; YAMORI, 2010).

A seguir no quadro 2 serão descritos resumidamente estudos mostrando a ação de naftoquinonas no combate ao câncer.

Quadro 2: Estudos publicados evidenciando a ação naftoquinonas como agentes antitumorais.

	Estrutura química	Resultados	Referências
<i>Juglona</i> 5-hidroxi-1, 4-naftoquinona	 <p style="text-align: center;">juglona 5-hidroxi-1, 4-naftoquinona</p>	Redução na sobrevivência de células tumorais de melanona com um aumento nos níveis de lactato desidrogenase. Aumento de células binucleadas micronúcleos indicando o potencial de juglona induzir danos citogênicos. Além disso, os resultados do estudo de micronúcleos indica atraso na divisão de células em proliferação, mostrando diminuição na citocinese. A apoptose e a necrose induzida por juglona pode ser demonstrada pelo aumento da percentagem de Anexina V / PI. A diminuição dos níveis de glutatona e aumento de diclorofluoresceína confirmou a capacidade de juglona em gerar espécies reativas de oxigênio intracelulares.	(KIRAN AITHAL et al., 2009)
<i>Biflorina</i> 5,7-dihidroxi-2-metil-6-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]cromen-4-one		Biflorina apresenta potencial citotóxico, com valores de CI50 de 0,58 µg/mL e 14,61 µg/mL em células NCI H23 e MDA-MB-231, respectivamente. Em células B16, biflorina reduziu a viabilidade celular, mas não provocou qualquer aumento significativo no número de células não viáveis. Além disso, a síntese de DNA foi inibida significativamente. A análise por citometria de fluxo mostrou que a biflorina pode levar a uma morte por apoptose, induzir a fragmentação de DNA e despolarização mitocondrial, sem afetar a integridade da membrana. <i>In vivo</i> , a administração de biflorina (25mg / dia) durante 10 dias diminuiu o crescimento do tumor, e também aumentou a taxa de sobrevivência médio dos animais.	(VASCONCELLO S et al., 2011)
2,3-dieno-1,4-naftoquinona e derivados	 <p style="text-align: center;">2c', d', e'</p>	Foram sintetizados dozes derivados de 2,3-dieno-1,4-naftoquinona. Os dienos foram avaliados como potenciais agentes citotóxicos contra três linhagens de células tumorais: OVCAR-8, PC-3M e NCI-H358M, com CI ₅₀ menores de 10 µM para todas as linhagens testadas. Estes resultados são significativos para estudos contínuos de citotoxicidade nesta classe de compostos bioativos.	(SILVA et al., 2013)
<i>Lapachol</i> (2-hidroxi-3-isopentenil-1,4-naphthoquinona) e derivados	 <p style="text-align: center;">R³ = geranyl, styryl, benzyl</p>	Uma série de 17 derivados de 1,4-naftoquinonas semi-sintéticos e naturais foram sintetizados e a sua atividade antiproliferativa foi avaliada <i>in vitro</i> . Os compostos foram testados em seis linhagens tumorais de câncer humano (U373; A549; Hs683; SKMEL-28; PC3 e LoVo), utilizando o ensaio colorimétrico de MTT. Os dados revelaram que dos compostos em estudo apenas o lapachol, o seu acetato e 3-geranillausona apresentaram maior potencial citotóxico, com de valores de IC ₅₀ médios que variaram de 15 a 22 µM.	(FIORITO et al., 2014)
<i>Shikonina</i> 5,8-diidroxi-2-(1-hidroxi-4-metil-3-enil-naftaleno-1,4-diona		Após o tratamento com 1 µmol / L, durante 48 h e 2,5 e 5 µmol / L de shikonina para 24 e 48 h, a viabilidade das células BXP-3 foi reduzida significativamente. A expressão da proteína de LC3-II / LC3-I foi aumentada, enquanto a expressão das proteína p62, PI3K, AKT, p-PI3K e P-Akt estava diminuída. Estes resultados sugerem que shikonina promove autofagia em células BXP-3 e que o mecanismo subjacente pode estar associada com a via de sinalização da via PI3K / Akt.	(SHI; CAO, 2014)
2-amino-naftoquinona e derivados	 <p style="text-align: center;">4</p>	A citotoxicidade de uma série de aminonaftoquinonas resultante da reação de aminoácidos com 1,4-naftoquinona foi avaliada nas seguintes linhagens tumorais: SF-295 (glioblastoma), MDAMB-435 (mama), HCT-8 (côlon), HCT-116 (côlon), HL-60 (leucemia), OVCAR- 8 (ovário), NCI-H358M (carcinoma do pulmão broncoalveolar) e PC3-M (próstata) e também em PBMC (células mononucleares do sangue periférico). Cinco dos compostos exibiram elevada citotoxicidade e seletividade contra as linhagens tumorais (IC ₅₀ = 0,49 a 3,89 µg · mL ⁻¹). O	(DE MORAES et al., 2014)

		composto 2-amino-naftoquinona foi o menos tóxicos para PBMC, com IC ₅₀ de 1,5 a dezoito vezes maior (IC ₅₀ = 5,51 µg a 17,61 · mL ⁻¹). O mecanismo de citotoxicidade e as relações estrutura-atividade permanecem como um alvo para investigações futuras.	
<i>2-metoxi-1,4-naftoquinona</i>		Em ensaios de invasão, houve diminuição do número de células que permeiam através de uma barreira de Matrigel. Nos ensaios de migração para cicatrização de feridas, exibiram inibição da migração celular em que foi observada redução significativa na zona de fecho, em comparação com controles não tratados. Além disso, a atividade proteolítica da metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9) foi também regulada negativamente como determinado por zimografia.	(LIEW et al., 2014)
<i>Furano-1,2-naftoquinona</i>		Citotoxicidade com parada do ciclo celular em G2 / M e apoptose em células Ca9-22. A parada do ciclo celular foi correlacionada com uma diminuição marcada na expressão dos níveis de ciclina A e ciclina B, e de CDK 1 e 2 (ativador quinases dependentes de ciclina) com a indução concomitante de p27. A apoptose induzida por foi acompanhada por regulação de Bax e Bad, e a regulação negativa da proteína Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, e inibidor de apoptose (XIAP), resultando na liberação de citocromo C e a ativação sequencial de caspase 9 e caspase-3.	(LIN et al., 2014)
<i>Naftoquinonas glicoconjugadas</i>		Uma nova série de naftoquinonas à base de hidratos de carbono foi sintetizada e avaliada quanto à citotoxicidade em diferentes linhagens tumorais. Os compostos derivados de 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (juglona) apresentaram melhores perfis de citotoxicidade do que o composto original nas células HCT-116, A-549 e MDA-MB 435. Os resultados sugerem que o grupo hidroxilo no anel aromático aumentou a atividade pró-oxidante destes novos derivados de naftoquinona. Além disso, descobriu-se que os derivados eram mais ativos em células de melanoma (MDA-MB435) do que o agente anticancerígeno clinicamente útil doxorubicina.	(CAMPOS et al., 2015)
<i>Novos derivados de 1,4 naftoquinona</i>		Avaliação da citotoxicidade e seletividade de 4 derivados 2,3-triazole-1,4-naftoquinona (N1-N4) nas linhagens CRC, HT-29 e células humanas normais. O ensaio de MTT mostrou que N1, N2, N3 e N4 induziram uma potente ação citotóxica, apresentando valores de IC ₅₀ de 40,6±1,0; 100,1±1,0, 241,9±1,2 e 101,9±1,1, respectivamente. Posteriormente, células HT-29 carregadas com iodeto de propídio (5 µM), indicou a capacidade de N4 em induzir danos na membrana celular. Realizaram-se experiências de imagiologia de cálcio em células HT-29 carregadas com 5 µM Fluo-3 / AM para avaliar Ca ²⁺ intracelular. Os dados demonstraram que N4 induz um rápido e forte aumento de iCa ²⁺ em células HT-29, mediada por tensão-fechada L-tipo de canais de tivação de Ca ²⁺ .	(GONÇALVES et al., 2016)

A 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) -diona (CNFD) uma naftoquinona furano sintetizada a partir da 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (Lausona), foi produzida pelo grupo de pesquisa do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense-UFF. Estudos pioneiros de avaliação da atividade antifúngica da CNFD demonstram que este composto exibe significativa ação contra seis espécies de *Candida sp.* isoladas da cavidade oral de pacientes com próteses removíveis (FREIRE et al., 2010). Ferreira e seus colaboradores (2014) também observaram que CNFD apresenta importante atividade antifúngica contra dermatófitos e leveduras do gênero *Cryptococcus sp.* Além disso, foi relatado que a CNFD exibiu atividade hemolítica significativa contra eritrócitos de rato, porém não apresentou citotoxicidade em fibroblastos humanos (FREIRE et al., 2010)

Geralmente as naftoquinonas são utilizadas como compostos modelo para o desenvolvimento de quimioterápicos, sendo assim, inúmeros estudos de identificação e avaliação de novos fármacos vêm sendo realizados com compostos que possui em sua estrutura a porção quinona (DA SILVA ET AL., 2003; MALLAVADHANI et al., 2014; SACAU et al., 2003). Apesar dos relatos comprovarem a atividade antifúngica exercida pela CNFD, não foram identificados ainda na literatura estudos envolvendo seu potencial antitumoral. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade citotóxica da CNFD e os possíveis mecanismos envolvidos na morte celular.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Investigar o potencial antitumoral de 6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) -diona (CNFD) em modelos *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Avaliar a citotoxicidade em linhagens tumorais humanas e murina e linhagem não tumoral humana
- ✓ Analisar parâmetros relacionados ao mecanismo de morte celular,
- ✓ Avaliar o efeito de CNFD sobre a motilidade celular
- ✓ Verificar a modulação nos níveis de EROs
- ✓ Avaliar a modulação da expressão de genes relacionados à carcinogênese
- ✓ Avaliar a toxicidade e o efeito de CNFD sob o desenvolvimento neoplásico em modelo experimental de melanoma subcutâneo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma experimental

O trabalho foi executado conforme o fluxograma experimental da figura 9:

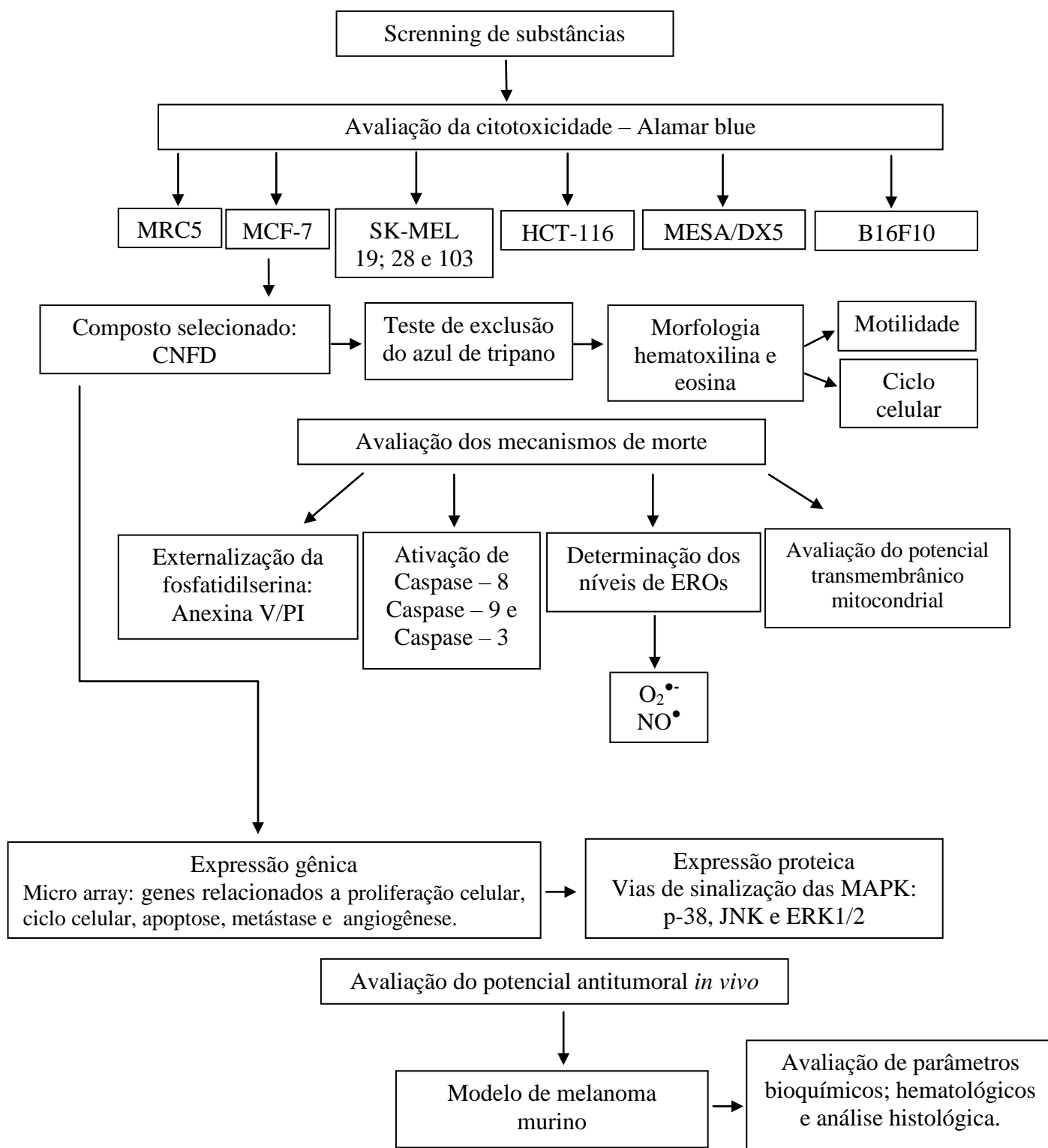


Figura 9 - Delineamento experimental do presente estudo

4.2 Obtenção da droga

A síntese de CNFD foi realizada conforme descrito por Freire e seus colaboradores (2010) e publicada no artigo “Synthesis and biological evaluation of substituted α - and β -2,3 dihydrofuran naphthoquinones as potent anticandidal agents”. De acordo com a publicação, a síntese da naftoquinona foi preparada a partir da Lausona prontamente disponível e olefinas na presença de cério (IV) e nitrato de amônio (CAN), sendo realizada em uma única etapa. Resumidamente, os compostos (furano naftoquinona) foram obtidos por oxidação, ciclo-adição de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (Lausona) para o alceno, mediada por cério (IV) e CAN (Figura 10). Todos os compostos foram obtidos com bons rendimentos (10-86% dos isolados de produtos) e foram completamente caracterizados por espectroscopia de próton e carbono, ressonância magnética nuclear, espectroscopia de infravermelho e análise elementar.

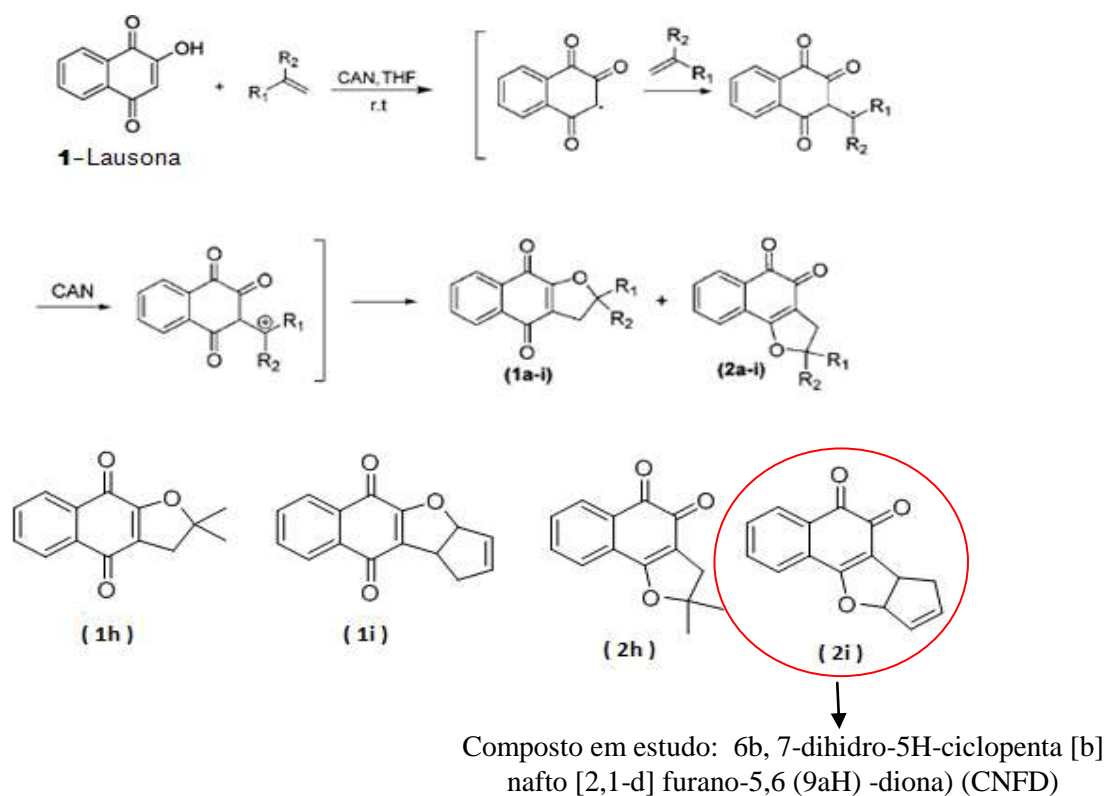


Figura 10 - Via de síntese utilizada para a preparação de α - e β -2,3 furano naftoquinonas.
Fonte: FREIRE et al., 2010.

4.3 Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram mantidas em garrafas de polipropileno, contendo meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco by Life Technologies) e 50 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco by Life Technologies), em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio ótico invertido e a troca do meio de cultivo ocorreu sempre que o limite de confluência das células fosse alcançado, ou houvesse necessidade de repor nutrientes. Para a manutenção das linhagens, foi utilizada solução de tripsina EDTA a 0,25% (Gibco by Life Technologies) para destacar as células das garrafas de cultura.

4.4. Avaliação do potencial citotóxico *in vitro*

4.4.1 Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue®

A avaliação da atividade citotóxica de CNFD foi realizada em diferentes linhagens tumorais humanas: melanoma humano (SK-MEL 19, 28 e 103), melanoma murino (B16F10) carcinoma colorretal humano (HCT 116); adenocarcinoma de mama humano (MCF-7); sarcoma uterino humano resistente a doxorrubicina (MESA/Dx5), e uma linhagem de fibroblastos humanos (MRC5).

O ensaio de Alamar Blue® foi realizado segundo metodologia descrita por Ahmed e seus colaboradores (1994). As células foram semeadas na concentração de 5×10^3 células/poço em microplacas de 96 poços. A fim de determinar os valores de

CI₅₀, as células foram tratadas com a CNFD nas concentrações que variaram de 0,312 - 10 µM (triplicata). O grupo controle recebeu 0,2% de Dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. A doxorubicina foi usada como controle positivo para todas as linhagens tumorais e o paclitaxel foi utilizado apenas para a linhagem MCF-7. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, 10 µL da solução de Alamar Blue[®] 0,4% foi adicionado em cada poço da placa e após 2h de exposição à fluorescência foi medida em leitor de microplaca (DTX800 Beckman e Coulter). A determinação do valor de CI₅₀ (índice de citotoxicidade que causa a morte celular de 50%) foi realizada por teste de regressão não-linear através do software GraphPad Prism 6.0.

- Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, indicando o potencial uso deste composto em testes clínicos. Assim, neste estudo, o IS corresponde à divisão entre o valor da CI₅₀ do composto-teste (CNFD) na linhagem de células normais MRC-5 e o valor da CI₅₀ do composto na linhagem de células neoplásicas ($IS = CI_{50} \text{ MRC-5} / CI_{50} \text{ células neoplásicas}$). Foi considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990), ou seja, este valor significa que o composto é duas vezes mais ativo na linhagem de células neoplásicas do que em células normais.

4.4.2 Avaliação da citotoxicidade pelo método de exclusão de azul de tripano

A avaliação da viabilidade de células MCF-7 foi realizada conforme descrito por Tennant (1964), com a finalidade de confirmar o efeito antiproliferativo de CNFD,

pelo método de exclusão do corante azul de tripano. Neste ensaio, células da linhagem MCF-7 (7×10^4 células/mL) foram tratadas com a CNFD nas concentrações de 1, 3 e 10 μM . Após o período de incubação de 12, 24 e 48 horas, as células foram tripsinizadas e retirada uma alíquota de 90 μL de suspensão celular na qual foi adicionado 10 μL do corante azul de tripano 0,4%. Em seguida, a contagem das células foi realizada levando em consideração a exclusão do tripano por células viáveis, em câmara de Neubauer, por meio de microscópio ótico (Olympus CX41). O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO a 0,2%) utilizado para diluir a substância testada. Foi utilizado paclitaxel (3 μM) como controle positivo, pois trata-se de um agente quimioterapêutico clinicamente útil devido à sua elevada citotoxicidade e vasto uso para induzir apoptose com elevada reprodutibilidade dos resultados. A porcentagem de células viáveis foi determinada em relação ao controle não tratado.

4.4.3 Análise morfológica pela coloração por hematoxilina e eosina

O estudo da morfologia celular foi realizado segundo metodologia descrita por Wang e seus colaboradores (2009). As células foram semeadas em placas de 24 poços (7×10^4 células/mL). Após 24 horas, as células foram tratadas com CNFD nas concentrações de 1, 3 e 10 μM . Após o período de incubação de 24 e 48 horas as células foram tripsinizadas e uma alíquota (100 μL) de cada amostra foi citocentrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. A fixação das células foi realizada com metanol por 1 minuto, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina. As alterações morfológicas foram analisadas por microscopia óptica (Eclipse Ni, Nikon) utilizando o software Nis-Elements 4.30.01 (Nikon).

4.4.4 Avaliação da motilidade celular pelo método cicatrização de feridas

O ensaio de cicatrização de feridas foi realizado como descrito por Liang et al. (2007). Resumidamente, as células MCF-7 foram semeadas em placas de 12 poços (4×10^5 células por poço) e incubadas overnight para permitir que as células aderissem à superfície da placa. Com uma confluência celular de 80%, fez-se um raspado em linha reta na monocamada confluyente de células utilizando uma ponta de pipeta de plástico de 200 μ l estéril. Para remover os detritos e alisar o bordo do arranhão, as células foram lavadas com 2 mL de DMEM isento de soro. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações não citotóxicas de CNFD (0,1; 0,5 e 1 μ M). As células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. As imagens foram recolhidas a 0, 6, 24 e 48 h após o arranhão, capturadas a uma ampliação de $\times 100$ utilizando uma microscopia óptica (Axiovert.A1, Carl Zeiss). A quantificação de áreas não cobertas foi realizada usando o software Zen 2 (Carl Zeiss).

4.4.5 Avaliação do ciclo celular

A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o PI (iodeto de propídio) como agente fluorogênico, conforme descrito por Krishan (1975). As células MCF-7 foram privadas de SFB durante 24 h para a sincronização do ciclo celular. Após tratamento com 1, 3 e 10 μ M de CNFD durante 24 e 48 h, as células foram colhidas numa solução de permeabilização contendo 0,1% de triton X-100 (SigmaAldrich), 2 μ g/mL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich Chemical), 0,1% de citrato de sódio e

100 µg/mL de RNase (Sigma-Aldrich) e incubadas no escuro durante 15 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, a fluorescência celular foi determinada por citometria de fluxo no equipamento BD LSRFortessa (BD Biosciences) utilizando o software BD FACSDiva (BD Biosciences) e analisado pelo Flowjo10 (Flowjo LCC). Dez mil eventos foram avaliados por experimento e os detritos celulares foram omitidos da análise.

4.4.6 Avaliação do tipo de morte celular – Externalização de fosfatidilserina

A avaliação do perfil de morte celular (apoptose / necrose) foi realizada pela técnica de citometria de fluxo utilizando o kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences), no qual foram executadas todas as recomendações exigidas pelo fabricante. Resumidamente, as células tratadas foram recolhidas após o tempo indicado, lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas em 300 µL de tampão de ligação. Em seguida, adicionou-se 5 µL de tampão de coloração com anexina V-FITC e 5 µL de iodeto de propídio. A mistura foi incubada no escuro a 37° C durante 15 minutos. A fluorescência celular foi determinada por citometria de fluxo no citômetro BD LSRFortessa utilizando o Software BD FACSDiva e analisado pelo software Flowjo10. Dez mil eventos foram avaliados por experiência e os detritos celulares foram omitidos da análise

4.4.7 Avaliação da atividade de caspases

A atividade das caspase 8 e 9 foram avaliadas pelo kit colorimétrico de protease (Merck Milipore) e foram seguidas todas as recomendações do fabricante. As

células MCF7 ($1,5 \times 10^6$) foram tratadas com a CNFD nas concentrações de 1, 3 e 10 μM durante 24 horas. Posteriormente, as células foram coletadas e sedimentadas por centrifugação a 17000 G por 5 minutos e ressuspensas em 100 μL de tampão de lise. O lisado celular foi incubado em gelo durante 10 minutos antes da centrifugação (17000 G, 10 min). 50 μL de cada lisado celular foram acondicionados em placas de 96 poços, no qual em seguida foram adicionados 20 μL do tampão de uso (5x), 20 μL de água destilada e 10 μL do substrato (Ac-IETD-pNA) para a análise da caspase 8 e do substrato (Ac-LEHD-pNA) para a análise da caspase 9. Em seguida, a reação foi mantida a 37°C por 2 horas, e o produto foi medido a 405 nm no leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices). Além disso, foi realizada a dosagem de proteínas no lisado celular utilizando o método de Bradford. Os resultados foram expressos em % de atividade/ mg de proteína.

4.4.8 Determinação dos níveis de EROs usando DCF-DA (2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato)

A determinação dos níveis de EROs pela sonda DCF-DA foi realizada conforme metodologia descrita por Eruslanov e Kusmartsev (2010). Em resumo, as células MCF-7 (7×10^4 célula/poço) foram tratadas com CNFD (1, 3 e 10 μM), peróxido de hidrogênio (500 μM) e paclitaxel (3 μM) durante 3 h. Em seguida, as células foram recolhidas, lavadas com solução salina e ressuspensas em tubos FACS com PBS contendo 5 μM de DCF-DA durante 30 minutos. Finalmente, as células foram lavadas com soro fisiológico e a fluorescência celular foi determinada por citometria de fluxo no citômetro BD LSRFortessa utilizando o Software BD

FACSDiva e analisado pelo software Flowjo10. Dez mil eventos foram avaliados por experiência e os detritos celulares foram omitidos da análise.

4.4.9 Determinação da produção do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

A geração de superóxido foi estimada através da redução do “nitroblue tetrazolium” (NBT), um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI et al., 1994). Para este ensaio, as células MCF-7 (1×10^4 célula/poço) foram incubadas com CNFD (1; 3 e 10 μ M) por 1, 3 e 6 horas. Em cada poço foi adicionado 20 μ L de NBT a 0,1%. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi retirado e os cristais de formazan foram dissolvidos em 200 μ L de DMSO. A absorbância foi medida a 560 nm utilizando um leitor de microplaca (DTX800 Beckman e Coulter). Os resultados foram expressos em absorbância (D.O.). As imagens foram captadas utilizando por meio de microscópio invertido (LEICA).

4.4.10 Determinação da produção de óxido nítrico (NO^{\bullet})

Para a quantificação indireta da produção de NO^{\bullet} as células MCF-7 (1×10^4 células/poço) foram tratadas com CNFD nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M por 1, 3 e 6 horas. Após a incubação, a concentração de nitrito (NO_2^-) foi determinada no sobrenadante da cultura celular utilizando a reação de Griess, conforme metodologia descrita por Green e seus colaboradores (1982). Em resumo, alíquotas de 50 μ L dos sobrenadantes foram incubadas com 100 μ L de reagente de Griess (1% de

sulfanilamida com 0,1% de α -naftil etilenodiamina, preparado no momento do uso) por 10 minutos a temperatura ambiente. A absorbância de cada amostra foi determinada em leitor de microplaca (DTX800 Beckman e Coulter) com comprimento de onda de 560nm. A concentração de NO_2^- das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2).

4.4.11 Ensaio de proteção com N-acetilcisteína (NAC)

O ensaio de proteção utilizando o antioxidante NAC foi realizado como descrito por Yedjou e Tchounwou (2007). Em resumo, antes do ensaio de viabilidade, as células foram tratadas durante 1 h com NAC 10 mM (Sigma-Aldrich), depois incubadas com CNFD nas concentrações estabelecidas durante 24 e 48 h. As células foram então completamente tripsinizadas e o ensaio de exclusão do corante de azul de tripano foi conduzido como descrito anteriormente.

4.4.12 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

JC-1 é uma sonda fluorescente sensível, usada como um indicador do potencial mitocondrial em uma variedade de tipos de células. A despolarização mitocondrial foi medida pelo kit MitoScreen JC-1 (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. As células MCF-7 foram semeadas em placas de 24 poços, tratadas com CNFD (1, 3 e 10 μM). FCCP (carbonil cianeto rtrifluoro-metoxi fenilhidrazona) foi usado como controle positivo. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi substituído por um meio contendo 0,5 mL de corante JC-1 e incubado durante 15

minutos a 37°C no escuro. A fluorescência celular foi determinada por citometria de fluxo no citômetro BD LSRFortessa utilizando o software BD FACSDiva e analisado pelo Flowjo10. Dez mil eventos foram avaliados por experiência e os detritos celulares foram omitidos da análise.

4.4.13 Avaliação da expressão gênica

4.4.13.1 Análise da expressão gênica por PCR Array

O experimento seguinte foi realizado para estudar o efeito de CNFD sobre a expressão gênica de genes alvos relacionados a proliferação, ciclo celular, morte celular e invasão em células MCF-7. Em todos os experimentos, 5 mL de uma solução de células MCF-7 (7×10^4 células/mL) foram inseridos em garrafas para cultura celular de 25 cm² incubadas por *overnight* para permitir a adesão das células na placa. As células foram tratadas por 12 horas como a CNFD (3 µM). O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) usado para diluir as substâncias teste. Paclitaxel (3 µM) foi usado como controle positivo. Os experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos pelo menos três vezes. Um *pool* de cDNA obtido de três experimentos independentes realizados em duplicata foi utilizado para a análise.

4.4.13.2 Isolamento de RNA total e transcrição reversa

Todos os experimentos foram realizados em condições DNase/RNase free. Para o procedimento de extração de RNA, foram utilizadas microcolunas de sílica-Rneasy Plus Mini Kit (QIAGEN). Após o tempo de tratamento, o meio de cultura foi

aspirado e as células lavadas três vezes com PBS gelado. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS/Tripsina 1%, a fim de que fossem separadas. Após adição de meio de cultura contendo soro fetal bovino para inativação da tripsina, as células foram transferidas para um microtubo e centrifugadas a 300 x g, durante 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e, em seguida, 350 µL do tampão de lise RLT foi transferido para o *pellet* e a amostra foi misturada durante 1 minuto, com auxílio do vórtex. Para homogeneização o lisado foi passado 10 vezes, através de uma agulha de 0,9 mm, acoplada a uma seringa. Em seguida, o lisado foi transferido para a microcoluna contendo Dnase, a fim de eliminar o DNA genômico. Em seguida, foi adicionado 350µL de etanol 70% e o mesmo misturado gentilmente a amostra, com auxílio de pipeta. Após a passagem por nova microcoluna de sílica, lavagens com tampões do kit (RW1 e RPE), o RNA foi eluído com 50 µL de água Rnase/Dnase Free pH 7,4 e armazenado em temperatura de -80°C.

A quantidade e pureza do RNA extraído de cada amostra foi analisada em aparelho de fluorimetria (QuBit™, Life Technologies, USA) e a integridade das amostras testada em condições desnaturantes, em gel de agarose 1%, contendo Syber Safe (0,5mg/mL) e formaldeído 37%. A transcrição reversa foi realizada com a enzima transcriptase Superscript VILO™ (Invitrogen Corporation, USA) e as amostras de cDNA armazenadas em temperatura de -20°C.

4.4.13.3 PCR Array

Para as reações de PCR quantitativo em tempo real foram utilizados TaqMan Gene Expression Assays™ (Life Technologies) inventoriados para *TaqMan Array Human Molecular Mechanisms of Cancer 96 plate* (Life Technologies®). As reações

foram conduzidas no aparelho ABI ViiA7 (Applied BiosystemsTM). O programa de amplificação consistiu de um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Todos os experimentos foram realizados em condições DNase/RNase free.

4.4.14 Preparação de lisado e análise de Western blotting

As células MCF-7 após o período de tratamento pré-determinado foram lisadas utilizando o tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, nonidet P-40 a 1%, desoxicolato de sódio a 0,5% e SDS a 0,1%) na presença de mistura de inibidores de protease. As quantidades de proteína foram quantificadas com o reagente de ensaio Bradford de Bio-Rad (Bio-Rad). Os extratos de proteína (50 µg) foram separados por eletroforese num gel desnaturante de poliacrilamida-SDS de 10-12% e electrotransferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas durante 1 h com PBS contendo leite seco desnatado a 5% (p/v) e tween 20 a 0,1%, lavadas três vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,1% e depois incubadas com anticorpos primários específicos p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), p-p38 (Thr180/Tyr182), p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), caspase clivada 3 (Asp175) e anti-β-actina (8H10D10) (Cell Signalling Technology) utilizando uma diluição de 1:1000 em PBS contendo 5% (p/v) de BSA e 0,1% de tween 20. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP apropriado (Cell Signalling Technology) (1:3000). As bandas imunorreativas foram visualizadas utilizando o sistema de detecção ECL, tal como descrito pelo fabricante (GE Healthcare).

4.5 Avaliações do potencial antitumoral *in vivo*

4.5.1 Animais

Um total de 44 camundongos C57BL/6 isentos de patógenos específicos (fêmeas, 20-30 g) foram obtidos e mantidos em instalações do Instituto Gonçalo Moniz-FIOCRUZ / BA (Salvador, Bahia, Brasil). Os animais foram alojados em gaiolas com acesso livre a alimentos e água. Todos os animais foram mantidos sob um ciclo luz-escuro de 12:12 h (luzes acesas às 6:00 da manhã). Os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos para experimentação animal da SBCAL (Associação Brasileira de Zootecnia Animal), Brasil. O Comitê de Ética Animal da Fundação Oswaldo Cruz (Salvador, Bahia, Brasil) aprovou o protocolo experimental (número 001/2013- Anexo I).

4.5.2 Protocolo experimental

O efeito antitumoral *in vivo* foi avaliado em camundongos C57BL/6 inoculados com melanoma B16-F10 como previamente descrito por Costa et al. (2015). Células tumorais (2×10^6 células por 500 μ L) foram implantadas subcutaneamente na região axilar esquerda dos camundongos. Os animais foram divididos em cinco grupos diferentes: grupo 1 - animais que receberam injeções do veículo (2% de DMSO + 2% de kolifor em soro fisiológico, controle negativo, n = 9); Grupo 2 - animais que receberam injeções de doxorubicina (0,5 mg/Kg/dia, controle positivo, n = 9); Grupo 3 - animais que receberam injeções de solução de CNFD (10 mg/Kg/dia, n = 10); Grupo 4 - animais que receberam injeções de solução de CNFD (30 mg/Kg/dia, n = 8);

Grupo 5 - animais que receberam injeções de solução de CNFD (60 mg/Kg/dia, n = 8). Os tratamentos foram iniciados um dia após a inoculação do tumor. Os animais foram tratados intraperitonealmente (200 µL por animal) uma vez por dia durante 13 dias consecutivos. Amostras de sangue periférico foram colhidas a partir do plexo retro-orbital sob anestesia para análise bioquímica e hematológica no dia 14, conforme descrito abaixo. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e os tumores foram excisados e pesados. Os efeitos do fármaco foram expressos como percentagem de inibição em relação ao controle.

4.5.3 Avaliação de parâmetros bioquímicos; hematológicos e análise histológica

Os efeitos toxicológicos sistêmicos foram investigados conforme descrito previamente por Costa et al. (2015). Os camundongos foram pesados no início e no final do experimento. Os animais foram observados quanto a sinais de anormalidades ao longo do estudo. Fígados, rins, pulmões e corações foram removidos, pesados e examinados para detectar quaisquer sinais de lesões graves ou alterações de cor e hemorragia. As análises bioquímicas de amostras de soro foram realizadas utilizando um rotor Vet-16 e quantificadas utilizando um sistema analítico de laboratório (Hemagen Diagnostics Inc.). As análises hematológicas foram realizadas por microscopia óptica. Após exame macroscópico, tumores, fígados, rins, pulmões e corações foram fixados em tampão de formalina a 4% e incorporados em parafina. As secções dos tecidos foram coradas com hematoxilina e eosina, e um patologista realizou a análise sob microscopia óptica.

4.6 Análise Estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média e/ou CI_{50} e seus intervalos de confiança de 95% (CI 95%) obtidos por regressão não linear. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Efeito citotóxico de CNFD em diferentes linhagens tumorais

Várias linhagens de células tumorais foram tratadas com concentrações crescentes de CNFD durante 24, 48 e 72 horas e analisadas por ensaio de alamar blue. CNFD apresentou citotoxicidade contra todas as linhagens tumorais testadas, mostrando valores de CI_{50} na escala de micromolar, que variaram de 7,25 μM para células SK-MEL 19 (24 horas) a 0,63 μM para células MCF-7 (72 horas). As tabelas 1 e 2 mostram os valores de CI_{50} obtidos. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e também apresentou citotoxicidade contra todas as linhagens celulares tumorais testadas.

Ao analisar a atividade citotóxica de CNFD sobre células normais de fibroblasto humano (MRC5) foram encontrado valores de CI_{50} que variaram de 4,39 μM e 3,76 μM nos tempos de 24 e 72 horas, respectivamente, mostrando que CNFD apresentou-se menos tóxico que a doxorrubicina, cuja CI_{50} foi de 3,90 μM e 0,14 μM , nos mesmos tempos. Nos ensaios subsequentes foi utilizado o paclitaxel como controle positivo, uma vez que se trata de um agente quimioterapêutico clinicamente útil devido à sua elevada citotoxicidade e vasto uso para induzir apoptose com alta reprodutibilidade dos resultados. Os valores de CI_{50} de paclitaxel na linhagem MCF-7 foram mostrados na tabela 2.

Tabela 1 - Atividade citotóxica de CNFD sobre linhagens de células neoplásicas e em célula normal.

Linhagem celular	IC ₅₀ (µM)		
	24 horas	48 horas	72 horas
HCT116	3,13 (2,69 - 3,64)	3,01 (2,30 - 3,95)	1,17 (0,81 - 1,69)
MCF7	3,06 (2,77 - 3,37)	0,98 (0,27 - 1,08)	0,63 (0,58 - 0,69)
SK-Mel-19	7,25 (5,48- 9,61)	3,43 (3,14 - 3,75)	2,91 (2,68 - 3,17)
SK-Mel-28	2,28 (1,49 - 3,50)	3,04 (1,88 - 4,90)	2,72 (2,38 - 3,11)
SK-Mel-103	3,28 (2,15 - 5,01)	2,11 (1,63 - 2,73)	1,42 (1,33 - 1,52)
MESA/Dx5	2,8 (2,26 - 3,47)	2,35 (1,98 - 2,75)	1,85 (1,82 - 1,89)
B16F10	3,77 (3,09 - 4,61)	1,24 (0,92 - 1,68)	1,52 (1,43 - 1,61)
MRC5	4,39 (2,64 - 7,31)	3,44 (3,13 - 3,77)	3,76 (3,38 - 4,18)

Os valores estão representados como IC₅₀ (intervalo de confiança de 95%).

Tabela 2 - Atividade citotóxica de doxorrubicina sobre linhagens de células neoplásicas e em célula normal e paclitaxel em células MCF7.

Linhagem celular	IC ₅₀ doxorrubicina (µM)		
	24 horas	48 horas	72 horas
HCT116	3,32 (1,83 - 6,02)	1,00 (0,78 - 1,27)	0,52 (0,27 - 0,97)
MCF7	1,97 (0,95 - 2,09)	1,39 (0,56 - 2,45)	0,84 (0,50 - 1,43)
SK-Mel-19	1,2 (0,84 - 1,69)	0,72 (0,51 - 1,01)	0,10 (0,01 - 0,68)
SK-Mel-28	2,13 (1,70 - 2,67)	0,27 (0,17 - 0,42)	0,22 (0,05 - 0,88)
SK-Mel-103	1,09 (0,33 - 3,52)	0,53 (0,35 - 0,80)	0,90 (0,29 - 1,80)
MESA/Dx5	8,23 (6,67 - 10,16)	3,91 (3,56 - 4,39)	0,42 (0,20 - 0,87)
B16F10	1,95 (1,71 - 2,22)	0,55 (0,29 - 1,05)	1,41 (1,23 - 1,61)
MRC5	3,90 (3,15 - 4,83)	1,00 (0,59 - 1,71)	0,14 (0,10 - 0,17)

IC₅₀ paclitaxel (µM)

Linhagem celular	24 horas	48 horas	72 horas
MCF7	12,04 (10,72 - 14,91)	2,03 (1,10 - 3,72)	1,67 (1,61 - 1,73)

Os valores estão representados como IC₅₀ (intervalo de confiança de 95%).

Com bases nos valores de CI_{50} , foram calculados os índices de seletividade (SI) mostrados na tabela 3. Foi observado que os maiores índices de seletividade referiam-se a linhagem MCF-7 com valores de 1,43; 3,51; 5,96 nos tempos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Uma vez que as células MCF-7 foram especialmente sensíveis ao efeito citotóxico do CNFD, foram realizados estudos adicionais com esta linhagem celular.

Tabela 3 - Índice de seletividade (IS*) para o composto CNFD e doxorrubicina

Linhagem celular tumoral	Índice de Seletividade					
	CNFD			Doxorrubicina		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
HCT116	1,40	1,14	3,21*	1,17	1,00	0,26
MCF7	1,43	3,51*	5,96 *	1,97	0,71	0,16
SK-Mel-19	0,60	1,00	1,29	3,25*	1,38	1,40
SK-Mel-28	1,92	1,13	1,38	1,83	3,70*	0,63
SK-Mel-103	1,33	1,63	2,64 *	3,57*	1,88	0,15
MESA/Dx5	1,16	1,46	2,03*	0,47	0,25	0,33
B16F10	1,16	2,77 *	2,47 *	2,00*	1,81	0,09

*IS significativo para valores maiores ou iguais a 2

5.2 Efeito antiproliferativo de CNFD em células MCF-7

O ensaio de viabilidade com base na exclusão do corante azul de tripano foi realizado com a finalidade de se confirmar o efeito citotóxico observado no ensaio do alamar blue. De acordo com a gráfico 1 A, é possível observar uma redução significativa do número de células viáveis a partir de 12 horas de incubação. Após 24 e 48 horas, CNFD reduziu o número de células viáveis em 45% e 58% e 95% e 98%, respectivamente, nas concentrações de 3 μ M e 10 μ M, quando comparado ao controle

negativo. Em contrapartida, ao analisar a porcentagem de células não-viáveis, gráfico 1 B, verificou-se um aumento significativo no tratamento de CNFD com 10 μM em todos os tempos testados e em 3 μM apenas no tempo de 48 horas.

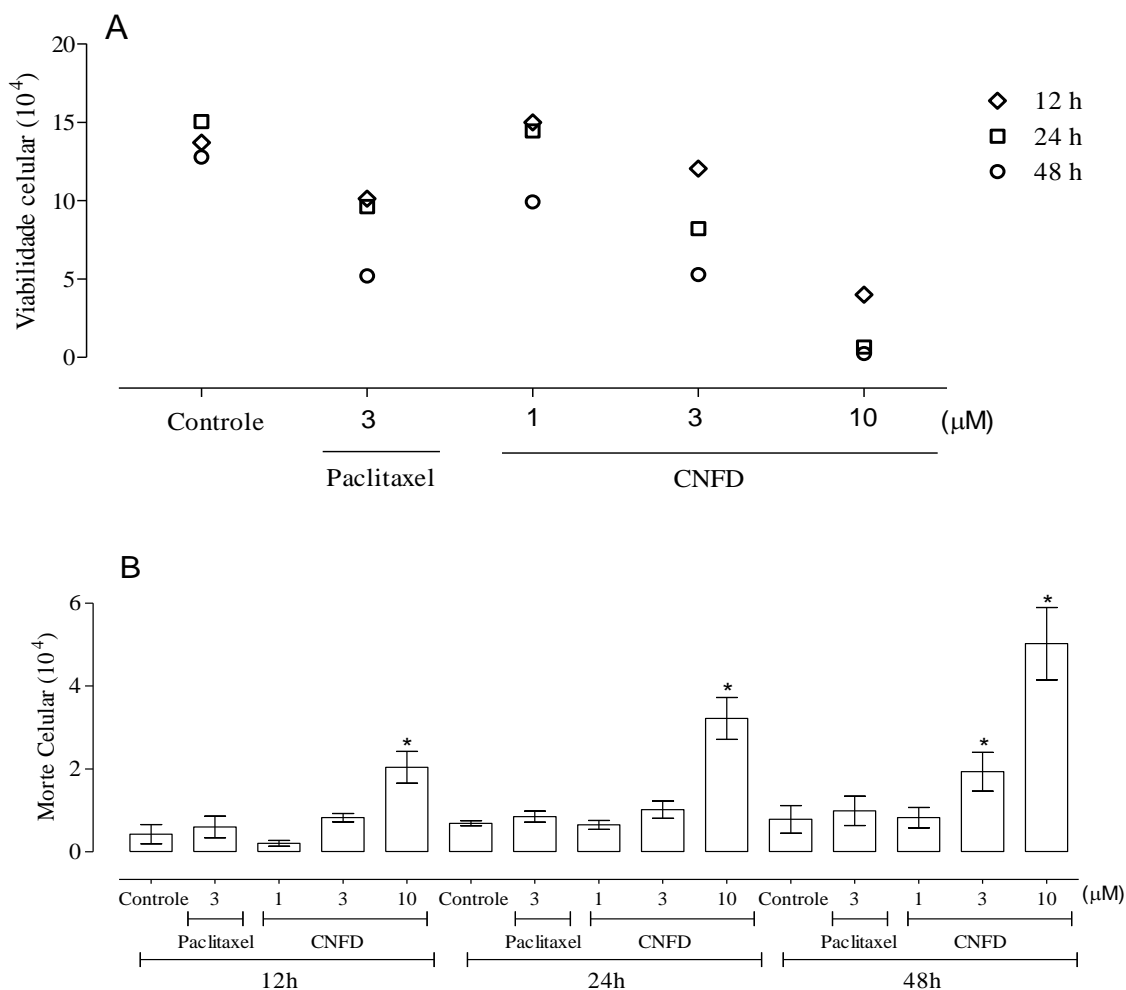


Gráfico 1 - Efeito de CNFD na viabilidade de células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano

(A) Número de células viáveis (B) Número de células não-viáveis determinado pelo método de exclusão do corante azul de tripano após 12, 24 e 48 h de incubação. Os dados apresentam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle por ANOVA seguido por teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

5.3 Efeito de CNFD sobre a morfologia de células MCF-7

Para estudar as alterações morfológicas das células de adenocarcinoma de mama (MCF-7), as células foram tratadas com CNFD nas concentrações de 1; 3 e 10 μM e com paclitaxel (3 μM) durante 24 e 48 horas, posteriormente foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio óptico. Foram analisados parâmetros como forma, tamanho, alterações nucleares e citoplasmáticas.

Na figura 11 é possível observar, as alterações morfológicas que ocorreram após 24 horas. Os grupamentos celulares apareceram mais frouxos e com células isoladas; as células apresentaram formato redondo com ocorrência de retração tanto com redução da célula e do volume nuclear; intensa condensação e marginalização da cromatina (picnose) e presença de corpos apoptóticos, todas essas alterações morfológicas são sugestivas de um processo apoptótico. As células tratadas com paclitaxel apresentaram inúmeras figuras de mitose.

Em 48 horas, foram observadas células com cromatina distribuída de forma irregular, acumulando-se em grumos na membrana nuclear; sendo figuras típicas de cariorrexe com presença de cariólise caracterizada pelo desaparecimento do núcleo e da cromatina. Em células tratadas com 3 μM e 10 μM de CNFD, foi possível observar perda do conteúdo citoplasmático. A presença da forma poligonal pode ser identificada pela ocorrência de alguns detritos celulares. Essas alterações morfológicas são inespecíficas, porém sugere-se que se trata de um processo apoptótico tardio.

24 horas

48 horas

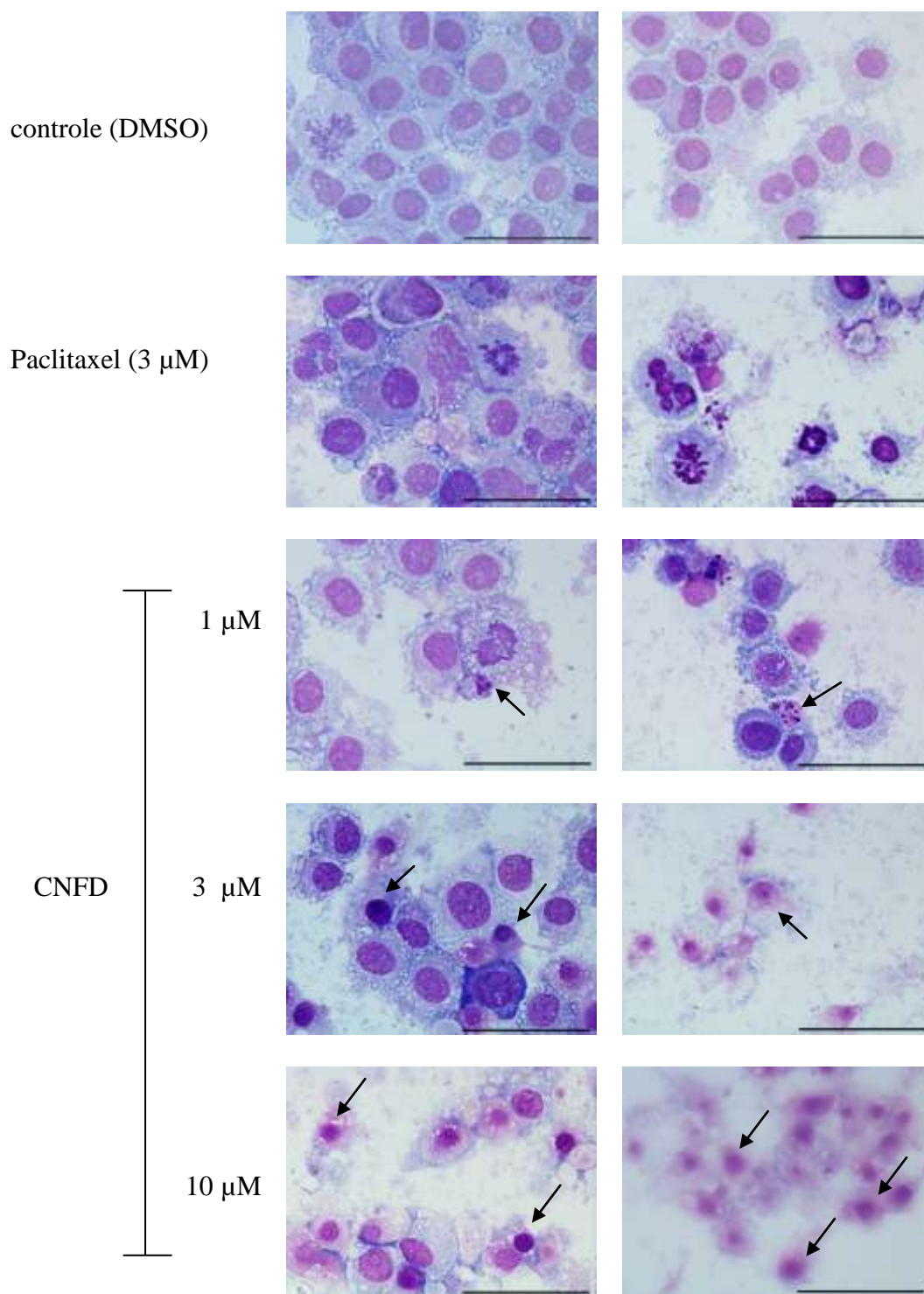
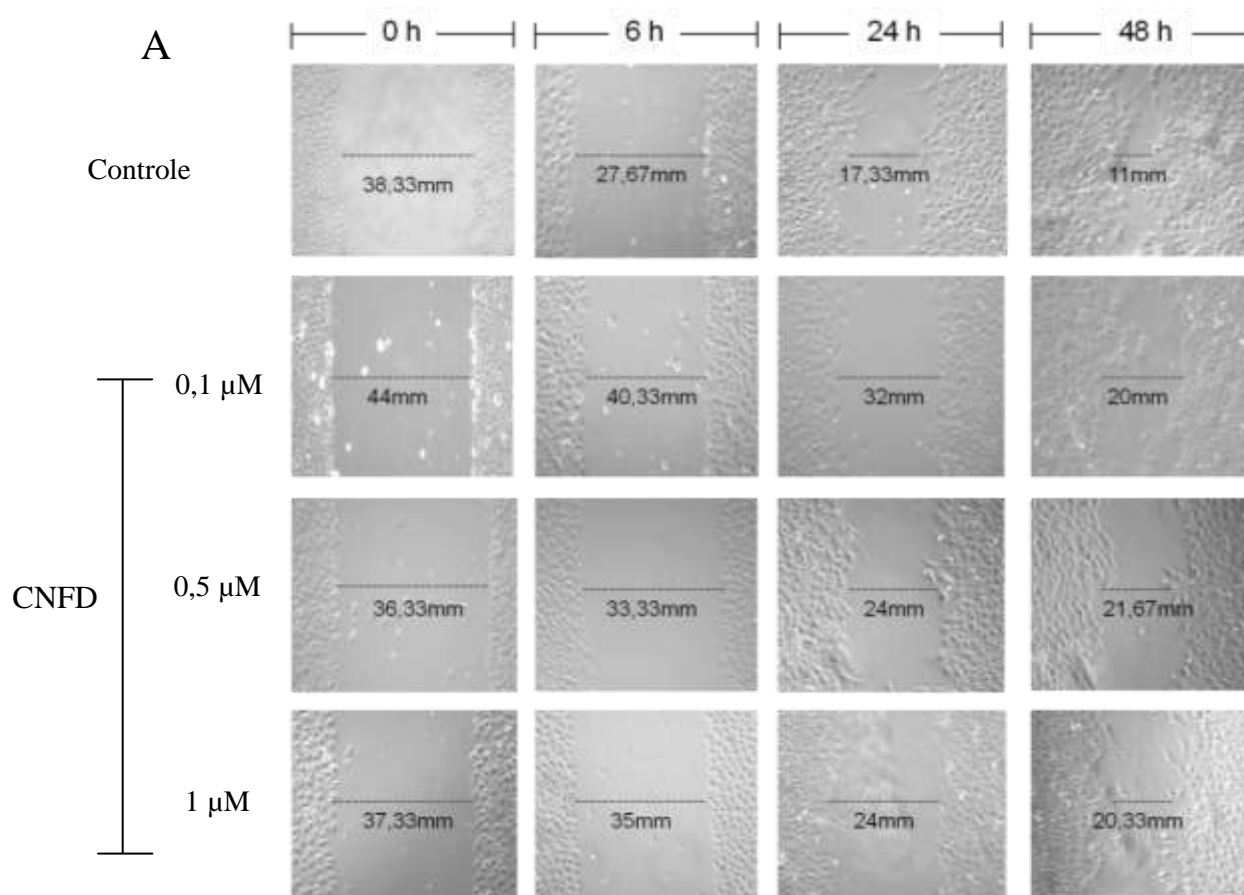


Figura 11 - Efeito de CNFD na morfologia de células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.

As células foram coradas com hematoxilina-eosina e analisadas por microscopia óptica após 24 h e 48 h de incubação com CNFD a diferentes concentrações. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO a 0,2%) utilizado para diluir a substância testada. Foi utilizado paclitaxel (3 μM) como controle positivo. As setas indicam as alterações observadas.

5.4 Efeito de CNFD sobre a motilidade de células MCF-7

CNFD foi capaz de retardar a migração de células MCF-7 no ensaio de cicatrização de feridas. A capacidade das células para se moverem e repovoar a região da ferida riscada foi suprimida por CNFD. Os registros fotográficos nos diferentes tempos observados, conforme mostra a figura 12 A, pode-se observar que houve inibição principalmente no tempo de 48 horas, quando comparados os valores das distâncias dos poços tratados com o controle negativo. Na concentração de 0,5 μM , o tratamento com CNFD reduziu o fechamento da ferida em 40% em comparação com as células não tratadas (figura 12 B $p < 0,05$)



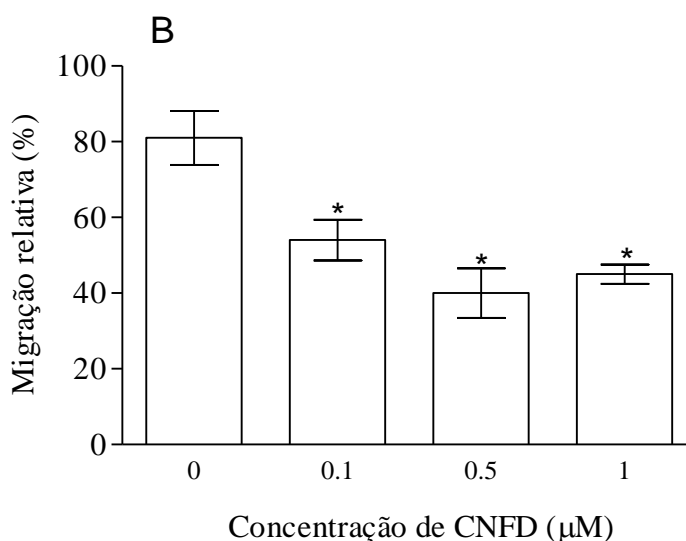


Figura 12 - Efeito de CNFD na motilidade de células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.

(A) Fotografias do ensaio de cicatrização de ferida (B) A migração relativa de cada amostra foi calculada a partir da diferença na área da região da ferida não fechada medida entre 0 e 48 h em comparação com as do controle não tratado. Os dados são apresentados como valores médios \pm desvio padrão. A partir de três experiências independentes realizadas em duplicata. * $p < 0,05$ em comparação com controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

5.5 Efeito de CNFD na fragmentação de DNA internucleossomal de células MCF-7

Para investigar melhor os mecanismos envolvidos na atividade citotóxica de CNFD, o seu efeito na progressão do ciclo celular foi avaliado utilizando citometria de fluxo. A Tabela 3 mostra a distribuição do ciclo celular obtida. O tratamento com CNFD, em todas as concentrações, resultou num aumento significativo no número de células no sub-G1 em comparação com o controle negativo ($p < 0,05$). No controle, a porcentagem de células correspondente às fases G_0/G_1 foi de 42,2% e 36,6%, para a fase S foi de 42,5% e 27,7%, para as fases G_2/M foi de 14,9% e 26% nos tempos de 24 e 48 h, respectivamente. As células com fragmentação de DNA internucleossomal (sub-G1) corresponderam a 0,4% e 9,7%, respectivamente, para os mesmos tempos.

Para as células tratadas com CNFD, a percentagem de células correspondentes ao sub-G1 foi 41,2% e 35,6% (1 μ M), 38% e 63,7% (3 μ M) e 69,3% e 72,2% (10 μ M) nos tempos de 24 e 48 h, respectivamente, o que corresponde a uma maior fragmentação do DNA internucleossomal. O paclitaxel levou à detenção do ciclo celular nas fases G₂/M.

Tabela 4 - Efeito de CNFD sobre a distribuição de DNA em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano após 24 e 48 h de incubação.

Tratamento	Concentração (μ M)	Distribuição DNA (%)			
		sub-G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
<i>Após 24 h de incubação</i>					
Controle negativo	0,2% DMSO	0,4 \pm 0,44	42,2 \pm 2,16	42,5 \pm 0,11	14,9 \pm 1,78
Paclitaxel	3	25,3 \pm 2,31*	13,3 \pm 1,30*	4,8 \pm 1,54*	56,6 \pm 3,51*
CNFD	1	41,2 \pm 0,97*	12,8 \pm 0,38*	31,7 \pm 1,12	14,4 \pm 1,61
	3	38,0 \pm 0,69*	10,8 \pm 1,5*	35,0 \pm 0,82	16,3 \pm 1,01
	10	69,3 \pm 2,10*	13,5 \pm 1,66*	3,2 \pm 1,77*	14,0 \pm 2,0
<i>Após 48h de incubação</i>					
Controle negativo	0,2% DMSO	9,7 \pm 1,36	36,6 \pm 5,32	27,7 \pm 8,61	26,0 \pm 4,65
Paclitaxel	3	9,5 \pm 1,67	14,0 \pm 1,65*	1,1 \pm 0,98*	75,4 \pm 4,03*
CNFD	1	35,6 \pm 8,04*	25,2 \pm 0,96*	23,6 \pm 2,76	15,6 \pm 4,78*
	3	63,7 \pm 4,77*	20,0 \pm 7,20*	8,2 \pm 5,22*	8,1 \pm 2,80*
	10	72,2 \pm 8,81*	10,9 \pm 5,31*	2,8 \pm 2,42*	14,2 \pm 6,13*

Os dados são apresentados como valores médios \pm desvio padrão. A partir de três experiências independentes realizadas em duplicata. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir a substância testada. Foi utilizado paclitaxel como controle positivo. Dez mil eventos foram avaliados por experimento e os detritos celulares foram omitidos da análise. Cada fase foi calculada usando o programa Flowjo v.10. * p <0,05 em comparação com controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

5.6 Efeitos de CNFD na indução de apoptose em células MCF-7

O perfil de morte celular foi avaliado a partir da externalização da fosfatidilserina. Os resultados do presente estudo conforme o gráfico 2 A mostram que o tratamento com CNFD resultou em um aumento na porcentagem de células marcadas com Anexina-V (quadrante inferior direito), no período de 24 horas. No gráfico 2 C é possível observar que o aumento foi significativo com a porcentagem de células marcadas de 18,98%, 27,62%, 51,18% nas concentrações de 1, 3 e 10 μM de CNFD quando comparadas com paclitaxel (20,17%) e com o controle não tratado, indicando a ocorrência de apoptose.

No período de 48 horas de tratamento com CNFD (gráfico 2 B) observou-se que na concentração de 1 μM a porcentagem de células marcadas com anexina-V manteve-se em torno de 18%, na concentração de 3 μM foi de 32,51% e em 10 μM foi de 21,17%. Tal fato deve ter ocorrido devido ao aumento de células marcadas com a dupla marcação de anexina-V + iodeto de propídio, caracterizadas como apoptose tardia e o aumento de células marcadas somente com iodeto de propídio em 12% e 20% nas concentrações de 3 e 10 μM , respectivamente, considerando estas células em necrose (gráfico 2 D).

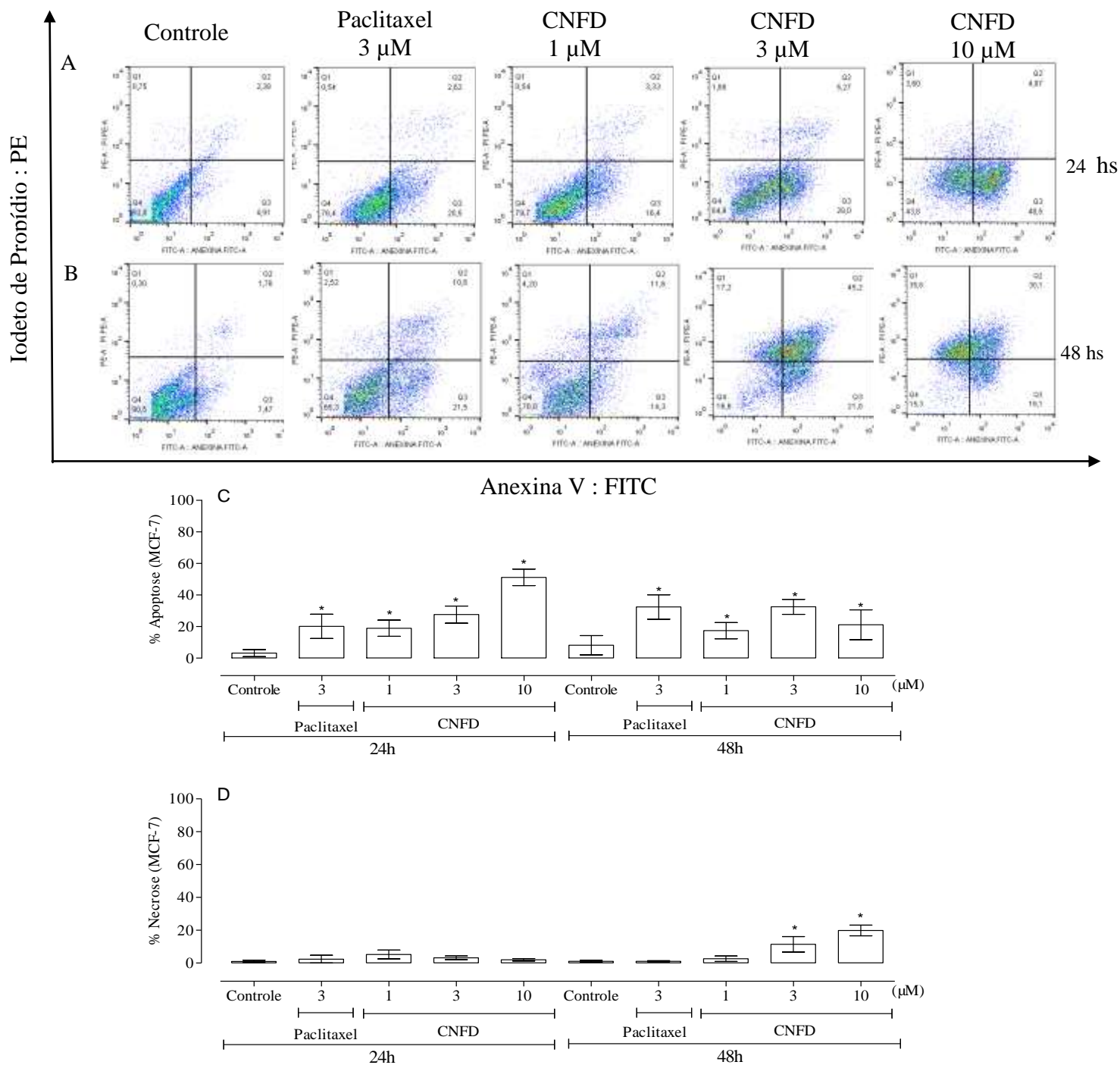


Gráfico 2 - Padrão de morte celular induzido por CNFD em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.

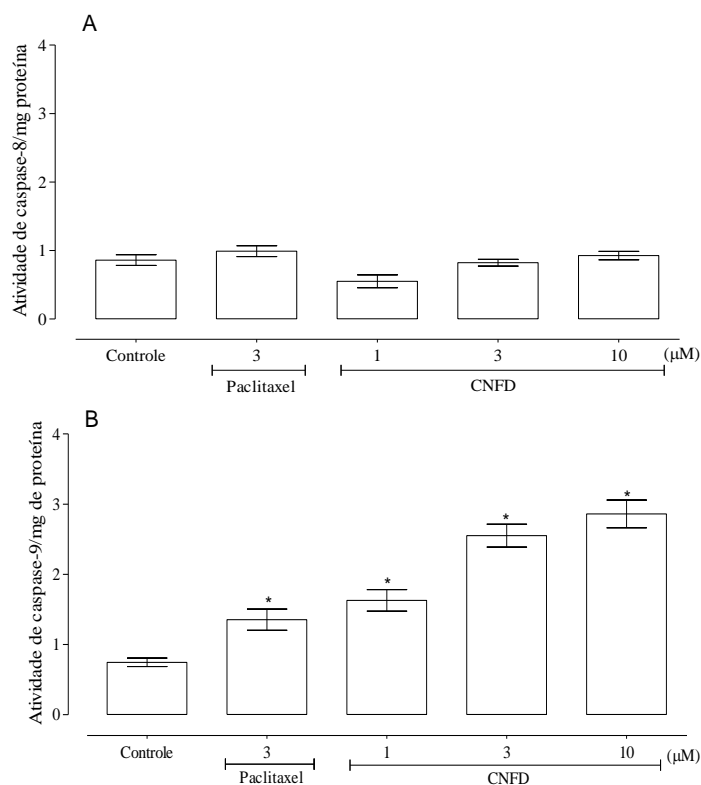
Células foram tratadas com diferentes concentrações de CNFD por 24 e 48 horas e a externalização da fosfatidilserina foi determinada por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para diluir as substâncias. O paclitaxel foi usado como controle positivo (3 μ M). Paineis A e B: Análises de citometria de fluxo usando dupla coloração AnnexinV-FITC/PI. As células no quadrante inferior direito (AnnexinV-FITC (+)/PI (-)) representam a população apoptótica; células no quadrante superior direito (AnnexinV-FITC (+) / PI (+)) representam a população em apoptose tardia e; células no quadrante superior esquerdo (AnnexinV-FITC (-) / PI (+)) representam a população em necrose. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento. Painel C: Representação gráfica do efeito de CNFD na indução de apoptose. Painel D: Representação gráfica do efeito de CNFD na indução de necrose. Cada barra corresponde à média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

5.7 Efeito de CNFD na ativação de caspases em células MCF-7

A fim de saber se a apoptose induzida pelo tratamento com CNFD era mediado pela via extrínseca ou intrínseca, foram avaliadas a ativação das caspases-8 e 9. Os dados apresentados no gráfico 3 A mostram que não houve alteração na ativação da caspase-8.

Em contrapartida, o gráfico 3 B demonstra que houve ativação significativa da caspase-9 nas células tratadas com CNFD nas concentrações de 1, 3 e 10 μM após 24 horas, da mesma forma em que a droga de referência, paclitaxel a 3 μM também promoveu a ativação da caspase-9. Estes resultados sugerem que CNFD pode induzir apoptose pela via intrínseca, portanto, foram necessários outros experimentos que avaliassem parâmetros que confirmassem esta hipótese.

Além disso, observou-se aumento da expressão da caspase 3 clivada no tratamento com CNFD a concentrações de 3 e 10 μM após 24 horas, a qual foi analisada por western blotting, conforme mostra a imagem no gráfico 3 C-D.



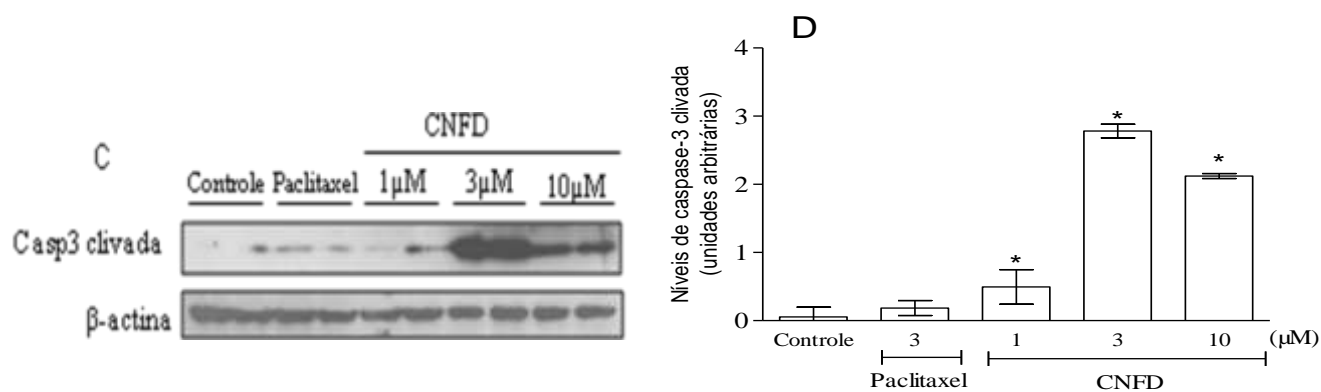


Gráfico 3 - Efeito de CNFD na ativação de caspases em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano

(A-B) Atividade da caspase 8 e caspase 9 determinadas por kits de ensaio de protease colorimétricos. (C) As análises de Western blot de caspase-3 clivada a partir dos lisados celulares totais realizados após tratamento com CNFD e paclitaxel durante 24h. (D) Respostas (unidades arbitrárias) de caspase 3 clivada e sua respectiva beta-actina. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para diluir a substância testada. Foi utilizado paclitaxel (3 μ M) como controle positivo. Os dados são apresentados como valores médios \pm desvio padrão, a partir de três experiências independentes realizadas em duplicata. * $p < 0,05$ em comparação com controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

5.8 Efeitos de CNFD sobre a produção de EROs em células MCF-7

Uma das formas de induzir a morte celular por apoptose é através do aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular. Sabe-se que as naftoquinonas podem levar ao aumento de EROs em diversas linhagens tumorais (FARIAS et al., 2014; GONG; LI, 2011).

Para avaliar o possível envolvimento de EROs no mecanismo de morte celular induzido por CNFD, foi utilizada uma sonda fluorescente chamada DCF-DA (2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) e realizado ensaios de citometria de fluxo para detectar os níveis intracelulares de EROs. Como apresentado no gráfico 4, o tratamento das células MCF-7 com CNFD nas concentrações de 3 μ M e 10 μ M por 3 horas induziu de forma significativa em 30,27% e 35,77%, respectivamente, o aumento nos níveis de EROs, quando comparadas com o controle positivo H₂O₂

(500 μ M) e a droga de referência paclitaxel (3 μ M) que foi de 50,03% e 29,05%, respectivamente.

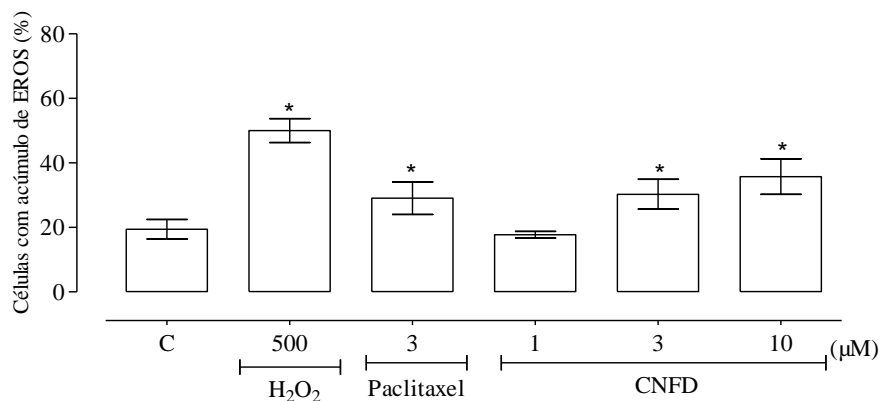


Gráfico 4 - Efeito de CNFD nos níveis de EROS intracelulares em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.

As células foram tratadas com as concentrações indicadas de CNFD, durante 3 horas. A produção de EROS foi determinada por citometria de fluxo utilizando a DCF-DA. H₂O₂ (500 μ M) foi utilizado como controle positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento. Cada barra corresponde à média \pm E.P.M de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltipla de Newman-Keuls

5.9 Efeitos de CNFD sobre a produção de ânion radical superóxido (O₂^{•-}) em células MCF-7

Com o intuito de investigar as espécies reativas de oxigênio geradas após tratamento com CNFD, avaliou-se a produção de ânion radical superóxido. Assim, as células foram incubadas por 1, 3 e 6 horas com DMSO 0,1% (controle negativo), paclitaxel a 3 μ M (controle positivo) e CNFD nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M. A figura 13 A, mostra que CNFD estimulou significativamente o aumento na produção de ânion radical superóxido em todas as concentrações testadas e no período de tempo determinado, quando comparados ao controle negativo. Por outro lado, o paclitaxel utilizado como droga de referência não induziu a produção de ânion superóxido nas condições de concentração e tempo definido. As imagens (figura 13 B) revelam a

presença de cristais de formazan resultantes da redução do NBT pelo ânion radical superóxido produzido.

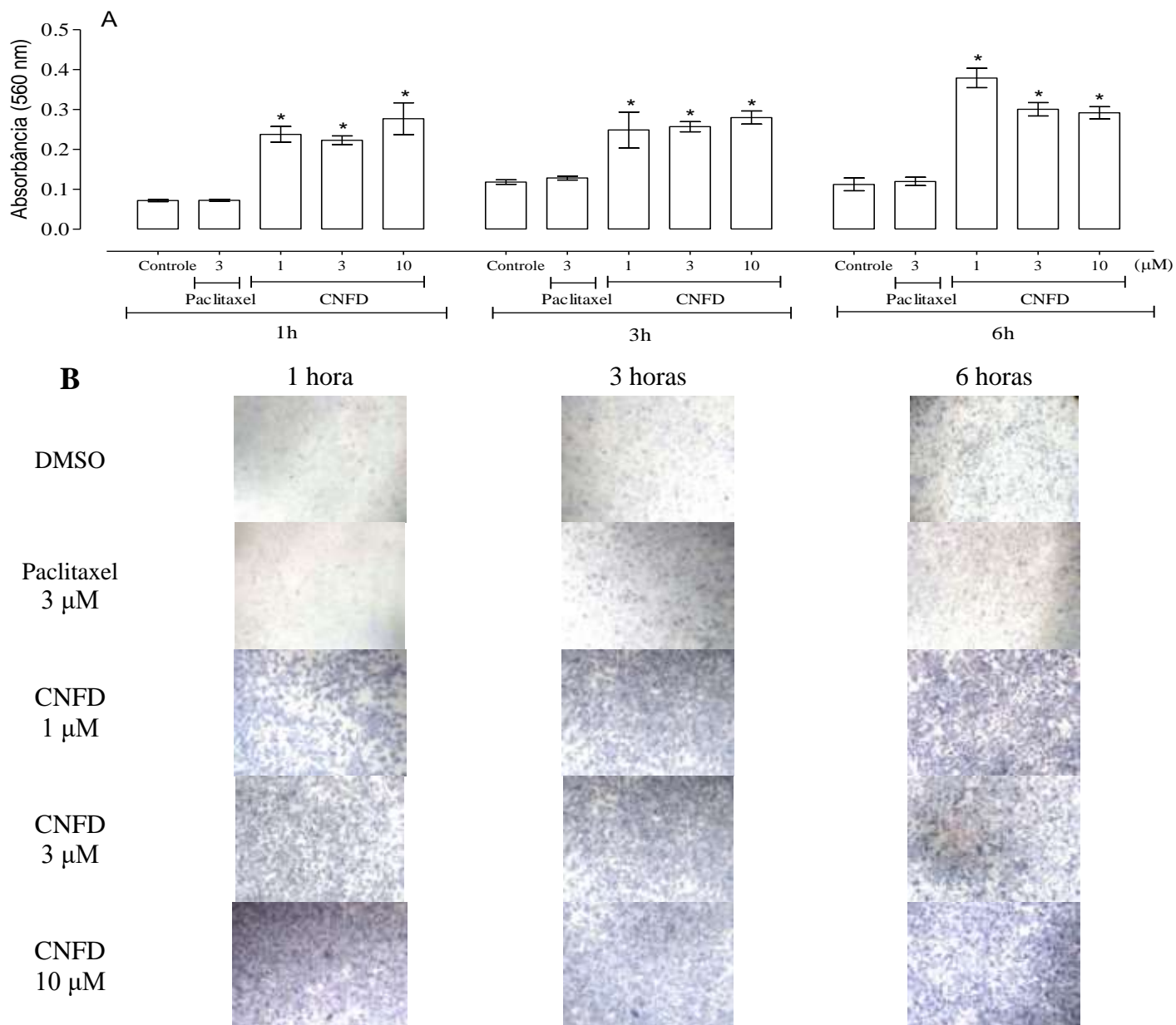


Figura 13 - Efeito de CNFD sobre a produção de $O_2^{\bullet-}$ em células MFC-7 de adenocarcinoma de mama humano.

(A) As células foram tratadas com os compostos e incubadas com solução de 0,1% de NBT por um período de 1, 3 e 6 horas. Os cristais de formazan foram solubilizados e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 560 nm em espectrofotômetro. (B) As imagens foram obtidas por microscópio invertido e mostram os cristais de formazan, resultantes da redução do NBT pelo superóxido. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão, de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

5.10 Efeitos de CNFD sobre a produção de óxido nítrico em células MCF-7

O óxido nítrico é um radical livre produzido por uma variedade de células e está envolvido em processos fisiológicos, tais como controle de infecções e regulação da citotoxicidade mediada por células. Todavia, o descontrole na síntese de NO está envolvido na patogênese de doenças cardiovasculares, indução do câncer, genotoxicidade e inflamação (LOBO et al., 2010).

No ensaio realizado com a linhagem MCF-7, o gráfico 5 mostra que CNFD não induziu a produção de óxido nítrico, nas concentrações e no intervalo de tempo testado, portanto, o óxido nítrico não participa da morte celular mediado por EROs, hipótese que foi sendo investigada como ação de CNFD.

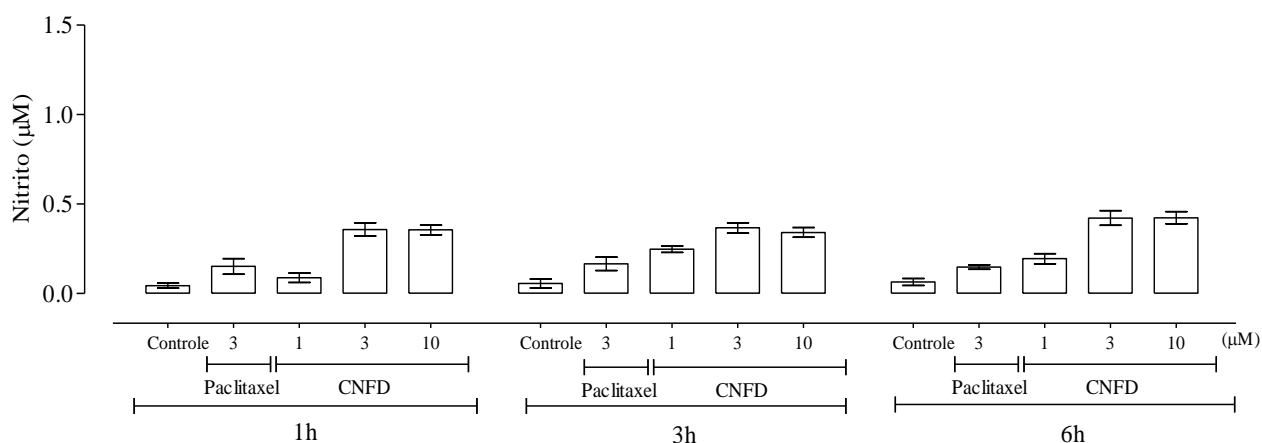


Gráfico 5 - Efeito de CNFD sobre a produção de NO em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano

As células foram tratadas com os compostos e incubadas por um período de 1, 3 e 6 horas. A concentração de nitrito foi determinada utilizando a reação de Griess, em espectrofotômetro a 560 nm, com base em curvas padrões utilizando diferentes concentrações de NaNO_3 . Os valores correspondem à média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

5.11 Efeito de CNFD com o co-tratamento utilizando o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) em célula MCF-7

A morte celular induzida por CNFD foi evitada quando as células foram co-tratadas com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC). Nos gráficos 6 A-B, pode-se comparar os efeitos de CNFD sozinho e quando adicionado NAC e foi possível observar o aumento da sobrevivência celular em 18,0% e 12,1% (CNFD - 3 μM), 33,7% e 9,4% (CNFD - 10 μM) após tratamento de 24 h e 48 h, respectivamente. Assim, os dados demonstram que CNFD induz efeito citotóxico pela geração de espécies reativas de oxigênio, porém não é o único mecanismo pelo qual o CNFD promove a morte celular.

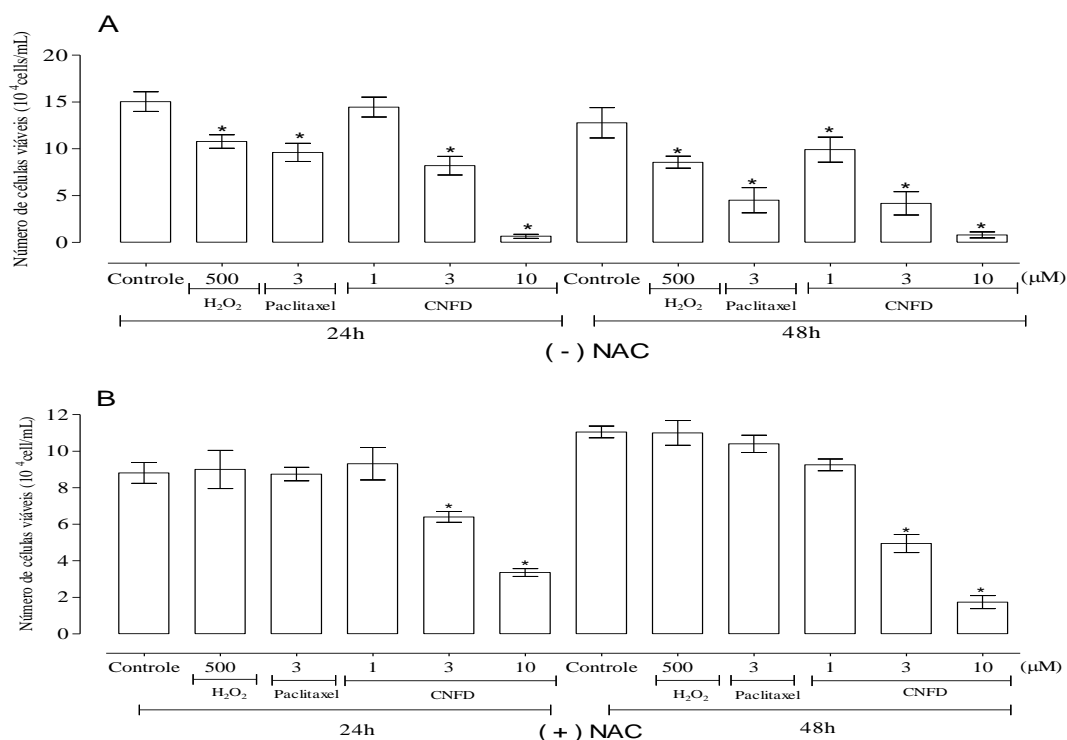
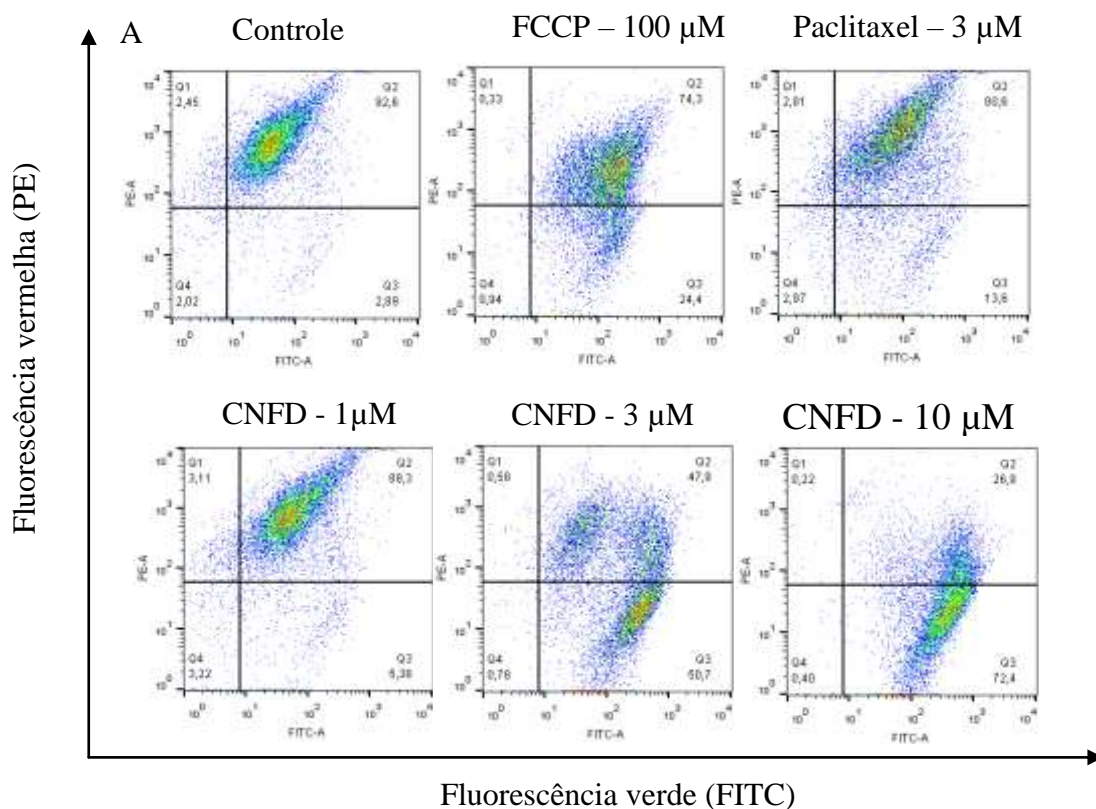


Gráfico 6 - Efeito de CNFD na indução de morte celular com o co-tratamento utilizando o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.

(A) Viabilidade celular determinada pelo método de exclusão do corante azul de tripano após 24 e 48 h de incubação com CNFD sozinho. (B) Viabilidade celular após co-tratamento com 10 mM de NAC durante 60 minutos antes do tratamento com CNFD a diferentes concentrações durante 24 a 48 h. Os dados são apresentados como valores médios \pm desvio padrão, a partir de três experiências independentes realizadas em duplicata. * $p < 0,05$ em comparação com controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

5.12 Avaliação do efeito de CNFD sobre a despolarização da membrana mitocondrial em células MFC-7

Sabe-se que a perda do potencial da membrana mitocondrial é um dos primeiros eventos que ocorrem durante a apoptose. Assim investigou-se se o efeito citotóxico de CNFD pode estar relacionado a esse evento bioquímico. O potencial transmembrânico mitocondrial foi determinado pela probe fluorescente JC-1 e analisado por citometria de fluxo. Como mostrado no gráfico 7, CNFD induziu a despolarização mitocondrial em células MCF-7, sugerindo a morte celular por apoptose intrínseca dependente da mitocôndria (gráfico 7A). A despolarização mitocondrial ocorreu em 44% e 64% das células nas concentrações de 3 e 10 μM , respectivamente (gráfico 7 B).



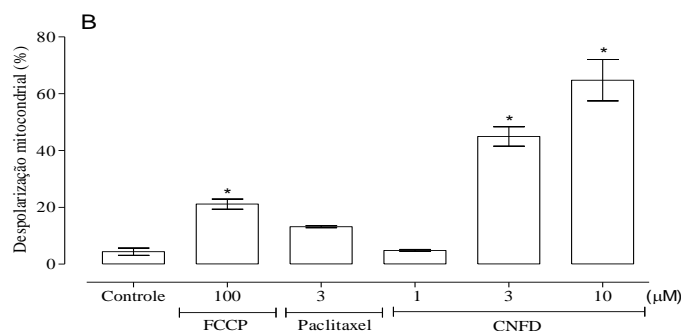


Gráfico 7 - Efeito de CNFD sobre a despolarização da membrana mitocondrial em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano

As células foram tratadas com as concentrações indicadas de CNFD, durante 24 horas e o potencial transmembrânico foi determinado por citometria de fluxo. (A) Histogramas representativos que mostram a percentagem de despolarização mitocondrial. (B) Quantificação do potencial de membrana mitocondrial utilizando sonda JC-1. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para diluir as substâncias. O paclitaxel (3 μM) foi usado como droga de referência e o FCCCP (100 μM) como controle positivo do teste. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento. Os valores correspondem à média ± desvio padrão, de três experimentos independentes, em duplicatas. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por teste de comparação múltipla de Newman-Keuls

5.13 Efeito de CNFD na expressão de genes relacionados a carcinogênese em células MCF-7

O efeito do CNFD sobre a expressão de genes envolvidos em diferentes mecanismos celulares, incluindo proliferação celular, ciclo celular, apoptose, metástase e angiogênese, foi detectado usando o TaqMan® Array Human Molecular Mechanisms of Cancer. A tabela 4 mostra os genes que apresentaram aumento e diminuição da expressão em células MCF-7 tratadas com CNFD. Os genes 18S e HPRT1 foram utilizados para a normalização da expressão gênica. Os genes foram considerados para ser regulados positivamente se $RQ \geq 2$, o que significa que a expressão do gene em células tratadas com CNFD foi pelo menos duas vezes mais se comparado com o controle negativo. De forma semelhante, considerou-se que os genes estavam regulados negativamente se $RQ \leq 0,5$, o que significa que a expressão do gene em células tratadas com CNFD era metade ou menos da metade do que em células do controle negativo.

Tabela 5 - Efeito de CNFD sobre a expressão de genes relacionados à carcinogênese em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.

Gene símbolo	Descrição	RQ	
		CNFD	Paclitaxel
Genes com regulação negativa - RQ <0,5 quando comparado ao controle DMSO			
AKT1	V-AKT murino timoma viral oncogene homólogo 1	0,236	0,250
BCAR1	Câncer de mama anti-estrógeno resistência 1	0,328	0,123
BCL2	CLL de células B / linfoma 2	0,000	0,219
BID	Agonista de morte no domínio de interação BH3	0,2939	0,000
CASP9	Caspase 9, cisteína peptidase relacionada com a apoptose	0,000	0,000
CCND1	Ciclina D1	0,386	0,687
CCND2	Ciclina D2	0,000	0,000
CDH1	Caderina 1, tipo 1	0,000	0,000
CDK2	Cinase dependente de ciclina 2	0,456	0,392
CDKN1B	Inibidor de cinase dependente de ciclina 1B (p27, Kip1)	0,500	0,520
CDKN2A	Inibidor de cinase dependente de ciclina 2A	0,000	0,000
CDKN2B	Inibidor de cinase dependente de ciclina 2B (p15, inibe CDK4)	0,000	0,000
COL1A1	Colágeno, tipo I, alfa 1	0,000	0,000
DVL1	Proteína de polaridade do segmento desalinhado 1	0,260	0,289
E2F1	fator de transcrição E2F1	0,347	0,374
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico	0,358	0,475
ELK1	ELK1, membro da família de oncogenes ETS	0,424	0,326
FADD	Fas (TNFRSF6) - associado via domínio de morte	0,354	0,000
FASLG	Fas (superfamília de TNF, membro 6)	0,000	0,000
FGF2	Fator de crescimento fibroblástico 2	0,180	0,000
FZD1	Classe frizzled receptor 1	0,143	0,224
GRB2	Proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento	0,307	0,357
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos (hepapoietina A, fator de dispersão)	0,000	0,000
HRAS	Harvey rato sarcoma viral oncogene homólogo	0,000	0,000
IGF1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1 (somatomedina C)	0,000	0,000
ITGA2B	Integrina, alfa 2b (glicoproteína plaquetária IIb do complexo IIb / IIIa, antígeno CD41)	0,000	0,000
ITGAV	Integrina, alfa V	0,359	0,233
ITGB1	Integrina, beta 1 (receptor de fibronectina, polipeptido beta, antígeno CD29 inclui MDF2, MSK12)	0,447	0,392
KDR	Receptor de domínio de insero de quinase	0,000	0,000
KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 homólogo do oncogene viral do sarcoma felino	0,000	0,000
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homólogo	0,484	0,327
LEF1	Fator 1 de ligação do intensificador linfóide	0,323	0,205
MAP3K5	Proteína ativada por mitógeno quinase, quinase, quinase 5	0,280	0,423
MAPK1	Proteína quinase ativada por mitógeno 1	0,453	0,343
MAPK14	Proteína quinase ativada por mitógeno 14	0,162	0,333
MAPK3	Proteína quinase ativada por mitógeno 3	0,300	0,147

Continuação da Tabela nº 5:

Gene símbolo	Descrição	RQ	
		CNFD	Paclitaxel
MDM2	MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitina proteína ligase	0,366	0,408
NRAS	Neuroblastoma RAS oncogene viral homólogo	0,231	0,805
PIK3CA	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase subunidade catalítica alfa	0,185	0,263
PIK3R1	Fosfoinositide-3-quinase regulador subunidade 1 (alfa)	0,173	0,419
PTK2	Proteína tirosina quinase 2	0,305	0,526
PTK2B	Proteína tirosina quinase 2 beta	0,000	0,000
RELA		0,000	0,000
RHOA	Ras membro familiar homólogo A	0,0000	0,0000
SOS1	Edição do homólogo sem série 1 (Drosophila)	0,417	0,870
TCF3	Fator de transcrição 3	0,226	0,252
TP53	Proteína tumoral p53	0,000	0,000
Genes sem alteração na expressão - RQ > 0,5 < 2 quando comparado ao controle DMSO			
ABL1	proto-oncogene 1 de ABL, não receptor de tirosina cinase	1,582	1,922
AKT2	V-AKT murino timoma viral oncogene homólogo 2	0,915	0,578
APC	Polipose adenomatoso coli	0,709	0,321
BAX	Proteína X associada a BCL2	0,916	0,191
BCL2L1	BCL2-like 1	0,725	0,624
BCL2L11	BCL2-like 11 (facilitador de apoptose)	0,874	0,959
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serina / treonina cinase	0,715	0,911
CASP8	Caspase 8, cisteína peptidase relacionada com a apoptose	0,715	0,907
CCND3	Ciclina D3	1,063	0,734
CCNE1	Ciclina E1	0,630	0,503
CDC42	Ciclo de divisão celular 42	1,488	0,964
CDK4	Cinase dependente de ciclina 4	0,992	0,891
CRK	V-CRK vírus do sarcoma aviário CT10 oncogene homólogo	0,652	0,517
CTNNB	Catenina (proteína associada à caderina), beta 1,88 kDa	0,563	0,588
CYCS	Citocromo C, somático	0,000	0,000
ERBB2	Erb-b2 receptor tirosina quinase 2	0,600	0,728
FAZ	Fas receptor da morte da superfície celular	0,634	0,000
FN1	Fibronectina 1	0,828	0,598
FYN	FYN proto-oncogene, Src família tirosina quinase	0,856	0,853
GSK3B	Glicogênio sintase quinase 3 beta	0,877	0,481
GUSB	Glucuronidase, beta	1,500	0,657
IGF1R	Receptor do fator 1 de crescimento tipo insulina	0,526	0,526
ITGB3	ITGB3 integrina, beta 3 (glicoproteína plaquetária IIIa, antígeno CD61)	0,643	0,461

Continuação da tabela 5:

Gene símbolo	Descrição	RQ	
		CNFD	Paclitaxel
JUN	Proto-oncogene jun	1,799	0,934
MAP2K1	Quinase cinase 1 ativada por mitogénio	0,856	0,981
MAPK8	Proteína quinase 8 ativada por mitogénio	0,591	0,745
MYC	V-myc myelocytomatosis aviário oncogene viral homólogo	0,689	0,588
NFKB1	Fator nuclear do promotor do gene polipeptídico leve kappa nas células B 1	0,718	0,701
NFKB2	Factor nuclear do promotor do gene polipeptídico leve kappa em células B 2 (p49 / p100)	0,825	1,641
NFKBIA	Fator nuclear do promotor do gene polipeptídico leve kappa no inibidor das células B, alfa	0,507	0,694
PTEN	Fosfatase e tensina	0,603	0,268
RAF1	proto-oncogene Raf-1, serina / treonina cinase	0,904	1,773
RB1	Retinoblastoma 1	0,719	0,468
SHC1	SHC (domínio de homologia Src contendo 2) proteína transformadora 1	0,643	1,243
SMAD4	SMAD membro da família 4	0,722	0,964
SPP1	Fosfoproteína 1 segregada	1,586	0,873
SRC	SRC proto-oncogene, não-receptor tirosina quinase	1,540	1,698
TGFB1	Fator de crescimento transformante, beta 1	0,645	1,236
TGFBR1	Fator de crescimento transformante, receptor beta 1	0,502	1,961
TGFBR2	Fator de crescimento transformante, receptor beta II	0,637	0,565
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A	1,227	1,283
Genes com regulação positiva - RQ > 2 quando comparado ao controle DMSO			
CDKN1A	Inibidor de cinase dependente de ciclina 1A (p21, Cip1)	3,0829	2,0539
FOS	Fos proto-oncogene, AP-1 fator de transcrição subunidade	5,2459	1,7519
MAX	MYC associado ao fator X	3,2269	122.650,406
RAC1	Substrato 1 de toxina botulínica C3 relacionado com ras (Família RHO, pequena proteína de ligação a GTP Rac1)	2,5859	1,0620

As células MCF-7 foram tratadas com 3 μ M de CNFD ou paclitaxel durante 12 h. Após o tratamento, o RNA total foi isolado e transcrito inversamente. A expressão gênica foi detectada utilizando a placa TaqMan® Array Human Molecular Mechanisms of Cancer 96. Os genes 18S e HPRT1 foram utilizados como gene endógeno para normalização. Os valores representam a quantificação relativa (RQ) em comparação com o calibrador (controle negativo, DMSO a 0,2%, RQ = 1,00). Os genes foram considerados regulados positivamente se RQ \geq 2 e foram considerados regulados negativamente se RQ \leq 0,5.

Na expressão gênica de ciclinas (CCNDs), as moléculas que estão envolvidas na progressão do ciclo celular (LIM; KALDIS, 2013), foi observada baixa regulação de CCND1 (RQ = 0,386) após tratamento com CNFD, enquanto que o controle positivo, paclitaxel, não foi capaz de reduzir a expressão deste gene (RQ = 0,687). Nos tumores, a amplificação e

hiperativação das quinases dependentes de ciclina (CDKs) é um dos mecanismos que contribui para a desregulação do ciclo celular, culminando na proliferação celular (PEYRESSATRE et al., 2015). Os tratamentos com CNFD e paclitaxel causaram uma sub-regulação de CDK2 (CNFD RQ = 0,456, paclitaxel RQ = 0,392). Além disso, o inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (CDKN1A) foi regulado positivamente em células tratadas com CNFD (RQ = 3,083), ao passo que foi superior ao tratamento com paclitaxel (RQ = 2,054).

As famílias MAPK desempenham um papel importante em programas celulares complexos como proliferação, diferenciação, desenvolvimento, transformação e apoptose (ZHANG; LIU, 2002). O tratamento com CNFD e paclitaxel reduziu a expressão de oncogenes importantes desta família, incluindo MAPK1 (CNFD RQ = 0,453, RQ paclitaxel = 0,343), MAPK3 (CNFD RQ = 0,300, RQ paclitaxel = 0,147), MAPK14 (CNFD RQ = 0,162, paclitaxel RQ = 0,333) e MAP3K5 (CNFD RQ = 0,281, paclitaxel RQ = 0,423).

A família RAS é composta de oncoproteínas GTPases, que participam na regulação de vias envolvidas no crescimento celular e motilidade (CASTELLANO; DOWNWARD, 2011). SOS1, um membro desta família, teve uma baixa regulação em células tratadas com CNFD (RQ = 0,417), enquanto paclitaxel não alterou a expressão deste gene (RQ = 0,870). Além disso, o tratamento com CNFD e paclitaxel inibiu a expressão do gene RHOA (CNFD RQ = 0,0, paclitaxel RQ = 0,0), que codifica uma proteína envolvida na motilidade celular.

Os tratamentos com CNFD e paclitaxel também causou uma diminuição na expressão de genes relacionados com a sobrevivência da célula, como tal AKT1 (CNFD RQ = 0,236; paclitaxel RQ = 0,251), PIK3R1 (CNFD RQ = 0,173; paclitaxel RQ = 0,419) e PIK3CA (CNFD RQ = 0,185, paclitaxel RQ = 0,263). As células tratadas com paclitaxel apresentaram menor expressão do gene anti-apoptótico BCL2 (RQ = 0,219), enquanto que no tratamento com CNFD, não foram detectados transcritos para este gene; contudo, o gene BID pró-

apoptótico, antagonista de BCL2, teve a expressão diminuída nas células tratadas com CNFD (RQ = 0,294) e não foi detectado em células tratadas com paclitaxel.

O tratamento com CNFD também induziu a regulação positiva dos genes FOS (RQ = 5,24) e MAX (RQ = 3,22). FOS é relacionado à resposta imediata e é rapidamente expresso (BAHRAMI; DRABLOS, 2016), enquanto o gene MAX é capaz de formar homodímeros e heterodímeros com membros da família, que incluem MAD, MXL1 e MYC, esses dímeros transcritos ativos podem promover a proliferação celular, bem como a apoptose (BANERJEE; HU; GOSS, 2006).

5.14 Efeito de CNFD na ativação das vias de sinalização das MAPKs: p-38, JNK e ERK1/2

Em seguida, foi explorado as vias de transdução de sinal subjacentes à apoptose induzida por CNFD. ERK1/2 são preferencialmente ativados por fatores de crescimento, enquanto que a proteína quinase NH₂-terminal de JNK e a p38 são preferencialmente ativadas por sinais indutores de stress celular, tais como stress oxidativo, stress ambiental e insultos químicos tóxicos (SUI et al., 2014). Assim, estudou-se cuidadosamente se a apoptose mediada por CNFD era regulada por proteínas quinases ativadas por stress, JNK e p38. Determinou-se o efeito de CNFD sobre as ações das MAPKs: JNK, p38 e ERK1/2. A Figura 14 mostra a fosforilação de JNK, p38 e ERK1/2 em células MCF-7 tratadas com CNFD num curto período de tempo (15-45 min) mostrando uma diferença significativa quando comparadas com o controle não tratado. O aumento dos níveis de proteína fosfo-p38 e fosfo-JNK em células MCF-7 tratadas com CNFD atingiu um pico aos 30 minutos após o tratamento, posteriormente os níveis começaram a diminuir gradualmente, enquanto o seu efeito na inibição de ERK1/2 ocorreu após 45 minutos com o tratamento com CNFD. Assim, os

resultados mostraram que a exposição de células MCF-7 a CNFD resultou numa rápida ativação das vias de sinalização JNK e p38 e diminuição da via de sobrevivência ERK1/2.

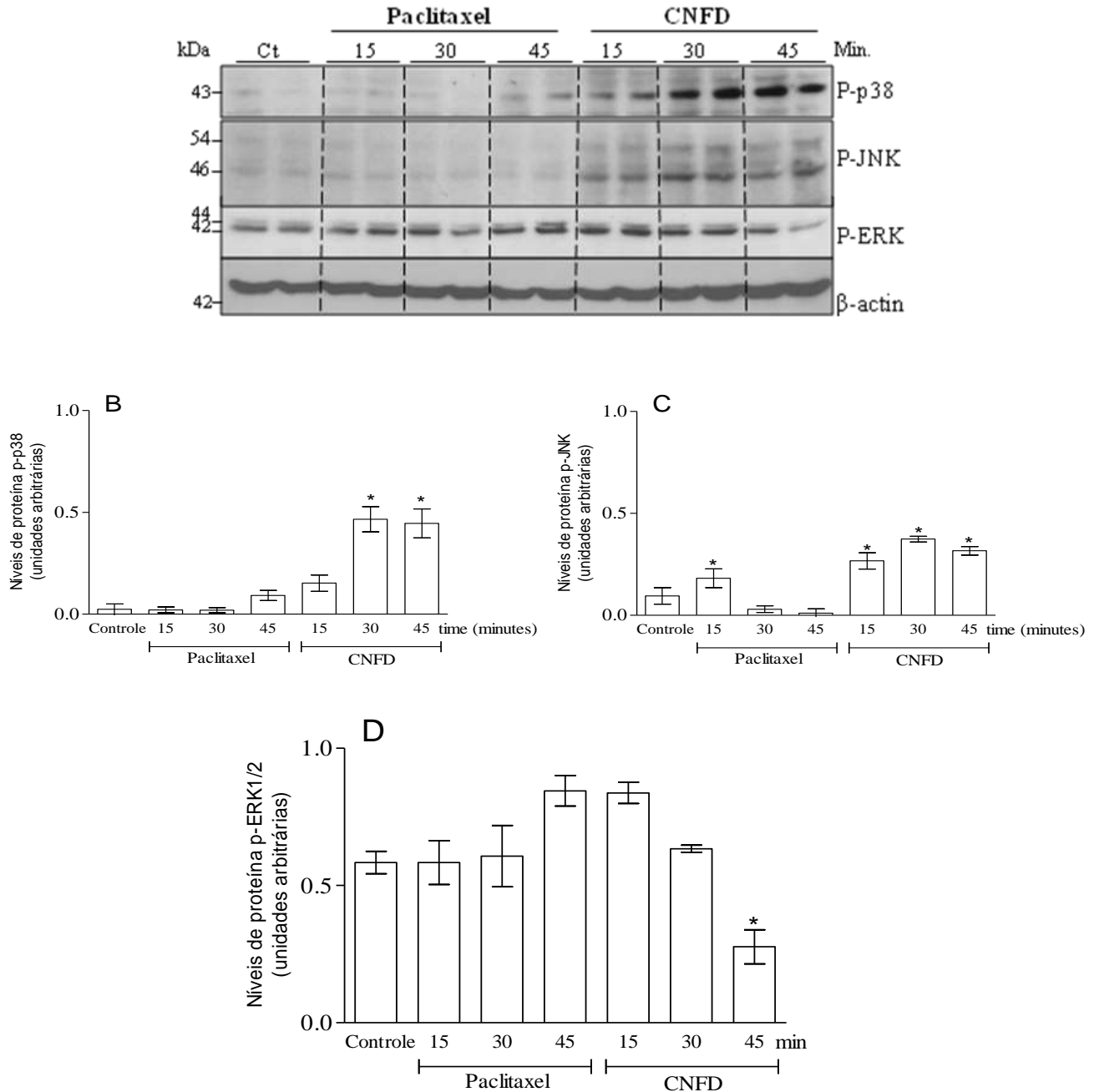


Figura 14 - Efeito de CNFD na expressão de fosfo-MAP quinases em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano.

(A) As análises de transferência de western blotting de fosfo-p38, fosfo-JNK e fosfo-Erk1/2 dos lisados celulares totais foram realizadas após tratamento indicado por CNFD (3 μ M) e Paclitaxel (3 μ M). (B) Respostas (unidades arbitrárias) de fosfo-p38 e sua respectiva beta-actina. (C) Fosfo-JNK e sua respectiva beta-actina. (D) Fosfo-ERK 1/2 e a sua respectiva beta-actina. Topo: imagem digitalizada de uma das três experiências separadas. Abaixo: resumo semi-quantitativo de três experimentos separados usando valores obtidos por análise densitométrica usando o software Image J. * p < 0,05 em comparação com controlo negativo por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls

5.15 Efeito antitumoral de CNFD em modelo murino de melanoma experimental

Os camundongos C57BL6 foram inoculados subcutaneamente com células de melanoma B16-F10 e tratados (intraperitonealmente) diariamente durante 13 dias consecutivos com CNFD para investigar a sua atividade antitumoral *in vivo*. A tabela 6 apresenta o peso dos tumores e o percentual de inibição observado após o tratamento com CNFD. Pode-se observar que o crescimento tumoral *in vivo* apresentou inibição de 46,8%, 50,7% e 52,9% nas doses de 10, 30 e 60 mg/Kg/dia, respectivamente. O controle positivo da doxorrubicina na dose de 0,5 mg/kg/dia inibiu o crescimento tumoral em 24%. Vale ressaltar, que apesar da dose de doxorrubicina utilizada ser menor que as doses de CNFD, esta é uma dose considerada segura, pois doses maiores de doxorrubicina são tóxicas aos animais.

Tabela 6 - Efeito de CNFD sobre a massa tumoral em camundongos inoculados com células B16F10

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Sobrevida	Tumor (g)	Inibição tumoral (%)
Veículo	-	9/10	4,89±2,69	-
Doxorrubicina	0,5	9/10	3,72±1,93*	24,0
CNFD	10	10/10	2,60±0,82*	46,88
CNFD	30	8/10	2,41±0,72*	50,71
CNFD	60	8/10	2,30±0,80*	52,95

Os valores do tamanho tumoral correspondem a média \pm desvio padrão. O controle negativo foi tratado com o veículo (salina + DMSO 2% + 2% Koliffor) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. A doxorrubicina foi usada como controle positivo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

5.16 Efeito de CNFD sobre a massa corpórea e massa úmida dos órgãos e nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos inoculados com células B16F10

O efeito tóxico sistêmico de CNFD em camundongos inoculados com células B16F10 foi avaliado após 13 dias de tratamento diário. A tabela 7 apresenta os resultados encontrados em relação à massa corpórea e massa úmida dos órgãos dos animais tratados. Nenhuma diferença foi encontrada na massa corpórea final dos animais tratados quando comparados com o grupo controle. Em relação à massa úmida dos órgãos (fígado, rins, pulmão e coração), também não foram observadas alterações significantes ($p > 0,05$). A tabela 8 apresenta os resultados encontrados em relação aos parâmetros hematológicos. Contudo, não foram encontradas diferenças entre os grupos em relação à quantidade de eosinófilos, basófilos, neutrófilos, linfócitos e monócitos. Em relação aos parâmetros bioquímicos, não foram encontradas alterações significantes nos níveis plasmáticos dos parâmetros bioquímicos analisados em nenhum dos grupos tratados, conforme mostra a tabela 9.

Tabela 7 - Efeito de CNFD sobre a massa corpórea e a massa úmida dos órgãos de camundongos inoculados com células B16F10

Tratamento	Dose (mg/Kg/dia)	N	Fígado	Rins	Pulmão	Coração	Peso inicial (g)	Peso Final (g)
			(g/100g de massa corpórea)	(g/100g de massa corpórea)	(g/100g de massa corpórea)	(g/100g de massa corpórea)		
Veículo	-	9	4,23±0,45	1,03±0,20	0,54±0,05	0,39±0,04	17,15±1,20	21,83±2,04
Doxorrubicina	0,5	9	4,86±0,97	0,99±0,17	0,65±0,08	0,39±0,06	17,05±1,75	20,94±1,82
CNFD	10	10	4,69±0,50	1,05±0,28	0,59±0,05	0,41±0,06	16,85±1,63	22,85±1,24
CNFD	30	8	4,81±0,83	1,28±0,20	0,56±0,18	0,45±0,12	20,15±1,17	21,85±1,87
CNFD	60	8	4,63±0,87	1,03±0,09	0,66±0,05	0,47±0,08	13,5±1,58	15,81±0,99

Os valores correspondentes à média ± desvio padrão. O controle negativo foi tratado com o veículo (salina+ DMSO 2% + Koliffor 2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. A doxorrubicina foi usada como controle positivo.

Tabela 8 - Efeito de CNFD sobre os parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos inoculados com células B16F10

Tratamento	Dose (mg/Kg/dia)	N	Eritrócitos (10 ⁶ cél./μL)	Leucócitos totais (10 ³ cél./μL)	Contagem diferenciada de leucócitos (%)				
					Basófilos	Eosinófilos	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos
Veículo	-	9	4,06±0,80	2,70±2,03	0,0±0,0	0,2±0,44	25,8±4,26	71,6±2,60	2,4±2,50
Doxorrubicina	0,5	9	3,73±0,57	2,96±1,02	0,0±0,0	0,0±0,0	27,6±5,54	71,6±6,54	0,8±1,09
CNFD	10	10	3,72±1,56	2,34±5,53	0,0±0,0	0,2±0,44	27,0±6,28	68,8±6,76	4,0±1,87
CNFD	30	8	3,67±2,27	2,44±6,69	0,0±0,0	0,0±0,0	31,0±9,84	67,6±10,06	1,4±2,60
CNFD	60	8	3,00±0,82	3,35±1,73	0,0±0,0	0,2±0,44	29,0±13,3	66,8±10,8	4,0±2,0

Os valores correspondem a média ± desvio padrão. O controle negativo foi tratado com o veículo (salina+ DMSO 2% + Koliffor 2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. A doxorrubicina foi usada como controle positivo. **p* < 0,05 quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

Tabela 9 - Efeito de CNFD sobre os parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos inoculados com células B16F10

Parâmetro	Veículo n=5	Doxorrubicina 0,5 mg/Kg/dia n=5	CNFD 10 mg/Kg/dia n=5	CNFD 30mg/Kg/dia n=5	CNFD 60 mg/Kg/dia n=5
TGP (ALT)	146,0±49,93	120,4±38,27	95,6±27,75	90,8±45,0	116,6±28,58
Gama-GT	13,2±5,80	12,4±7,73	7,6±2,30	7,0±1,58	10,6±3,50
Fosfatase alcalina	32,4±9,23	30,2±3,42	26,0±5,0	29,6±7,23	34,4±8,90
Bilirrubina total	0,2±0,07	0,1±0,09	0,12±0,04	0,22±0,08	0,2±0,1
Amilase	1426,2±168,89	1853,4±303,43	1857,4±384,10	2178,2±533,39	1834,25±483,76
BUN (uréia nitrogenada)	24,98±5,11	26,78±4,27	33,38±9,23	59,18±27,42	22,18±8,45
Creatinina	0,62±0,04	0,64±0,11	0,68±0,17	0,82±0,19	0,6±0,07
BUN/Creatinina	40,18±6,91	32,1±8,76	52,4±21,17	73,48±30,47	37,82±17,49
Glicose	195,0±36,04	156,6±32,05	128,2±49,32	177,78±46,46	173,25±59,63
Fósforo	13,0±2,27	15,32±1,10	15,38±2,16	13,62±2,89	16,04±2,49
Cálcio	8,9±1,10	9,67±1,90	9,32±1,68	9,34±1,39	8,18±1,03
Ác. Úrico	1,05±0,07	1,30±0,14	1,85±0,88	1,36±0,28	1,10±0,42
Colesterol	74,25±22,17	109,0±29,81	79,6±21,86	80,2±14,97	91,6±21,38
Albumina	2,48±0,16	3,2±0,57	2,96±0,36	3,06±0,27	2,84±0,47
Proteínas totais	2,50±0,28	2,90±0,55	3,1±0,50	3,02±0,23	2,25±0,05

Os valores correspondem a média ± desvio padrão. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. A doxorrubicina foi usada como controle positivo.

5.16.1 Análises histológicas dos tumores e órgãos relacionados ao metabolismo de fármacos

Todas as análises foram realizadas através de microscopia de luz, nos aumentos finais de 4x, 100x, 200x e 400x (quando necessário). Além da coloração de rotina (H/E), os cortes de fígado foram submetidos a coloração pelo PAS, de forma a demonstrar que os vacúolos citoplasmáticos observados nos cortes tratavam-se efetivamente de degeneração hidrópica e não "arraste de glicogênio".

Em cada grupo, foram analisados os tumores e órgãos de 5 animais, sendo que as descrições abaixo consideram a totalidade das alterações encontradas em cada grupo.

Tumor: Em todos os grupos analisados, observou-se presença de neoplasia maligna cujas células tumorais exibem intenso pleomorfismo, variando de ovais a poliédricas, arranjadas em pequenos aglomerados ou raros cordões de células. Estas células exibiram ainda cromatina grumosa, abundante, bem como citoplasma volumoso e pigmento melânico intracelular sendo um achado frequente. Mitozes atípicas foram visualizadas. O estroma, por sua vez, era escasso, porém bem vascularizado, exibindo muitos vasos congestos e áreas de inflamação. Em todos os grupos, observou-se invasão muscular.

Nos grupos tratados com CNFD (10, 30 e 60 mg/Kg/dia) e doxorubicina, foi visualizada extensa necrose tumoral, inflamação e inclusive áreas de microabcesso. Além disso, no grupo CNFD 60 mg/Kg/dia, as células tumorais pareciam arranjadas de forma mais organizada e o tumor estava mais delimitado.

Fígado: O controle negativo foi tratado com o veículo (salina) + DMSO 2% + Koliflor 2%. De forma geral, observou-se uma desestruturação arquitetural em todos os fígados analisados, inclusive com dilatação dos vasos que compõem o sistema porta.

Outros achados bem evidentes e frequentes foram: necrose de coagulação centrolobular, congestão, inflamação e degeneração hidrópica. Ressalta-se que estas alterações foram importantes, dispersas pelo órgão e proeminentes.

No grupo tratado com o controle positivo doxorrubicina (0,5 mg/Kg/dia), o tecido hepático também encontrava-se com a sua anatomia comprometida, sendo observada necrose de coagulação, inflamação mista, congestão e degeneração hidrópica. Esses eventos estavam distribuídos de forma dispersa pelo órgão. Ressalta-se que, dos 5 animais analisados, três mostravam esses aspectos mais proeminentes.

No grupo tratado com CNFD (10 mg/Kg/dia), a arquitetura do tecido hepático estava mais preservada. Contudo, necrose de coagulação, inflamação aguda, congestão e degeneração hidrópica foram observadas nos fígados deste grupo. Ressalta-se que as alterações histológicas observadas foram mais discretas quando comparadas aos grupos controle negativo, doxorrubicina, CNFD (30 e 60 mg/Kg/dia).

No grupo tratado com CNFD (30 mg/Kg/dia), as alterações histológicas (necrose, inflamação, congestão) foram menos evidentes quando comparadas aos grupos controle negativo, doxorrubicina, CNFD (60 mg/Kg/dia).

No grupo tratado com CNFD (60 mg/Kg/dia), as alterações histológicas (necrose, inflamação, congestão) foram menos evidentes quando comparadas aos controles positivo e negativo. Entretanto, hemorragia focal foi um achado frequente.

Pulmão: Os aspectos histológicos (hemorragia, atelectasia, congestão) observados neste órgão foram bem distribuídos em todos os animais e, portanto, pode estar relacionado a forma de morte dos animais.

No grupo controle negativo, as alterações arquitetural/morfológica significativa foram moderadas. Observou-se, com frequência, atelectasia, enfisema, inflamação aguda importante, congestão e hemorragia, além de nódulos tumorais em três animais.

No grupo controle positivo, as alterações arquitetural/morfológicas significantes foram moderadas. Observou-se, com frequência, atelectasia, enfisema, inflamação aguda importante, congestão e hemorragia. Somente em um animal observamos nódulo e êmbolos tumorais.

Nos grupos tratados com CNFD (10 e 30mg/Kg/dia), as alterações arquiteturais/morfológicas significantes foram moderadas. Observou-se, com frequência, atelectasia, enfisema, inflamação aguda importante, edema, congestão e hemorragia.

No grupo tratado com CNFD (60mg/Kg/dia), as alterações arquiteturais/morfológicas significantes variaram de moderadas a intensas. Observou-se, com frequência, atelectasia, enfisema, inflamação aguda importante, congestão e hemorragia. Somente em um animal observou-se nódulo tumoral.

Coração : Em todos os grupos, não havia alterações arquitetural e morfológicas dignas de nota, para todos os órgãos analisados, independente do grupo experimental. Contudo, êmbolo tumoral foi observado obstruindo uma das câmaras cardíacas de um animal do grupo CNFD (60 mg/kg/dia).

Rins : Em todos os grupos, de forma geral não houve diferença morfológica. As alterações descritas, neste órgão, foram; congestão focal, hemorragia, esclerose glomerular, dilatação tubular, inflamação focal, além de vacuolização de células epiteliais tubulares e necrose glomerular e tubular. Ressalta-se que estas características foram menos acentuadas nos grupos doxorrubicina e CNFD (10 mg/Kg/dia).

A figura 15 mostra fotografias representativas da coloração de hematoxilina e eosina e as principais alterações morfológicas observadas nos diferentes tipos de tratamento.

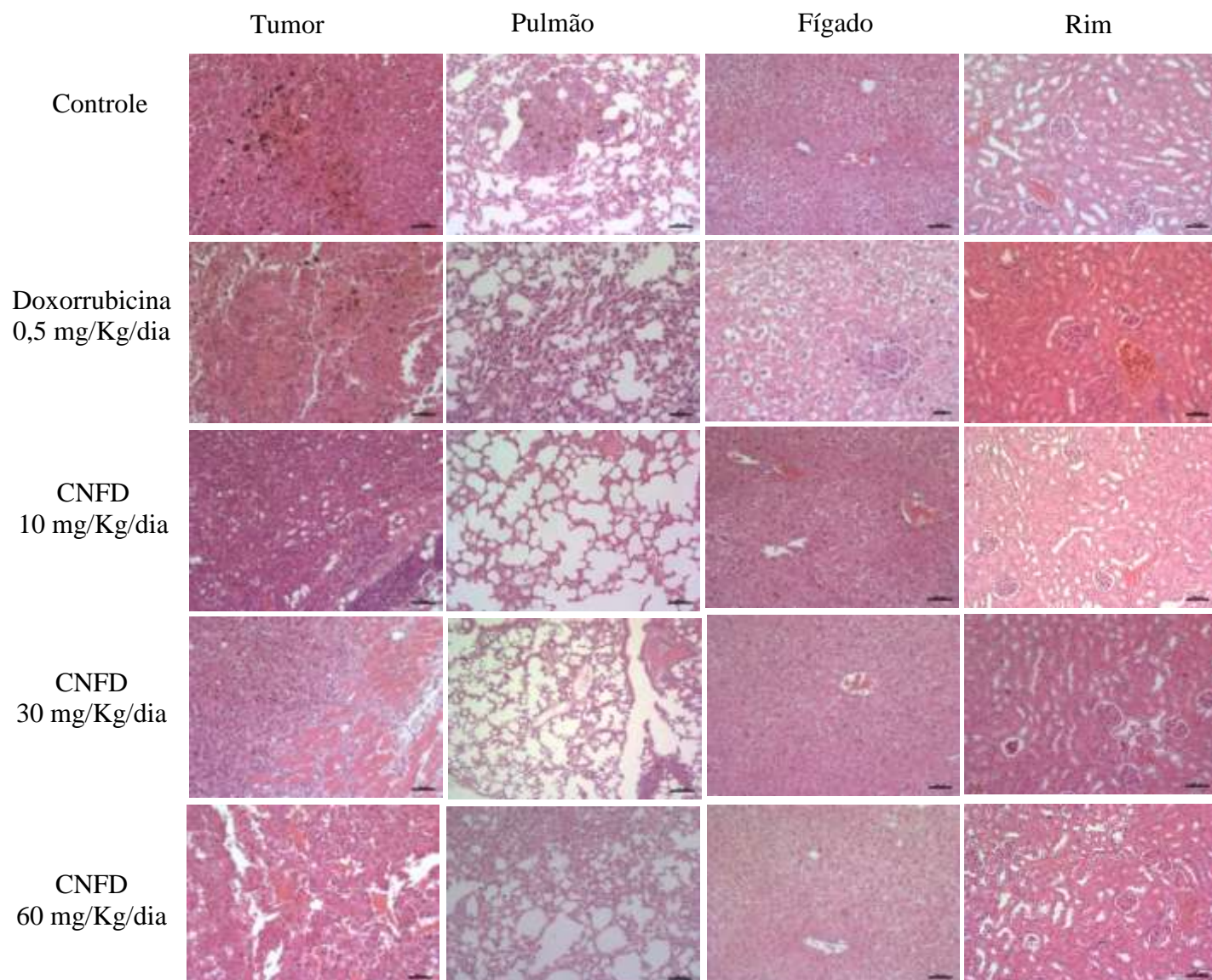


Figura 15 - Histopatologia de tumores extirpados, pulmões, fígados e rins de camundongos tratados com CNFD. Fotografias representativas da coloração de H & E. Ampliação de microscopia óptica, 400x. Barra de escala 100 µm. A doxorrubicina (0,5 mg/kg/dia) foi utilizada como controle positivo. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir a substância testada (2% de DMSO + 2% de Kolifor em solução salina).

6. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços no campo da descoberta de fármacos, a prevenção e o controle do câncer ainda representam um desafio, devido às características particulares de cada tipo de câncer, aos mecanismos de resistência e ao amplo espectro de efeitos colaterais (VENDRAMINI-COSTA et al., 2016).

Embora a demanda por novos compostos químicos e moléculas biologicamente ativas continuem a crescer, os químicos medicinais começaram a explorar o vasto conjunto de compostos potencialmente ativos (AGALAVE; MAUJAN; PORE, 2011), e que podem servir como exemplo desta estratégia, destacam-se as naftoquinonas. Foi nesse contexto que este trabalho, teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico de uma nova naftoquinona sintetizada a partir da Lausona.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são importantes para verificar a toxicidade de novos compostos nos estágios iniciais de desenvolvimento de um fármaco. Também são úteis e necessários tanto para definir a toxicidade basal, como para definir o limite de concentração para os testes *in vitro* posteriores. Além de também fornecer informações significativas sobre outros parâmetros celulares a serem pesquisados (PUTNAM; BOMBICK; DOOLITTLE, 2002).

Neste trabalho, foi utilizado o método alamar blue e o composto em estudo 6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) -diona) (CNFD) mostrou-se um potencial agente antitumoral sendo capaz de inibir a proliferação celular em diferentes linhagens tumorais, como SK-MEL 19, 28 e 103, HCT-116, MCF-7, MESA/Dx5 e B16F10, conforme dados mostrados na tabela 1. Destaca-se os valores de CI_{50} de CNFD na linhagem MCF-7 foram menores quando comparados ao controle positivo doxorrubicina.

O efeito citotóxico observado por CNFD corrobora com inúmeros trabalhos descritos na literatura nos quais citam o potencial antitumoral de uma série de naftoquinonas e seus derivados.

Como é o caso do trabalho realizado Jimenez-Alonso e seus colaboradores (2011) no qual relatam em seu estudo a síntese de novos derivados de 2-amino-nafto [2,3-b] furan-4,9-diona. Foi observado pelo ensaio da sulforrodamina B, que após 48 horas de tratamento o composto 4 (2-tert-butilamino-3-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona) mostrou seletividade para a linhagem hormônio-dependente MCF-7/BUS com um valor de CI_{50} de 9,2 μ M. E os compostos 6 e 8 (2-tert-butilamino-3-furan-3-il-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona e 2-benzilamino-3-ciclohexil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona) mostraram relativa citotoxicidade contra as linhagens MCF-7, MCF-7/BUS e SK-BR-3. O menor valor de CI_{50} foi observado para o composto 6 em células SK-BR-3 que foi igual a 1,6 μ M.

Sete naftoquinonas e nove antraquinonas foram isolados a partir das raízes de *Aloe dawei* no estudo realizado Abdissa e seus colaboradores (2014). Após tratamento de 48 horas (MCF-7) e 72 horas (MDA-MB-231) os efeitos citotóxicos foram avaliados pelos métodos Presto Blue (MCF-7) e Alamar Blue (MDA-MB-231) e foi verificado que dois dos compostos isolados, 5,8-di-hidroxi-3-metoxi-2-metil-naftaleno-1,4-diona e 1-hidroxi-8-metoxi-3-metilantraquinona, mostraram elevada atividade citotóxica (CI_{50} 1,15 μ M e 4,85 μ M) na linhagem MCF-7.

Evidenciando a atividade citotóxica de compostos naftoquinônicos Zhang e seus colaboradores (2015) sintetizaram uma série de furanonaftoquinonas com base na estrutura molecular da nafto [2,3-b] furano- 4,9-diona obtida a partir do extrato aquoso da entrecasca da *Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb. O potencial citotóxico foi avaliado pelo método MTT após 72 horas de incubação, os compostos 5-hidroxi- 2-(1-

hidroxi-etil)-nafto[2,3-b]furano-4,9-diona e 2-(1,2-diidroxi-1-metil-etil)-5-hidroxi-nafto[2,3-b]furano-4,9-diona produziram citotoxicidade nas linhagens tumorais A549, MCF-7 e SiHa, em especial destaca-se a citotoxicidade em células MCF-7 cujos os valores de CI_{50} dos compostos foram de $0,89\pm 0,11$ e $1,89\pm 0,40$ nmol/mL, respectivamente.

Ao analisar os valores de CI_{50} foi observado que CNFD apresentou citotoxicidade menor que a doxorrubicina na linhagem MRC5. Este resultado está de acordo com o trabalho de Freire e seus colaboradores (2010), o qual apresentou resultados semelhantes quanto a citotoxicidade de CNFD, ao mostrar que este composto na concentração de $52,5 \mu\text{M}$ induziu em 20% a morte celular em fibroblastos murinos (NIH 3T3) ao comparar com o controle positivo doxorrubicina que promoveu 36% de morte celular na concentração de $23 \mu\text{M}$ após 72h de tratamento, sendo a doxorrubicina mais citotóxica que CNFD nessas condições.

Por meio dos dados obtidos pelo ensaio de alamar blue, foi observado que CNFD apresentou maior seletividade para a linhagem MCF-7. Nos ensaios posteriores, o efeito antiproliferativo de CNFD em células MCF-7 foi confirmado pelo teste de exclusão do corante azul de tripano, no qual foi possível observar uma redução significativa do número de células viáveis quando tratadas por 12, 24 e 48 horas na presença de $3 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$ de CNFD. Desta forma, certifica-se que esta naftoquinona apresenta de fato atividade citotóxica em células de adenocarcinoma de mama humano. E com base em diferentes ensaios, foi realizada a tentativa para se investigar os mecanismos envolvidos na morte celular induzida por CNFD.

A análise morfológica das células tratadas durante 24 horas com diferentes concentrações de CNFD, coradas com hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia de luz mostrou condensação e/ou fragmentação da cromatina, presença de

corpos apoptóticos que são considerados como característicos de apoptose. Após 48 horas de tratamento foram observadas alterações morfológicas como cariorrexe e cariólise, fragmentação celular e presença de núcleos desnudos. Levando em consideração que este estudo está sendo realizado com cultura de células, não há a presença de macrófagos e, portanto não existe a possibilidade das células sofrerem fagocitose, por esse motivo às células podem entrar num processo conhecido como apoptose tardia/necrose.

O estudo de revisão realizado por Cruchten e Broeck (2002) descreve o processo de apoptose tardia /necrose, e afirma que esta terminologia parece estranha, porque necrose e apoptose são muitas vezes consideradas como duas formas opostas de morte celular. Os autores descrevem que a necrose é marcada por inchaço celular, muitas vezes acompanhada de condensação da cromatina e que leva a lise celular e nuclear. Aparentemente, as células em apoptose que não são fagocitadas mostram várias dessas características necróticas.

Tem sido reconhecido que a regulação alterada do ciclo celular é uma indicação do crescimento tumoral por isso constitui um importante alvo no tratamento do câncer (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005). A análise do ciclo celular apresentada na tabela 4, mostrou que no intervalo de 24 e 48 horas, CNFD induziu o acúmulo de células MCF-7 em sub-G₁. Além disso, foi observado no ensaio de expressão gênica o aumento da expressão do gene CDKN1A (ciclina dependente quinase inibidor 1A), importante regulador do ciclo celular, seu produto genético p21 (waf1/cip1) medeia várias atividades biológicas principalmente por ligação e inibição da atividade das cinases dependentes de ciclina (CDKs) conduzindo à parada do crescimento em estádios específicos no ciclo celular (ABBAS; DUTTA, 2009). Sabe-se que a fase sub-G₁ corresponde a um grupo de células com dano no material genético, ou seja, formação de

células apoptóticas. Isso sugere uma possível indução de apoptose com fragmentação do DNA internucleossomal como um dos mecanismos de ação de CNFD.

Corroborando nossos resultados Kretschmer e seus colaboradores (2012) demonstram que dois derivados da shikonina (dimetilacrilshikonina e uma mistura de α -metilbutirilshikonina e isovalerilshikonina) isolados de raízes de *Onosma paniculata* conduziram a um número crescente de células na região sub-G1 em células de diferentes linhagens de melanoma, causada possivelmente por morte celular apoptótica. Da mesma forma Sagar e seus colaboradores (2014) relatam o aumento da fração apoptótica sub-G1 detectada após tratamento de 24 horas com plumbagina e acetilplumbagina (5 μ M e 10 μ M) em células MCF-7.

A indução da apoptose é usada como estratégia para o tratamento do câncer. A compreensão da apoptose forneceu a base para novas terapias direcionadas para a quimioterapia do câncer (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005). A apoptose é uma forma de morte celular, que desempenha papel importante durante o desenvolvimento e a homeostasia dos organismos multicelulares. Muitas evidências mostram que a apoptose requer maquinário especializado (GERL; VAUX, 2005; GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005).

A fosfatidilserina ocorre exclusivamente na camada interna da membrana plasmática em células viáveis, mas fica exposta na camada externa normalmente durante as fases iniciais da apoptose e antes da perda da integridade da membrana (MARINÑO; KROEMER, 2013). A externalização da fosfatidilserina foi verificada nas células MCF-7 tratadas com CNFD, conforme os resultados obtidos e descritos no gráfico 2, observou-se que após 24 horas, houve um aumento no número de células marcadas com anexina-V FITC, indicando um processo de apoptose. Após 48 horas, as células passaram a receber a dupla marcação de anexina-V FITC (+)/PI(+), indicando

que o processo apoptótico evolui para o estágio de apoptose tardia e posteriormente para necrose. De fato, no trabalho de Hussein e seus colaboradores (2013) foi demonstrado que as naftoquinonas possuem capacidades de interagir com os fosfolipídios da membrana plasmática e induzir sua desorganização.

Estes resultados corroboram com o trabalho realizado por Kiran Aithal e seus colaboradores (2009) no qual demonstram que após 12 horas de tratamento com 5 μM de juglona (5-hidroxi-1, 4-naftoquinona), a maioria das células B16F1 eram positivamente marcadas com anexina-V FITC, e após 24 horas esse processo mudou drasticamente devido o aumento de células duplamente marcadas com anexina-V FITC (+)/PI(+), revelando desta forma, que a morte celular causada por juglona é devido tanto a apoptose como a necrose.

De forma semelhante, Kumar e seus colaboradores (2009) relataram que o tratamento de células de melanoma (B16F1) com 5 μM ; 10 μM e 20 μM de 1,4-naftoquinona durante 12 e 24 horas resultou em aumento da porcentagem de Anexina V (+) e PI (+) em um tempo e concentração de modo dependente indicando a possibilidade de morte celular por apoptose e necrose.

A capacidade das naftoquinonas em induzir apoptose e necrose, também foi evidenciada no trabalho realizado por Marinho-Filho e seus colaboradores (2010), ao verificar que (+)-cordiaquinona J, uma 1,4-naftoquinona isolados a partir das raízes de *Cordia leucocephala*, nas concentrações de 1,5 μM e 3 μM após 3 horas de tratamento em células HL-60, promoveu uma rápida indução de apoptose, tal como indicado pela externalização da fosfatidilserina, e uma rápida indução da necrose, como indicado pela perda da integridade da membrana e por alterações morfológicas.

Lee e seus colaboradores (2014) observaram que em células gástricas humanas o tratamento com 1, 2 e 4 μM de shikonina por 6 horas aumentou significativamente as

células marcadas com iodeto de propídio (PI-positivas e anexina V-negativa). No entanto, após 24 horas de tratamento, shikonina induziu necrose e apoptose (anexina V-positiva) de um modo concentração dependente.

A iniciação da apoptose resulta de sinais de duas vias distintas, mas convergentes: as vias extrínseca e intrínseca. A via intrínseca é muitas vezes referida como a morte celular mediada pela mitocôndria, e resulta na ativação do iniciador caspase-9. A caspase-8 é a caspase iniciadora da via extrínseca, que também é conhecida como a via induzida pelo receptor de morte (FULDA; DEBATIN, 2006). As caspases são sintetizadas em sua forma inativa (pró-caspase) que quando clivadas em seus resíduos de cisteínas tornam-se ativas e vão fosforilar outros substratos intracelulares formando uma cascata que culmina na morte celular (CHEUNG; ARORA; KORNELUK, 2006)

Conforme mostrado no gráfico 3, no presente estudo foi verificado que o composto CNFD promoveu a ativação da caspase-9, sugerindo que a apoptose observada nos ensaios anteriores pode ter sido induzida pela via intrínseca. Além disso, no experimento de expressão proteica por western blotting foi confirmado aumento da expressão de caspase-3 clivada após o tratamento de células MCF-7 com CNFD nas concentrações de 3 e 10 μM por 24 horas.

Este resultado corrobora com vários estudos que mostram que a ação citotóxica de outras naftoquinonas, também envolve a ativação de caspases, como é o caso do trabalho realizado por Su e seus colaboradores (2010) no qual observaram que a furano-1,2-naftoquinona após 12 horas promoveu apoptose em células de carcinoma de pulmão (A549) pela via intrínseca envolvendo a modulação de proteínas da família Bcl-2, libertação de citocromo c, e a subsequente ativação de caspase-9. Da mesma forma, dois trabalhos relatam que o composto nafto[1,2-b]furan-4,5-diona (NFD) induz

apoptose em células de carcinoma de mama (MDA-MB-231) e carcinoma hepatocelular (Hep3B) com externalização de fosfatidiserina e ativação de caspase-3 e caspase-9 de um modo dependente do tempo (CHIU et al., 2010; LIN et al., 2010).

Baloch e seus colaboradores (2015) pesquisaram uma série de novos derivados de shikonina e observaram que o composto 40 denominado 1-(5,8-diidroxí-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-3-il)-4-metilpent-3-en-1-il-2-((3aR,4S,7S,7aS)-1,3-dioxo3a,4,7,7-tetrahidro-1H-4,7-metanoisoindol-2(3H)-il)-3-fenilpropanoato exibia efeitos anti-proliferativos maiores que a shikonina. Para uma investigação mais aprofundada dos mecanismos, foram realizados experimentos de western blotting e descobriram que a caspase-9 era ativada por clivagem, mas a caspase-8 mantinha-se inalterada.

Sabe-se que as quinonas participam de um ciclo redox, em que sofrem uma redução a hidronaftoquinona e subsequente oxidação, gerando EROs e conduzindo assim ao estresse oxidativo (WELLINGTON, 2015). O estresse oxidativo é considerado uma condição importante para promover a morte celular em resposta a ativação de uma série de vias de sinalização e também de mediadores da apoptose por meio de um mecanismo dependente da mitocôndria (BIRONAITE et al., 2004; FLEURY; MIGNOTTE; VAYSSIÈRE, 2002).

No presente trabalho, conforme os resultados obtidos e descritos no gráfico 4, observou-se que após 3 horas, CNFD (3 e 10 μM) apresentou um perfil de aumento na produção de EROs. Além disso conforme mostra o gráfico 6, o efeito do CNFD na viabilidade celular foi parcialmente protegido pelo antioxidante NAC, corroborando com esta hipótese; contudo, isto é improvável que seja o único mecanismo pelo qual o CNFD promove a morte celular.

O aumento na produção de EROs observado por CNFD corrobora com inúmeros trabalhos descritos na literatura nos quais citam a capacidade indutora de uma série de

quinonas, em destaque as naftoquinonas e seus derivados na produção de EROs (CRIDDLE et al., 2006; FARIAS et al., 2014; ROSS et al., 2011; SU et al., 2005; TIAN et al., 2012).

A capacidade das naftoquinonas produzirem EROs está associada a várias propriedades da molécula, tais como: o seu potencial de redução, os substituintes presentes, bem como a posição em que se encontram. Ollinger e Brunk (1991) avaliando a presença do substituinte hidroxila ligado em diferentes posições na molécula 1,4-naftoquinona em hepatócitos de rato observaram que: (i) a capacidade de induzir EROs é influenciada pela quantidade de substituintes presentes na molécula, (ii) a substituição no anel quinônico com hidroxila diminui a toxicidade, enquanto no anel benzeno aumenta, (iii) a polaridade da molécula interfere no consumo de oxigênio, (iv) os compostos com hidroxila no anel benzeno causam alta oxidação da glutathione, formando a glutathione dissulfeto, diminuindo a capacidade da célula na remoção de radicais livres.

Su e seus colaboradores (2005) verificaram que um derivado de antraquinona natural isolado de *Rheum palmatum* L., a emodina (1,3,8-trihidroxil-6-metil antraquinona) na concentração de 50 μ M aumentou a geração de EROs em células A549, nos tempos de 0,5; 1; 2; 4 e 6 horas. Os níveis relativos de EROs eram elevados nos primeiros 30 minutos após o tratamento de emodina e persistentemente aumentavam com o tempo de exposição.

Criddle e seus colaboradores (2006) relataram em seu trabalho as ações de menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona; vitamina K) na produção de EROs em tempo real utilizando microscopia confocal em células acinares pancreáticas murina. Estável fluorescência basal foi observada em células carregadas com CM-H₂DCFDA, indicando ausência de auto-oxidação do corante. A aplicação de menadiona (30 μ M) induziu o

aumento claro e significativo de fluorescência que foi generalizada em toda a célula, indicativo de uma elevação de EROS, este aumento de EROS começou imediatamente após exposição a menadiona e continuou até a um nível máximo que foi atingido após aproximadamente 5 minutos da sua aplicação.

Ross e seus colaboradores (2011) observaram que 10 μM das naftoquinonas diméricas BiQ2 e BiQ11, induziram aumento de EROs em células de câncer de próstata (PC-3, DU-145, LNCaP, 22RV1) após 2 horas de tratamento verificou-se a marcação de células fluorescentes.

Tian e seus colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento de plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona) em diferentes concentrações (2,5; 5,0; 7,5 e 10 μM) após 24 horas induziu significativamente a produção de EROs em células de osteossarcoma humano (MG63 e U2OS).

Derivados de naftoquinonas também apresentam a capacidade de induzir produção de EROs conforme demonstra o trabalho de Farias e seus colaboradores (2014) no qual analisaram derivados de 3-acil-2-fenilamino-1,4-naftoquinona e observaram que após 2 horas de exposição com os compostos DPB4 e DPB1, houve um aumento significativo na produção de EROs em células MCF-7 de 10 e 8 vezes maior quando comparado com o controle negativo.

A citotoxicidade das naftoquinonas é explicada pela capacidade destas substâncias de produzirem espécies reativas de oxigênio (EROs) como superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e por último o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (DA SILVA et al., 2003). Neste trabalho foi possível observar na figura 13, que de fato que CNFD nas concentrações de 1, 3 e 10 μM induziu significativamente a produção de ânion radical superóxido após 1, 3 e 6 horas de tratamento em células MCF-7. Os resultados obtidos, somados aos trabalhos previamente realizados mostram evidências que as naftoquinonas

geram ânion radical superóxido, como mostra a pesquisa realizada por Cojocel e seus colaboradores (2006) observaram um aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ dependente da concentração e do tempo quando microsomas de fígado, rim e pulmão foram incubados com 5, 15, 30 e 50 nmoles/mL de menadiona.

Klaus e seus colaboradores (2010) observaram a formação de superóxido em células HaCaT expostas a 50 μ M de diferentes naftoquinonas durante 60 minutos analisada por meio de oxidação de hidroetidina a oxietídio. Curiosamente, a formação de oxietídio foi mais evidente em células expostas a menadiona, seguido de plumbagina, 1,4-naftoquinona, juglona e quase nenhuma geração de superóxido foi detectada em células expostas a lausona e lapachol.

Várias mudanças na biogênese e na função da mitocôndria estão associadas com a indução de apoptose (DAM; MITCHELL; QUADRILATERO, 2013). A queda do potencial da membrana mitocondrial ocorre antes da fragmentação do DNA em fragmentos oligonucleossomal (SELLAME; BLACKER; DUCHEN, 2012). Desta forma, verificou-se que CNFD apresentou efeito na despolarização mitocondrial na linhagem MCF-7, conforme dados mostrados no gráfico 7.

O efeito de despolarização mitocondrial observado pela ação de CNFD corrobora com outros trabalhos discutidos na literatura, como é o caso de Hallak e seus colaboradores (2013) que relatam o efeito de uma nova cloronaftoquinona na indução de inchaço de mitocôndrias de fígado isolado de rato e uma redução precoce do potencial de membrana mitocondrial em células intactas, indicativo de um efeito direto sobre as mitocôndrias, além disso, o efeito foi seguido por liberação de citocromo C e ativação de caspase-3.

Da mesma forma, Pedroza e seus colaboradores (2014) verificaram que uma naftohidroquinona provocou despolarização das mitocôndrias e ativação de caspase-3

em células de linfoma, implicando assim a via intrínseca apoptótica como mecanismo para a morte celular induzida pela naftohidroquinona.

A experiência de expressão gênica indicou que CNFD aumentou a expressão dos genes CDKN1A, FOS, MAX e RAC-1 e reduziu a expressão do gene inibitório de apoptose BCL2, dados mostrados na tabela 5.

Pode-se associar o resultado observado pelo aumento da expressão de RAC-1 e correlacioná-lo com a ativação de p-JNK, mostrado na figura 14. Sabe-se que a expressão constitutiva de RAC ativado induz a ativação da N-terminal-Jun-quinase (JNK), que fosforila e ativa o fator de transcrição Jun (PARRI; CHIARUGI, 2010). Os genes celulares c-FOS e c-JUN dimerizam para formar o complexo do fator de transcrição da proteína ativadora 1 (AP-1). Estes genes podem ser expressos poucos minutos após a exposição das células a fármacos, agentes químicos ou a privação do fator de crescimento e os produtos resultantes participam em vários processos metabólicos (APPIERTO et al., 2004; LU et al., 2005; MARKOPOULOU et al., 2009; SANTOS et al., 2015).

O gene MAX codifica uma proteína que interage especificamente com a proteína Myc para formar um heterodímero com alta afinidade para o local de ligação do DNA cognato específico de Myc (HOFFMAN; LIEBERMANN, 2008). O aumento da expressão dos genes MAX e FOS observado no tratamento com CNFD, pode estar relacionado com a ativação da proteína quinase p38 (figura 14), pois esses dados corroboram com o trabalho realizado por Kalra e colaboradores (2004) que descobriram que cFos é um mediador da via apoptótica induzida por cMyc através da via de proteína quinase p38 ativada por mitógenos.

O efeito de CNFD sobre a inibição da motilidade em células MCF-7, observado na figura 12, pode estar relacionado com a diminuição da expressão de genes

envolvidos na sinalização RAS tal como os genes SOS1, GRB2 e KRAS. SOS1 codifica uma proteína que troca nucleotídeos de guanina e prepara o local de ligação de GTP para proteínas Ras que se ligam à via do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Geralmente, uma estimulação na via de EGFR iniciaria a ativação de proteínas adaptadoras tais como a proteína contendo o domínio SH-2 e a proteína ligada ao receptor de fator de crescimento 2 (GRB2) que recruta a proteína SOS1 para a membrana celular. A associação com SOS1 ativaria KRAS e ambas as quinases RAF e PI3Ks das vias MAPK e PI3K/AKT, respectivamente (CASTELLANO et al., 2016; YONG; LAW; WANG, 2013). Vale ressaltar, que o tratamento com CNFD também causou diminuição na expressão dos genes da família AKT; PIK3 e MAPK.

Além disso, observou-se aumento da expressão do gene RAC-1 e diminuição da expressão do gene RHOA, ambos os quais também estão envolvidos na migração celular. RAC-1 impulsiona a motilidade mesenquimal orientada, protrusão de borda de ataque e formação de lamelípídeos, e é um alvo molecular chave regulada por EROS intracelulares. A ativação de RHO é responsável pela motilidade ameboide, um movimento não-orientado que permite a célula se espremer entre lacunas de matriz extracelular em vez de degradação proteolítica (PARRI; CHIARUGI, 2010; RAFTOPOULOU; HALL, 2004). O efeito antagonista na regulação de RAC-1 e RHOA pode ser explicado pela presença de EROS induzida no tratamento de CNFD. Nossos estudos continuam para avaliar os possíveis efeitos antimetastáticos induzidos pelo CNFD.

Além do mecanismo de morte celular induzido por CNFD em células MCF-7 mediado por ROS, foi investigado as vias MAPK. A família de MAPKs incluindo a proteína quinase ativada por fatores extracelulares (ERK1/2), proteína C-Jun N-terminal quinase/ proteína quinase ativada por stress (SAPK/JNK) e MAPK p38 desempenham

papéis centrais nas vias de sinalização de proliferação celular, sobrevivência e apoptose (YANG; SHARROCKS; WHITMARSH, 2013). ERK1/2 são ativados por mitógenos e fatores de crescimento levando ao crescimento celular e sobrevivência, enquanto JNK e p38 são preferencialmente ativados por citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo resultando em diferenciação celular e apoptose (CHEN, 2012; JR, 2012; ZARUBIN; HAN, 2005). Neste estudo, observou-se que JNK e MAPK p38 foram fosforilados, indicando ativação dessas vias de sinalização celular, enquanto a fosforilação de ERK1/2 que é uma via de sobrevivência celular teve sua expressão diminuída após 30 minutos de exposição com CNFD. A ativação das vias de sinalização JNK e p38 pode estar relacionada com o aumento da expressão de genes específicos e que já foram explicadas anteriormente.

A evidência de citotoxicidade num sistema de cultura de células é uma propriedade apresentada pelos agentes antitumorais mais utilizados clinicamente (RAJASEKAR et al., 2012). Para além do efeito citotóxico *in vitro* de CNFD, este composto também demonstrou efeitos benéficos num modelo de melanoma murino B16F10. CNFD mostrou uma redução significativa do crescimento do tumor e do peso do tumor *in vivo*, com menor toxicidade quando comparado com doxorrubicina. A regressão de tumores em animais, a redução do crescimento de tumores sensíveis e / ou o aumento da expectativa de vida são fatores diretamente relacionados à atividade antineoplásica (FERREIRA et al., 2016). O potencial anticancerígeno de naftoquinonas também já foi determinado em modelos animais xenoinxertos *in vivo*, como exemplo pode-se citar a plumbagina, uma naftoquinona extensivamente estudada, que tem demonstrado exercer um potencial efeito anticancerígeno em vários modelos animais e protocolos *in vitro* (AZIZ; DRECKSCHMIDT; VERMA, 2008; KAWIAK et al., 2007; NIU et al., 2015; RAGHU; KARUNAGARAN, 2014), incluindo o modelo de câncer de

mama (AHMAD et al., 2008; MANU et al., 2011; SUNG; OYAJOB; AGGARWAL, 2012).

Dessa forma, este estudo demonstrou que CNFD pode ser considerado como protótipo de moléculas antitumorais. O esquema representativo para o mecanismo de ação de CNFD utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* é mostrado na figura 16.

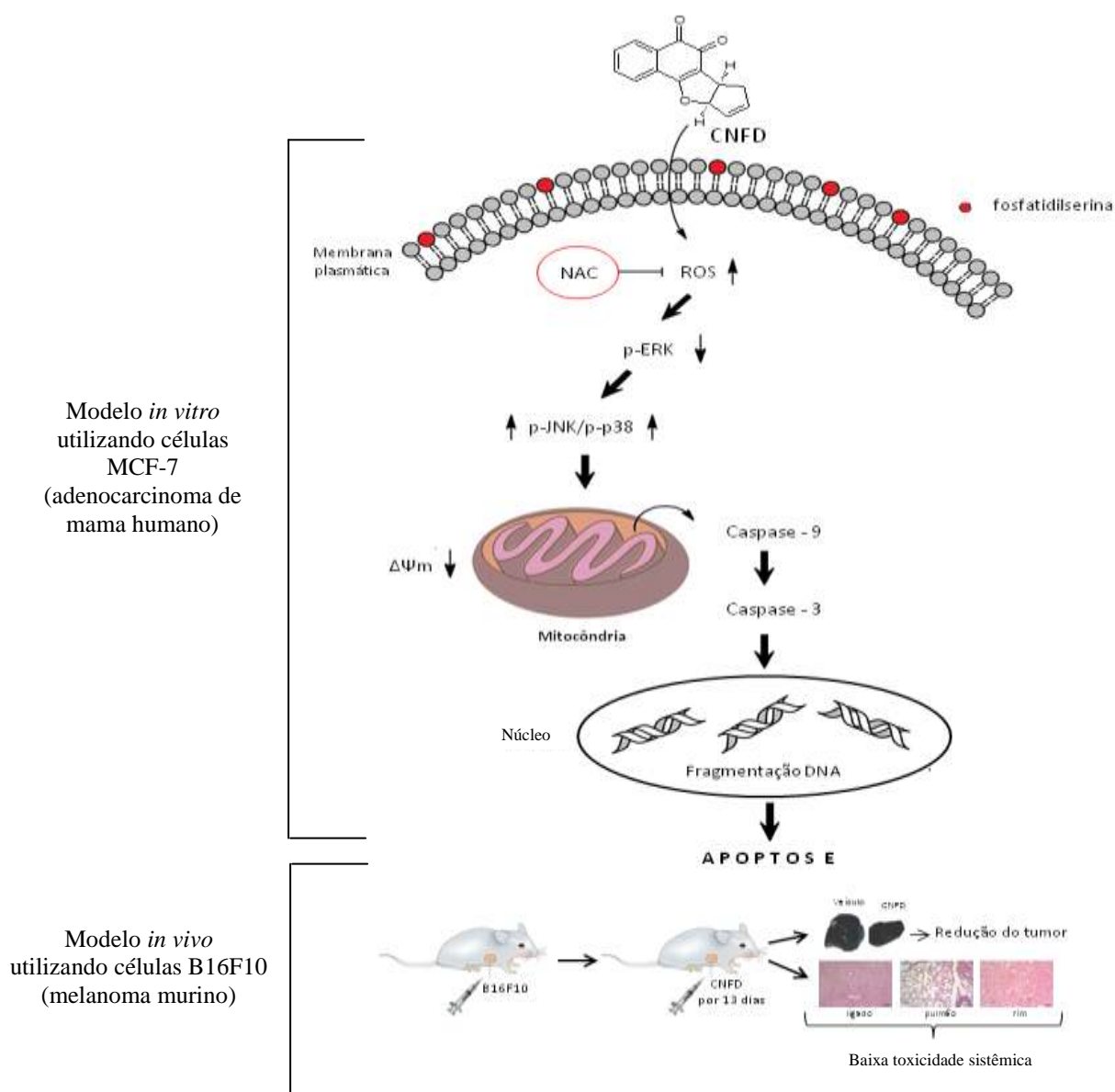


Figura 16 – Mecanismo proposto pela ação de CNFD.

CNFD promoveu a morte celular pela apoptose com possível envolvimento da via intrínseca e ativação das MAPKs de JNK e p38. Em modelo *in vivo*, CNFD promoveu redução do tamanho do tumor com menor toxicidade quando comparado com doxorrubicina.

8. CONCLUSÃO

A partir dos resultados desse trabalho, pode-se concluir que:

- O CNFD foi citotóxico para diferentes linhagens tumorais, apresentando maior seletividade para células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7).
- O CNFD apresentou menor efeito citotóxico na linhagem de fibroblasto humano MRC-5 quando comparado ao padrão doxorrubicina.
- O tratamento de células MCF7 com CNFD induziu mudanças morfológicas e a ativação de vias características da morte celular por apoptose inibindo também a motilidade celular.
- O tratamento de células MCF7 com CNFD promoveu a ativação de JNK e p-38 aumentando a expressão de genes indutores de apoptose.
- Em modelo *in vivo* murino de melanoma, o tratamento com CNFD induziu potente atividade antitumoral, com menor toxicidade quando comparado ao padrão doxorrubicina.
- O CNFD pode ser considerado um candidato potencial para uso na terapia antitumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, T.; DUTTA, A. P21 in Cancer: Intricate Networks and Multiple Activities. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400–414, 2009.

ABDISSA, N. et al. Cytotoxic quinones from the roots of Aloe dawei. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 3, p. 3264–73, 2014.

AGALAVE, S. G.; MAUJAN, S. R.; PORE, V. S. Click chemistry: 1,2,3-triazoles as pharmacophores. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 6, n. 10, p. 2696–2718, 2011.

AHMAD, A. et al. Plumbagin-induced apoptosis of human breast cancer cells is mediated by inactivation of NF- κ B and Bcl-2. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 6, p. 1461–1471, 15 dez. 2008.

AHMED, S. A; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211–224, 1994.

ALVARENGA, É.; CAIRES, A. Potenciais alvos terapêuticos contra o câncer. **Ciência e Cultura**, n. 18, 2014.

AMARAVADI, R. K.; THOMPSON, C. B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 24, p. 7271–7279, 2007.

APPIERTO, V. et al. Involvement of c-Fos in fenretinide-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells. **Cell death and differentiation**, v. 11, n. 3, p. 270–9, 2004.

ATKINS, J. H.; GERSHELL, L. J. From the analyst's couch: Selective anticancer drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 7, p. 491–492, 2002.

AZIZ, M. H.; DRECKSCHMIDT, N. E.; VERMA, A. K. Plumbagin, a medicinal plant-

derived naphthoquinone, is a novel inhibitor of the growth and invasion of hormone-refractory prostate cancer. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 9024–9032, 2008.

BAHRAMI, S.; DRABLOS, F. Gene regulation in the immediate-early response process. **Advances in Biological Regulation**, v. 62, n. 7491, p. 37–49, 2016.

BALOCH, S. K. et al. Design, synthesis and mechanism of novel shikonin derivatives as potent anticancer agents. **RSC Adv.**, v. 5, n. 40, p. 31759–31767, 2015.

BANERJEE, A.; HU, J.; GOSS, D. J. Thermodynamics of protein-protein interactions of cMyc, Max, and Mad: effect of polyions on protein dimerization. **Biochemistry**, v. 45, n. 7, p. 2333–8, 21 fev. 2006.

BARBOSA, I. R. et al. Cancer mortality in Brazil. **Medicine**, v. 94, n. 16, p. e746, 2015.

BERTHET, C.; KALDIS, P. Cell-specific responses to loss of cyclin-dependent kinases. **Oncogene**, v. 26, n. 31, p. 4469–4477, 2007.

BIRONAITE, D. et al. The intracellular antioxidant balance of HL-60 cells and its implication in the apoptosis induced by quinoidal compounds. **Biologija**, n. 1, p. 48–51, 2004.

CAMPOS, V. R. et al. Synthesis of a new class of naphthoquinone glycoconjugates and evaluation of their potential as antitumoral agents. **RSC Adv.**, v. 5, n. 116, p. 96222–96229, 2015.

CASTELLANO, E. et al. RAS signalling through PI3-Kinase controls cell migration via modulation of Reelin expression. **Nature communications**, v. 7, n. 11245, p. 1–112, 2016.

CASTELLANO, E.; DOWNWARD, J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. **Genes & cancer**, v. 2, n. 3, p. 261–74, 2011.

CHAABANE, W. et al. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. **Archivum**

Immunologiae et Therapiae Experimentalis, v. 61, n. 1, p. 43–58, 2013.

CHAN, K.-S.; KOH, C.-G.; LI, H.-Y. Mitosis-targeted anti-cancer therapies: where they stand. **Cell Death and Disease**, v. 3, n. 10, p. e411, 2012.

CHEN, F. JNK-induced apoptosis, compensatory growth, and cancer stem cells. **Cancer Research**, v. 72, n. 2, p. 379–386, 2012.

CHEUNG, H. H.; ARORA, V.; KORNELUK, R. G. Abnormalities of cell structures in tumors: apoptosis in tumors. **Exs**, n. 96, p. 201–21, 2006.

CHIU, C.-C. et al. p38 MAPK and NF-kappaB pathways are involved in naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione induced anti-proliferation and apoptosis of human hepatoma cells. **Cancer letters**, v. 295, n. 1, p. 92–9, 2010.

CHORAWALA, M. R.; OZA, P. M.; SHAH, G. B. Review Article Mechanisms of Anticancer Drugs Resistance: An Overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2012.

CICENAS, J.; VALIUS, M. The CDK inhibitors in cancer research and therapy. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 10, p. 1409–1418, 2011.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749–762, 2010.

COJOCEL, C.; NOVOTNY, L.; VACHALKOVA, A. Mutagenic and carcinogenic potential of menadione. **Neoplasma**, v. 53, n. 4, p. 316–323, 2006.

COSTA, E. V. et al. Antitumor Properties of the Leaf Essential Oil of *Zornia brasiliensis*. **Planta Med**, p. 6, 2015.

CRIDDLE, D. N. et al. Menadione-induced Reactive Oxygen Species Generation via Redox Cycling Promotes Apoptosis of Murine Pancreatic Acinar Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40485–40492, 2006.

DA SILVA ET AL., 2003. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -Lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407–416, 2003.

DAM, A. D.; MITCHELL, A. S.; QUADRILATERO, J. Induction of mitochondrial biogenesis protects against caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in L6 myoblasts. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3426–3435, 2013.

DE MORAES, T. et al. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of a Series of 2-Amino-Naphthoquinones against Human Cancer Cells. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 13188–13199, 2014.

DERETIC, V. **Autophagy in infection** *Current Opinion in Cell Biology*, 2010.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643–8653, 2008.

DICKSON, M. A.; SCHWARTZ, G. K. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. **Current Oncology**, v. 16, n. 2, p. 36–43, 2009.

DORN, G. W. Molecular mechanisms that differentiate apoptosis from programmed necrosis. **Toxicologic pathology**, v. 41, p. 227–34, 2013.

EL BABILI, F. Lawsonia Inermis: Its Anatomy and its Antimalarial, Antioxidant and Human Breast Cancer Cells MCF7 Activities. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 4, n. 1, p. 4–9, 2013.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. In: ARMSTRONG, D. (Ed.). **Advanced Protocols in Oxidative Stress II SE - 4**. Methods in Molecular Biology. [s.l.] Humana Press, 2010. v. 594p. 57–72.

FARIAS, M. S. et al. Substituted 3acyl2phenylamino1,4naphthoquinones intercalate into DNA and cause genotoxicity through the increased generation of reactive oxygen species culminating in cell death. **Mol Med Rep**, v. 10, n. 1, p. 405–410, 2014.

FEIL, R.; FRAGA, M. F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 2, p. 97–109, 2012.

FERREIRA, M. D. P. S. B. C. et al. Antifungal activity of synthetic naphthoquinones against dermatophytes and opportunistic fungi: preliminary mechanism-of-action tests. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 13, p. 26, 2014.

FERREIRA, P. M. P. et al. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: In vivo and ex vivo methods and microscopy examinations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 270–279, 2016.

FESTJENS, N.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1757, n. 9–10, p. 1371–1387, 2006.

FIORITO, S. et al. Growth inhibitory activity for cancer cell lines of lapachol and its natural and semi-synthetic derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 2, p. 454–7, 2014.

FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, J.-L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. **Biochimie**, v. 84, n. 2–3, p. 131–141, 2002.

FOUQUEREL, E.; SOBOL, R. W. NIH Public Access. **Computer**, v. 144, n. 5, p. 724–732, 2008.

FREIRE, C. P. V. et al. Synthesis and biological evaluation of substituted α - and β -2,3-dihydrofuran naphthoquinones as potent anticandidal agents. **MedChemComm**, v. 1, n. 3, p. 229, 2010.

FULDA, S.; DEBATIN, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, p. 4798–4811, 2006.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.

GALLUZZI, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell death and differentiation**, n. 2014, p. 1–16, 2014.

GARAY, I. et al. Comparação da matéria orgânica e de outros atributos do solo entre plantações de *Acacia mangium* e *Eucalyptus grandis*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 4, p. 705–712, 2003.

GARRETT, M. A. Cell cycle control and cancer. **Current Science**, v. 81, n. 5, p. 515–522, 2001.

GARRETT, M. D.; WORKMAN, P. Discovering novel chemotherapeutic drugs for the third millennium. **European Journal of Cancer**, v. 35, n. 14, p. 2010–2030, 1999.

GERL, R.; VAUX, D. L. Apoptosis in the development and treatment of cancer. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 2, p. 263–270, 2005.

GHOBRAL, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEI, A. A. in BASIC SCIENCE Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, p. 178–194, 2005.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **Journal of Pathology The**, v. 221, n. 1, p. 3–12, 2010.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. **Cell death by necrosis: towards a molecular definition** *Trends in Biochemical Sciences*, 2007.

GONÇALVES, J. C. R. et al. Antitumoral activity of novel 1,4-naphthoquinone derivative involves L-type calcium channel activation in human colorectal cancer cell line. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 14, n. 3, p. 229–234, 2016.

GONG, K.; LI, W. Shikonin, a Chinese plant-derived naphthoquinone, induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through reactive oxygen species: A potential

new treatment for hepatocellular carcinoma. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 12, p. 2259–2271, 2011.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 12, p. 931–947, 2013.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, p. 131–138, 1982.

HALLAK, M. et al. Induction of death of leukemia cells by tw-74, a novel derivative of chloro-naphthoquinone. **Anticancer Research**, v. 33, n. 1, p. 183–190, 2013.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

HAMBLEY, T. W.; HAIT, W. N. Is anticancer drug development heading in the right direction? **Cancer research**, v. 69, n. 4, p. 1259–62, 2009.

HE, S. et al. Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1100–1111, 2009.

HOFFMAN, B.; LIEBERMANN, D. A. Apoptotic signaling by c-MYC. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6462–72, 2008.

HOLLER, N. et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. **Nature immunology**, v. 1, n. 6, p. 489–495, 2000.

HUSSEIN, N.; LOPES, C. Surface Chemistry and Spectroscopy Studies on 1, 4-Naphthoquinone in Cell Membrane Models Using Langmuir Monolayers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 402, p. 300–306, 2013.

INDRAN, I. R. et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1807, n. 6, p. 735–745, 2011a.

INDRAN, I. R. et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1807, n. 6, p. 735–745, 2011b.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Pesquisa em Câncer no Brasil. Ações de Controle** – Rio de Janeiro, p. 108–109, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016** – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

JAIN, M. V. et al. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 17, n. 1, p. 12–29, 2013.

JIMÉNEZ-ALONSO, S.; GUASCH, J. Electronic and cytotoxic properties of 2-amino-naphtho furan-4, 9-diones. **J. Org. Chem.**, v. 76, p. 1634–1643, 2011.

JR, R. R. ERK1 / 2 MAP kinases: Structure , function , and regulation. **Pharmacological Research**, v. 66, n. 2, p. 105–143, 2012.

KALIA, M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. **Metabolism**, v. 64, n. 3, Supplement 1, p. S16–S21, 2015.

KALRA, N.; KUMAR, V. c-Fos is a mediator of the c-Myc-induced apoptotic signaling in serum-deprived hepatoma cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 24, p. 25313–25319, 2004.

KANAAN, Y. M. et al. Biological Evaluation of 2,3-Dichloro-5,8-Dimethoxy-1,4-Naphthoquinone as an Anti-breast Cancer Agent. **Anticancer Research**, v. 29, n. 1, p. 191–199, 2009.

KAWIAK, A. et al. Induction of apoptosis by plumbagin through reactive oxygen species-mediated inhibition of topoisomerase II. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 223, n. 3, p. 267–276, 2007.

KIMURA, M. et al. Mitotic catastrophe and cell death induced by depletion of centrosomal proteins. **Cell death & disease**, v. 4, n. 4, p. e603, 2013.

KIRAN AITHAL, B. et al. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. **Cell Biology International**, v. 33, n. 10, p. 1039–1049, 2009.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. T The role of oxidative stress in Carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 239–267, 2004.

KLAUS, V. et al. 1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 496, n. 2, p. 93–100, 2010.

KOYAMA, J.; MORITA, I.; YAMORI, T. Correlation between cytotoxic activities and reduction potentials of heterocyclic quinones. **Molecules**, v. 15, p. 6559–6569, 2010.

KRETSCHMER, N. et al. Naphthoquinones from *Onosma paniculata* induce cell-cycle arrest and apoptosis in melanoma cells. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 865–869, 2012.

KRISHAN A. Downloaded from jcb.rupress.org on October 15, 2013 RAPID FLOW CYTOFLUOROMETRIC MAMMALIAN ANALYSIS OF. **The journal of cell**, v. 66, 1975.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.

KUMAR, M. R. S. et al. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 2, p. 242–250, 2009.

LAU, A. T. Y.; WANG, Y.; CHIU, J.-F. Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. **Journal of cellular biochemistry**,

v. 104, n. 2, p. 657–67, 2008.

LE TOURNEAU, C. et al. Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 46, n. 18, p. 3243–50, 2010.

LEE, M.-J. et al. Shikonin time-dependently induced necrosis or apoptosis in gastric cancer cells via generation of reactive oxygen species. **Chemico-biological interactions**, v. 211, p. 44–53, 2014.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LIEW, K. et al. 2-Methoxy-1,4-Naphthoquinone (MNQ) suppresses the invasion and migration of a human metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231). **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 28, n. 3, p. 335–9, 2014.

LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, n. 15, p. 3079–93, 2013.

LIN, K.-L. et al. Naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione induces apoptosis and S-phase arrest of MDA-MB-231 cells through JNK and ERK signaling activation. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 24, n. 1, p. 61–70, 2010.

LIN, K.-L. et al. Furano-1,2-Naphthoquinone Inhibits Src and PI3K/Akt Signaling Pathways in Ca9-22 Human Oral Squamous Carcinoma Cells. **Integrative Cancer Therapies**, v. 13, n. 3, p. NP18-NP28, 2014.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118–26, 2010.

LÓPEZ-LÓPEZ, L. I. et al. Naphthoquinones: Biological properties and synthesis of lawsone and derivatives — A structured review. **Vitae**, v. 21, n. 3, p. 248–258, 2014.

LU, C. et al. cFos is critical for MCF-7 breast cancer cell growth. **Oncogene**, v. 24, n. 43, p. 6516–24, 2005.

LUO, G. et al. HBV infection increases the risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. **Cancer causes & control : CCC**, v. 24, n. 3, p. 529–537, 2013.

MADHAVI, N. et al. Suppression of human T-cell growth in vitro by cis-unsaturated fatty acids: relationship to free radicals and lipid peroxidation. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 51, n. 1, p. 33–40, 1994.

MALLAVADHANI, U. V. et al. Synthesis and anticancer activity of some novel 5,6-fused hybrids of juglone based 1,4-naphthoquinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 83, p. 84–91, 2014.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153–166, 2009.

MANCHADO, E.; GUILLAMOT, M.; MALUMBRES, M. Killing cells by targeting mitosis. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 3, p. 369–377, 2012.

MANSILLA, S.; LLOVERA, L.; PORTUGAL, J. Chemotherapeutic targeting of cell death pathways. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 226–238, 2012.

MANU, K. A. et al. Plumbagin inhibits invasion and migration of breast and gastric cancer cells by downregulating the expression of chemokine receptor CXCR4. **Molecular cancer**, v. 10, n. 1, p. 107, 2011.

MANUEL, V.-G. V.; VALDESPINO-CASTILLO; EDMUNDO, V. [Non-classical cellular and molecular deficits in cancer development]. **Gaceta medica de Mexico**, v. 146, n. 3, p. 185—198, 2010.

MARINHO-FILHO, J. D. B. et al. Oxidative stress induction by (+)-cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, n. 3, p. 369–379, 2010.

MARIÑO, G.; KROEMER, G. Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. **Cell research**, v. 23, n. 11, p. 1247–8, 2013.

MARKOPOULOU, S. et al. Vanadium-induced apoptosis of HaCaT cells is mediated by c-fos and involves nuclear accumulation of clusterin. **FEBS Journal**, v. 276, n. 14, p. 4208–4223, 2009.

MURROW, L.; DEBNATH, J. Autophagy As A Stress Response And Quality Control Mechanism—Implications for Cell Injury and Human Disease. **Annual review of pathology**, n. 2, p. 105–137, 2013.

NEZIS, I. P. et al. Autophagic degradation of dBruce controls DNA fragmentation in nurse cells during late *Drosophila melanogaster* oogenesis. **Journal of Cell Biology**, v. 190, n. 4, p. 523–531, 2010.

NIU, M. et al. Plumbagin inhibits growth of gliomas in vivo via suppression of FOXM1 expression. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 128, n. 3, p. 131–136, 2015.

OLLINGER, K.; BRUNMARK, A. Effect of Hydroxy Substituent Position on 1, 4-Naphthoquinone Toxicity to Rat Hepatocytes *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 32, p. 21496–21503, 1991.

OPPENHEIM, J. J.; YANG, D. **Alarmins: Chemotactic activators of immune responses** *Current Opinion in Immunology*, 2005.

OSELLAME, L. D.; BLACKER, T. S.; DUCHEN, M. R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 26, n. 6, p. 711–23, 2012.

PARRI, M.; CHIARUGI, P. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. **Cell communication and signaling : CCS**, v. 8, p. 23, 2010.

PEDROZA, D. A. et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* The cytotoxic effect of 2-acylated-1, 4-naphthohydroquinones on leukemia / lymphoma cells. v. 22, p. 842–847, 2014.

PEYRESSATRE, M. et al. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: From small molecules to peptide inhibitors. **Cancers**, v. 7, n. 1, p. 179–237, 2015.

PINHEIRO, D.; SUNKEL, C. Mechanisms of cell cycle control. **Canalbq**, v. 9, p. 4–17, 2012.

PRACHAYASITTIKUL, V. et al. Synthesis, anticancer activity and QSAR study of 1,4-naphthoquinone derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 84, p. 247–63, 2014.

PUTNAM, K. P.; BOMBICK, D. W.; DOOLITTLE, D. J. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. **Toxicology in vitro**, v. 16, p. 599–607, 2002.

RAFTOPOULOU, M.; HALL, A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. **Developmental Biology**, v. 265, n. 1, p. 23–32, 2004.

RAGHU, D.; KARUNAGARAN, D. Plumbagin Downregulates Wnt Signaling Independent of p53 in Human Colorectal Cancer Cells. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 5, p. 1130–1134, 23 maio 2014.

RAJASEKAR, S. et al. In vitro and in vivo anticancer effects of Lithospermum erythrorhizon extract on B16F10 murine melanoma. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 2, p. 335–345, 2012.

RALPH, S. J. et al. The causes of cancer revisited: “mitochondrial malignancy” and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy. **Mol Aspects Med**, v. 31, n. 2, p. 145–170, 2010.

RAVIKUMAR, B. et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 90, n. 4, p. 1383–435, 2010.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free radical biology & medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–16, 2010.

ROCK, K. L.; LAI, J.-J.; KONO, H. NIH Public Access. **Biophysical Chemistry**, v.

257, n. 5, p. 2432–2437, 2005.

ROSS, A. E. et al. Dimeric naphthoquinones, a novel class of compounds with prostate cancer cytotoxicity. **BJU International**, v. 108, n. 3, p. 447–454, 2011.

RYTER, S. W.; MIZUMURA, K.; CHOI, A. M. K. The impact of autophagy on cell death modalities. **International Journal of Cell Biology**, v. 2014, p. 17–19, 2014.

SACAU, E. P. et al. Inhibitory effects of lapachol derivatives on epstein-barr virus activation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 483–488, 2003.

SAGAR, S. et al. Cytotoxicity and apoptosis induced by a plumbagin derivative in estrogen positive MCF-7 breast cancer cells. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 14, n. 1, p. 170–80, 2014.

SANTOS, M. et al. Immediate expression of c-fos and c-jun mRNA in a model of intestinal autotransplantation and ischemia-reperfusion in situ. **Clinics**, v. 70, n. 5, p. 373–379, 2015.

SENESE, S. et al. Chemical dissection of the cell cycle: probes for cell biology and anti-cancer drug development. **Cell Death Dis**, v. 5, p. e1462, 2014.

SEYFRIED, T. N. et al. Cancer as a metabolic disease: Implications for novel therapeutics. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 3, p. 515–527, 2014.

SHI, S.; CAO, H. Shikonin promotes autophagy in BXPC-3 human pancreatic cancer cells through the PI3K/Akt signaling pathway. **Oncology Letters**, p. 1087–1089, 2014.

SHIMIZU, S. et al. Autophagic Cell Death and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 3145–3153, 2014.

SHRESTHA, J. P. et al. A mode of action study of cationic anthraquinone analogs: a new class of highly potent anticancer agents. **Med. Chem. Commun.**, 2015.

SILVA, M. G. et al. Synthesis of 2,3-Diyn-1,4-naphthoquinone Derivatives and Evaluation of Cytotoxic Activity against Tumor Cell Lines. **Journal Brazil Chemical**

Society, v. 24, n. 9, p. 1420–1426, 2013.

SINGH, D. K.; LUQMAN, S. *Lawsonia inermis* (L .): A perspective on anticancer potential of Mehndi / Henna. v. 1, n. 4, p. 112–120, 2014.

SINGH, R.; GEORGE, J.; SHUKLA, Y. Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer therapy. **Cell division**, v. 5, n. 1, p. 4, 2010.

STEWART, Z. A.; WESTFALL, M. D.; PIETENPOL, J. A. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 3, p. 139–145, 2003.

STONE, A.; SUTHERLAND, R. L.; MUSGROVE, E. A. Inhibitors of cell cycle kinases: recent advances and future prospects as cancer therapeutics. **Critical reviews in oncogenesis**, v. 17, n. 2, p. 175–98, 2012.

SU, J. C. et al. Furano-1,2-naphthoquinone inhibits EGFR signaling associated with G2/M cell cycle arrest and apoptosis in A549 cells. **Cell biochemistry and function**, v. 28, n. 8, p. 695–705, 2010.

SU, Y.-T. et al. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. **Biochemical pharmacology**, v. 70, n. 2, p. 229–41, 2005.

SUI, X. et al. P38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. **Cancer Letters**, v. 344, n. 2, p. 174–179, 2014.

SUNG, B.; OYAJOB, B.; AGGARWAL, B. B. Plumbagin Inhibits Osteoclastogenesis and Reduces Human Breast Cancer-Induced Osteolytic Bone Metastasis in Mice through Suppression of RANKL Signaling. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 2, p. 350–359, 2012.

SUFFNESS, Matthew; PEZZUTO, John M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity**, v. 6, p. 71-133, 1990

TEMKIN, V. et al. Necrosis_AD-ATP_MolCelBio2006. **Mol. Cell. Biol.**, v. 26, n. 6, p. 2215–2225, 2006.

TENNANT, J. R. EVALUATION OF THE TRYPAN BLUE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF CELL VIABILITY. **Transplantation**, v. 2, n. 6, 1964.

TIAN, L. et al. Plumbagin induces apoptosis via the p53 pathway and generation of reactive oxygen species in human osteosarcoma cells. **Molecular medicine reports**, v. 5, n. 1, p. 126–32, 2012.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 3, p. 179–90, 2007.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 31, n. 4, p. 214–223, 2002.

VASCONCELLOS, M. C. et al. The in-vitro and in-vivo inhibitory activity of biflorin in melanoma. **Melanoma research**, v. 21, n. 2, p. 106–14, 2011.

VENDRAMINI-COSTA, D. B. et al. Goniotalamin prevents the development of chemically induced and spontaneous colitis in rodents and induces apoptosis in the HT-29 human colon tumor cell line. v. 300, p. 1–12, 2016.

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

WANG, F. et al. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 5, p. 808–815, 2009.

WANG, J.; YI, J. Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is a question. **Cancer Biology and Therapy**, v. 7, n. 12, p. 1875–1884, 2008.

WEGWARTH, O. Cancer survival: the CONCORD-2 study. **The Lancet**, v. 386, n. 9992, p. 429, 2015.

WELLINGTON, K. W. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review. **RSC Adv.**, v. 5, n. 26, p. 20309–20338, 2015.

WOJNÁROVITS, L. Characteristics of radical reactions, spin rules, and a suggestion for the consistent use of a dot on radical species. **Journal of Chemical Education**, v. 88, n. 12, p. 1658–1662, 2011.

WONDRAK, G. T. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 12, p. 3013–69, 2009.

YANG, S.-H.; SHARROCKS, A. D.; WHITMARSH, A. J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. **Gene**, v. 513, n. 1, p. 1–13, 2013.

YEDJOU, C. G.; TCHOUNWOU, P. B. N-acetyl-L-cysteine affords protection against lead-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 4, n. 2, p. 132–137, 2007.

YING, W. et al. NAD⁺ as a metabolic link between DNA damage and cell death. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 1–2, p. 216–223, 2005.

YONG, F. L.; LAW, C. W.; WANG, C. W. MicroRNAs that Potentially Regulate SOS1 Expression in Colon Cancer. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, n. 5, p. 424–428, 2013.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. v. 15, n. 1, p. 11–18, 2005.

ZHANG, L. et al. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia avellanedae* induce cell cycle arrest and apoptosis in the human non-small cell lung cancer cell line A549. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 9–17, 2015.

ZHANG, W.; LIU, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, v. 12, p. 9–18, 2002.

A N E X O I

Curriculum Vitae resumido

NOME: Patrícia Danielle Oliveira de Almeida

Possui graduação em Farmácia (2008) e Habilitação em Análises Clínicas (2009) pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Pós-graduada em Citologia Clínica (2010) pela Sociedade Brasileira de Citologia Clínica. Mestrado em Ciências Farmacêuticas (2013) pela UFAM. Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica pela UFAM. Possui experiência em laboratório de cultura celular, tendo desenvolvido técnicas aplicadas à avaliação de segurança, eficácia e mecanismos de ação de substâncias com atividade antitumoral e antioxidante no Laboratório de Atividade Biológica (Biophar – UFAM). Atua na docência desde 2013, como professora auxiliar do curso de Farmácia no Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET-UFAM), tendo ministrado disciplinas como Hematologia Clínica, Citologia Clínica, Bioquímica Clínica, Bioquímica Básica e Urinálise e Líquidos Corporais.

Publicações resultantes do projeto de doutorado:

Artigo a ser enviado para a revista Cellular Signalling (aguardando o depósito de patente): A new anti-tumor naftoquinone induces apoptosis in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells mediated by ROS through JNK and p38 signaling.

Solicitação de patente (em andamento): Composto (CNFD), seus derivados e composições anti-tumorais

Apresentação em Congressos

LIMA, E. S.; ALMEIDA, P. D. O. ; Boleti, A.P.A. ; Rudiger, A.L. ; Veiga-Junior, V.F. . Alfa, beta-amirone isolated from *Protium paniculatum* inhibits LPS-stimulated j774 macrophages. In: II Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences, 2014, Búzios. II Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences, 2014. v. 1. p. 13-13.

ALMEIDA, P. D. O. ; Boleti, A.P.A. ; RUDIGER, A. ; VEIGA-JUNIOR, V. ; LIMA, E. S. Citotoxicity, Anti-Inflammatory and Anti-Adipogenic activities of Triterpenes from *Protium Paniculatum*. In: SFRBM's 21st Annual Meeting, 2014, Seattle. *Free Radical Biology & Medicine*, 2014. v. 76. p. S59-S59.

ALMEIDA, PATRICIA ; BOLETI, ANA PAULA ; RUDIGER, ANDRE ; VEIGA-JUNIOR, VALDIR ; VASCONCELLOS, M. C. ; **LIMA, E. S.** . Anticancer Effects of Triterpenes from *Protium Paniculatum* in the Multidrug-Resistant Human Uterine Sarcoma MES-SA/Dx5. In: SFRBM's 21st Annual Meeting, 2014, Seattle. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 76, p. S120, 2014.

Artigos Publicados

VARGAS, Fabiano de Sousa ; **ALMEIDA, P. D. O.** ; Boleti, A.P.A. ; MENESES, Maria ; SOUZA, T. P. ; Vasconcellos, M.C. ; NUNEZ, Cecilia Verônica ; Pohlit, M.A. ; LIMA, E. S. . Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. *BMC Complementary and Alternative Medicine (Online)*, v. 16, p. 83-87, 2016.

SILVA, T. P. ; MOURA, V. M. ; SOUZA, M. C. S. ; SANTOS, V. N. C. ; SILVA, K. A. M. M. ; MENDES, M. G. G. ; NUNEZ, C. V. ; **ALMEIDA, P. D. O.** ; LIMA, E. S. ; MOURAO, R. H. V. ; DOS-SANTOS, M. C. . *Connarus favosus* Planch.: An inhibitor of the hemorrhagic activity of *Bothrops atrox* venom and a potential antioxidant and antibacterial agent. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 183, p. 166-175, 2016.

VARGAS, Fabiano de Sousa ; **ALMEIDA, P. D. O.** ; ARANHA, E. S. P. ; Boleti, A.P.A. ; NEWTON, P. ; Vasconcellos, M.C. ; Veiga-Junior, V.F. ; LIMA, E. S. . Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from *Copaifera* spp. *Oleo-resins. Molecules (Basel. Online)*, v. 20, p. 6194-6210, 2015.

ALMEIDA, P. D. O. ; RUDIGER, A. ; LOURENCO, G. ; Veiga-Junior, V.F. ; LIMA, E. S. . Anti-Inflammatory Activity of Triterpenes Isolated from Oil-Resins. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print)*, v. 2015, p. 1-10, 2015.

Verdam, Maria Christina dos Santos ; SIMPLICIO, F. G. ; SANTOS, G. B. ; Magalhaes, A. ; OLIVEIRA, C. I. ; **ALMEIDA, P. D. O.** ; MACHADO, T. M. ; Vasconcellos, M.C. ; LIMA, E. S. ; OHANA, Débora ; Pereira, M.M. . Anti-inflammatory action of *Justicia acuminatissima* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia (Impresso)*, p. 264-268, 2015.

SANTOS, P. M. ; Veiga-Junior, V.F. ; **ALMEIDA, P. D. O.** ; LIMA, E. S. ; MORAES, M. O. ; COSTA, P. M. ; MEIRA, A. S. ; PESSOA, C. O. ; VALENTE, L. M. M. . Perfil de flavonoides e avaliação do potencial antioxidante e citotóxico de *Bauhinia purpurea* (fabaceae) da região amazônica. *Química Nova* (Impresso), v. 37, p. 89-94, 2014.

GALENO, D. M. L. ; CARVALHO, R. P. ; Boleti, A.P.A. ; Lima, A.S. ; **ALMEIDA, P. D. O.** ; Pacheco, C.C. ; SOUZA, T. P. ; Lima, Emerson S. . Extract from *Eugenia punicifolia* is an Antioxidant and Inhibits Enzymes Related to Metabolic Syndrome. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Online), v. 172, p. 311-324, 2014.

ANEXO II



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 001/2013

PROJETO: "Produtos naturais e sintéticos bioativos: Potencial biotecnológico no tratamento do câncer"

COORDENADOR: Dr. Daniel Pereira Bezerra

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongos C57BL6	400

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 17/04/2013, e tem validade até 17/04/2015.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 04/17/2013, being valid until 04/17/2015.

Salvador, 17 de abril de 2013.

PATRÍCIA SAMPAIO T. VERAS

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ