



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

CONTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA
ATIVIDADE ANTI-LEUCÊMICA DA CORDIAQUINONA J

José Delano Barreto Marinho Filho

Fortaleza – Ceará

-2009-

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**CONTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA
ATIVIDADE ANTI-LEUCÊMICA DA CORDIAQUINONA J**

José Delano Barreto Marinho Filho

Dissertação submetida à Coordenação
do Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dra. Leticia Veras Costa Lotufo

Fortaleza – Ceará

-2009-

JOSÉ DELANO BARRETO MARINHO FILHO

**CONTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA ATIVIDADE
ANTI-LEUCÊMICA DA CORDIAQUINONA J**

Dissertação submetida à coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Farmacologia outorgado pela Universidade Federal do Ceará. Este documento encontra-se a disposição dos interessados na biblioteca setorial as referida universidade. A citação de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Flávia Almeida Santos

Universidade Federal do Ceará

DEDICATÓRIA

*À Deus e a meus pais pelo apoio
em todos esses anos.*

AGRADECIMENTOS

A professora **Letícia Véras Costa Lotufo** pela paciência nos momentos de insegurança, pelos ensinamentos nos momentos de necessidade, pelos elogios nos momentos mais oportunos, pelas broncas nos momentos adequados e principalmente, pela amizade em horas importantes dentro e fora do laboratório;

À Dr^a. **Claudia do Ó Pessoa**, por ceder o espaço do laboratório e sempre incentivar o desenvolver das pesquisas no laboratório;

À Dr^a. **Raquel Carvalho Montenegro**, pelo imenso interesse em ajudar e incentivar meu crescimento científico e pelos constantes momentos de descontração e de brincadeiras;

Ao Dr. **Manoel Odorico de Moraes**, pela contribuição à pesquisa no Laboratório de Oncologia Experimental e pelas constantes brincadeiras e bom humor melhorando sempre o ambiente de trabalho;

À Prof^a. **Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, por sempre nos receber de braços abertos em seu laboratório, disposta a resolver os mais diversos problemas;

À amiga, companheira e namorada **Ana Jérsia Araújo**, pelo carinho, compreensão, dedicação, ajuda, incentivo e amor em todos os momentos da minha vida, enfim pelo constante estímulo tanto na vida pessoal quanto na vida profissional;

Aos amigos, **Daniel Bezerra, Márcio Roberto, Paulo Michel, Marne Vasconcellos** e **Gardênia Militão** pela ajuda e pelos momentos vividos;

Aos Pós-Graduandos do Laboratório de Oncologia Experimental: Adriana Carvalho, Elthon Gois, Bruno Cavalcanti, Ivana Dantas, Patrícia Marçal, Zé Roberto, Kézia Lacerda, Carla Sombra, Cecília Carvalho, Kristiana Mousinho, Washington Bastos, Hemerson Lury (a grande Autarquia) pelo o agradável convívio e ajuda constante. Em especial a **Paula Jimenez, Danilo Damasceno, Felipe Rocha** pelo constante bom humor e ao amigo **Diego Veras** pela a paciência, por todos os

esclarecimentos dentro e fora do laboratório e por viabilizar vários momentos de diversão.

Aos alunos de Iniciação Científica: Eveline Alves, Paula Abreu, Deisy, Igor, Bruno, Germano, Vanessa, Venúcia Rafael, pela boa convivência e em especial a Arinice Costa e ao Miller Barreto por sempre estarem dispostos a ajudar e pelos bons momentos de convivência;

As secretárias Sheyla e a Adelânia Marinho pela paciência, preocupação e disposição em ajudar em tudo que é possível, além do constante sorriso aberto no rosto;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: Chiquinho, Alana, Carlos, Haroldo, Iris, Flávia em especial a Aura Rhanes pela ajuda na concretização deste trabalho.

Aos técnicos: Paulo, Maria de Fátima e em especial Erivanda França, Silvana França e a Rogéria Montenegro pela constante ajuda dentro do laboratório e pelos bons momentos de descontração.

À todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica ou para a execução deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Banco do Nordeste do Brasil - BNB

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa - FUNCAP

Instituto Claude Bernard - InCb

RESUMO

CONTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA ATIVIDADE ANTI-LEUCÊMICA DA CORDIAQUINONA J

José Delano Barreto Marinho Filho. Orientadora: Letícia Veras Costa-Lotufo. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2009.

Cordiaquinona J é uma 1,4-naftoquinona isolada das raízes de *Cordia leucocephala*, que apresenta atividade antifúngica e larvicida. No entanto, não há relatos quanto a sua atividade citotóxica. No presente estudo, foi investigado os efeitos citotóxicos da cordiaquinona J sobre a viabilidade de células tumorais, cujo valores de CI_{50} variaram de 2,7 a 6,6 μM em células de HL-60 e SF-295 respectivamente. Estudos realizados em células leucêmicas de HL-60 indicaram que a cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) reduziu a viabilidade celular e a incorporação do BrdU após 24 horas de incubação. Além disso, a cordiaquinona J mostrou rápida indução de apoptose, como indicado pela externalização da fosfatidilserina, ativação de caspases, fragmentação do DNA e mudanças morfológicas, além de uma rápida indução de necrose, como indicado pela perda da integridade de membrana e mudanças morfológicas. Cordiaquinona J altera o potencial redox de células tumorais por induzir geração de espécies reativas de oxigênio e perda do potencial da membrana mitocondrial como eventos iniciais. Além disso, o pré-tratamento das células com N-acetil-L-cisteína (NAC) aboliu a maioria dos efeitos observados relacionados ao tratamento com a cordiaquinona J, incluindo os efeitos relacionados a indução de apoptose e de necrose, sugerindo que a citotoxicidade dessa molécula está relacionada a geração de EROs. Assim, o presente estudo ressalta o potencial antitumoral da Cordiaquinona J.

Palavras chaves: Cordiaquinona J, citotoxicidade, apoptose, células de HL-60, espécies reativas de oxigênio

ABSTRACT

REACTIVE OXYGEN SPECIES CONTRIBUTION TO THE ANTILEUKEMIC ACTIVITY OF CORDIAQUINONE J

José Delano Barreto Marinho Filho Advisor: Letícia Veras Costa-Lotufo. Master Dissertation. Postgraduation Program on Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, UFC, 2009.

Cordiaquinone J is a 1,4-naphthoquinone isolated from the roots of *C. leucocephala*, with antifungal and larvicidal activities. Nonetheless the cytotoxic effects of cordiaquinone J have never being explored. In the present study, it was investigated the effect of cordiaquinone J on tumor cells viability, showing IC₅₀ values in the range of 2.7 to 6.6 μ M in HL-60 and SF-295, respectively. Studies performed in HL-60 leukemia cells indicate that cordiaquinone J (1.5 and 3 μ M) reduces cell viability and BrdU incorporation after 24 hours of incubation. Cordiaquinone J showed rapid induction of apoptosis, as indicated by phosphatidylserine externalization, caspase activation, DNA fragmentation and morphologic changes and, rapid induction of necrosis, as indicated by the loss of integrity membrane and morphologic changes. Cordiaquinone J alters the redox potential of tumor cells by inducing generation of reactive oxygen species (ROS) and loss of mitochondrial membrane potential as initial events. The pretreatment of the cells with N-acetyl-L-cysteine (NAC) abolished most of the observed effects related to cordiaquinone J treatment, including those related to apoptosis and necrosis induction. Thus, present results highlight the antitumor potential of cordiaquinona J.

Keywords: Cordiaquinone J, cytotoxicity, apoptosis, HL-60 cells, reactive oxygen species

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira, sem pele não melanoma.....	17
Figura 2 -	Esquema das vias intrínscica e extrínscica da apoptose.....	23
Figura 3 -	Modelo esquemático do papel das EROs mitocondrial na apoptose.....	27
Figura 4 -	Estruturas da Camptotecina e de seus análogos Topotecano e Irinotecano.....	31
Figura 5 -	Estrutura do paclitaxel e seu análogo docetaxel.....	32
Figura 6 -	Estruturas da Podofilotoxina (6), do Etoposídeo (7) e do Tenoposídeo (8)....	32
Figura 7 -	Estrutura esquemática de (A)- benzoquinona, (B) naftoquinona e (C) antraquinona.....	33
Figura 8 -	<i>Cordia leucocephala</i> Moric	37
Figura 9 -	Estrutura da cordiaquinona J isolada das raízes de <i>Cordia leucocephala</i>	47
Figura 10	Efeitos da cordiaquinona J sobre a viabilidade celular determinado por - coloração de azul de tripan; sobre a incorporação do BrdU e sobre a viabilidade celular determinada por microscopia de fluorescência LA/BE.....	64
Figura 11	Análises microscópicas por coloração de May-Grunwald-Giemsa em células - HL-60 após 3, 6 e 24 horas de incubação como a cordiaquinona J.....	66
Figura 12	Efeitos da cordiaquinona J em células HL-60 sobre a densidade celular e a - integridade de membrana determinada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo após 0,5, 3, 6 e 24 horas de incubação.....	68
Figura 13	Efeitos da cordiaquinona J em células HL-60 sobre a morfologia celular - determinada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo após 0,5, 3, 6 e 24 horas de incubação.....	69
Figura 14	Efeitos da cordiaquinona J sobre a fragmentação internucleossomal do DNA - em células HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, triton X-100 e citrato após 0,5, 3, 6, e 24 horas de incubação.....	72
Figura 15	Efeitos da cordiaquinona J sobre despolarização da membrana mitocondrial - em células HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando rodamina 123, após 0,5, 3, 6, e 24 horas de incubação.....	73

Figura 16	Efeitos da cordiaquinona J sobre externalização da fosfatidilserina em células HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando anexina V-PE e 7AAD, após 3 horas de incubação.....	74
Figura 17	Efeitos da cordiaquinona J sobre a atividade das caspase 3 e 7 em células HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo e FLICA, após 3 horas de incubação.....	75
Figura 18	Efeitos da cordiaquinona J sobre a atividade da integridade de membrana, densidade celular, despolarização da membrana mitocondrial, e fragmentação internucleossomal do DNA após 30 minutos de estímulo com a substância teste.....	76
Figura 19	Efeitos da cordiaquinona J sobre a geração de EROs em células HL-60, antes e após o pré-tratamento como o NAC.....	78
Figura 20	Efeitos da cordiaquinona J sobre a atividade da integridade de membrana, densidade celular, despolarização da membrana mitocondrial, e fragmentação internucleossomal do DNA após pré-tratamento com NAC.....	79
Figura 21	Análises microscópicas por coloração de May-Grunwald-Giemsa em células HL-60, após pré-incubação com o NAC.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características dos diferentes tipos de morte celular.....	19
Tabela 2	Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade in vitro.....	48
Tabela 3	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da cordiaquinona J isolada da <i>Cordia leucocephala</i> Moric em linhagens de células tumorais.....	62
Tabela 4	Efeitos da cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μ M) sobre as fases do ciclo celular em células HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, triton X-100 e citrato após 0,5, 3, 6, e 24 horas de incubação.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Analisis of Variance (Análise de variância)
BrdU	Bromodeoxiuridina
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P.M.	Erro Padrão da Média
LA/BE	Laranja de Acridina/ Brometo de Etídio
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
PBS	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
RPMI	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
U	Unidade
UV	Ultra-Violeta
NAC	N-acetil-L-cisteína
EROs	Espécies reativas de Oxigênio
7AAD	7 amino-actinomicina
DCF	Diclorofluoresceína
H₂-DCF-DA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PE	Ficoertitrina
PS	Fosfatidilserina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Câncer	16
1.2	Tipos de Morte Celular	18
1.3	Estresse oxidativo	24
1.4	Produtos naturais	27
1.5	Quinonas	33
1.6	Gênero Cordia	35
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo geral	39
2.2	Objetivos Específicos	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	Materiais	41
3.2	Métodos	47
3.2.1	Obtenção da Cordiaquinona J	47
3.2.2	Cultivo de Células	48
3.2.3	Avaliação da atividade citotóxica em células tumorais in vitro	48
3.2.4	Avaliação da atividade citotóxica em células normais in vitro- Alamar Blue	49
3.2.5	Avaliação da atividade antiproliferativa em células leucêmicas HL-60 através da exclusão por azul de tripan	51
3.2.6	Inibição da Síntese de DNA-BrdU	51
3.2.7	Coloração diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina	52
3.2.8	Análise morfológica-Coloração por May-Grunwald-Giemsa	54
3.2.9	Determinação da Integridade da Membrana	54
3.2.10	Avaliação do ciclo celular e fragmentação de DNA	55
3.2.11	Determinação do Potencial Transmembrânico de Mitocôndria	56
3.2.12	Determinação da externalização da fosfatidilserina (PS)	57
3.2.13	Determinação da ativação de caspases efetoras 3 e 7	58
3.2.14	Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio	59
4	RESULTADOS	62
4.1	Citotoxicidade da Cordiaquinona J	62
4.2	Estudos dos efeitos da cordiaquinona J em células leucêmicas: proliferação e morfologia	63
4.3	Estudo dos mecanismos envolvidos nos efeitos da cordiaquinona J em células leucêmicas: análise temporal	67
4.4	Avaliação da participação da indução da formação de EROs no efeito da cordiaquinona J em células leucêmicas	77
5.	DISCUSSÃO	82
6.	CONCLUSÃO	96
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

A multiplicação das células em organismos multicelulares saudáveis é cuidadosamente regulada com o propósito de atender às necessidades específicas de cada indivíduo. Em um organismo jovem a taxa de proliferação celular é maior do que taxa de células que morrem, devido à necessidade de desenvolvimento do mesmo. Já em adultos esta taxa tende a ser balanceada a fim de manter um equilíbrio (homeostase) (Rabenhorst *et al.*, 1994; Foster, 2008).

As células cancerosas diferem das células normais, pelo fato de continuarem a crescer e se dividir, não obedecendo ao controle biológico natural do organismo (Hanahan & Weinberg, 2000). Dividindo-se rapidamente, estas células adquirem novas características genéticas que as tornam mais agressivas, determinando a formação do câncer (Hanahan & Weinberg, 2000, INCA, 2009). Algumas alterações na fisiologia das células caracterizam o câncer: auto-suficiência na sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese e invasão tecidual e metástase (Hanahan & Weinberg, 2000).

Essas características surgem a partir de alterações genéticas originadas do mau funcionamento dos circuitos regulatórios que governam a proliferação normal das células (Hanahan & Weinberg, 2000). Essas mutações, em geral, ocorrem em proto-oncogenes e em genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes promovem a proliferação ordenada enquanto os genes supressores de tumor mantêm essa proliferação sob controle, restringindo o crescimento celular. No entanto, quando mutados, os proto-oncogenes promovem o crescimento de tumores. Se o mesmo ocorrer com os genes supressores de tumor, a inibição da progressão do ciclo celular pode não ocorrer, o que irá facilitar o crescimento anormal das células (Louro *et al.*, 2002; Vermeulen, *et al.*, 2003).

Normalmente, células que sofrem mutações e/ou injúrias são reconhecidas e levadas à morte. No entanto, quando os pontos de checagem do ciclo celular falham, as células que conseguiram burlar esse sistema progridem ao longo do ciclo celular.

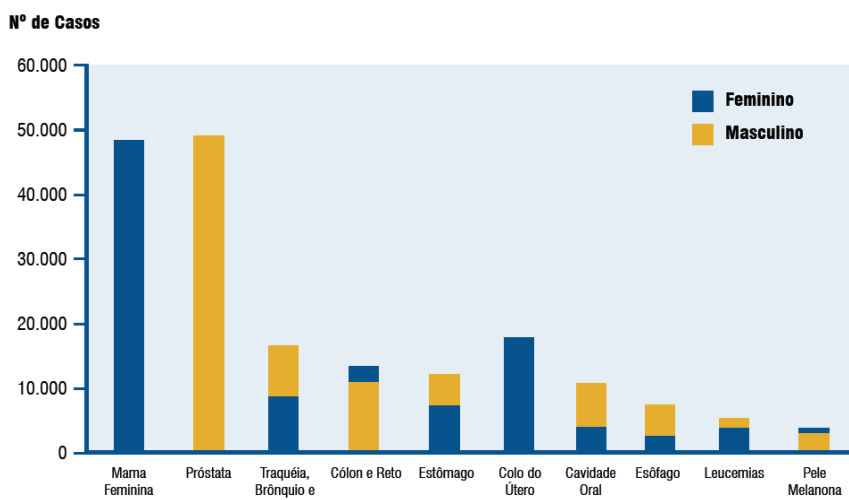
Essas células se dividem de maneira descontrolada acumulando novas mutações que irão contribuir para o surgimento de tumores malignos. Dessa forma pode-se afirmar que o câncer tem origem monoclonal. (Story, & Kodym, 1998; Lodish et al., 2002).

Com uma incidência anual de 6 milhões de casos, o câncer é considerado a segunda causa de morte causada por doenças no mundo, atrás apenas de mortes relacionadas a doenças cardiovasculares (Srivastava *et al.*, 2005).

Em 2005, cerca de 60 milhões de pessoas morreram em todo o mundo, sendo que aproximadamente 13% destas mortes foram ocasionadas pelo câncer. Dos quais, os mais incidentes foram os cânceres de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama (WHO, 2006).

Estima-se que em 2020 o número de novos casos aumente na ordem de 9 milhões ao ano quando comparado a 2005, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento (INCA, 2009).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam 466.730 casos novos de câncer (**Figura-1**). Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino, perfil semelhante ao encontrado no resto do mundo (INCA, 2009).



Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer - INCA

Figura 1. Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira, sem pele não melanoma.

O tratamento para o câncer pode ocorrer de maneiras variadas diferindo principalmente em relação ao tipo e a gravidade da doença. A quimioterapia do câncer consiste em um tratamento a base de fármacos que interferem em diferentes processos tais como desenvolvimento, crescimento, disseminação e invasão de células cancerígenas (Souza *et al.*, 2007). O câncer pode ser tratado através de monoquimioterapia ou por medicamentos combinados (poliquimioterapia), método este mais utilizado, porque apresentam resultados mais eficientes, conseguindo uma resposta satisfatória a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência do paciente aos fármacos e atingindo as células em diferentes fases do seu ciclo (Carvalho *et al.*, 2003; Nicolaou *et al.*, 1997). Atualmente, o tratamento da maioria dos cânceres consiste na combinação de diferentes abordagens terapêuticas e não apenas de uma. A quimioterapia, aliada à cirurgia e à radioterapia, constituem as principais modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento de pacientes com diferentes tipos de câncer (Kummar *et al.*, 2004).

Diante deste cenário, fica clara a necessidade de esforços contínuos sobre o desenvolvimento de novos medicamentos ou tratamentos para o controle desta doença.

1.2. Tipos de Morte Celular

Como descrito anteriormente um organismo multicelular procura sempre manter a sua homeostase, através de um balanço entre a proliferação e a morte celular. Diversos tipos de morte celular vêm sendo descritos, dentre elas estão: apoptose (suicídio celular), autofagia, necrose ou oncose, apesar de alguns autores não denominarem como sinônimos, catástrofe mitótica, excitotoxicidade e senescência (Tabela 1) (Kroemer, *et al.*, 2005).

Tabela 1: Características dos diferentes tipos de morte celular.

Tipos de morte celular	Mudanças morfológicas			Características bioquímicas
	Núcleo	Membrana celular	Citoplasma	
Apoptose	Condensação da cromatina; Fragmentação nuclear; Fragmentação internucleossomal do DNA (DNA ladder)	Íntegra; Formação de prolongamentos (Blebs)	Fragmentação (formação de corpos apoptóticos)	Dependente de caspase
Autofagia	Condensação parcial da cromatina; Sem formação de DNA ladder)	Formação de prolongamentos (Blebs)	↑ número de vesículas autofágicas	Independente de caspase; ↑ da atividade lisossomal
Catástrofe mitótica	Múltiplos micronúcleos; Fragmentação nuclear	-	-	Independente de caspase em estágio inicial; Ativação anormal de CDK1/ciclina B
Necrose	Degradação maciça e randômica do DNA nuclear	Inchaço e ruptura	↑ de vacuolização; Degradação de organelas; Inchaço mitocondrial	-
Senescência	Estrutura heterocromática distinta (Focos heterocromáticos associados a senescência)	-	Achatamento ↑granulosidade	Atividade SA-β-gal

CDK1, quinase 1 dependente de ciclina; SA-β-gal, β-galactosidase associada a senescência. Fonte: adaptada de Okada e Mak, 2004

Os processos de morte celular são de suma importância para o organismo manter a sua homeostase, evitando com que células defeituosas ou ineficientes permaneçam a exercer algum papel no organismo podendo, deste modo, ocasionar diversas enfermidades como, lupus, fibrose cística, e doenças pulmonares (Munoz, *et al.*, 2005; Vandivier, *et al.*, 2002; Hodge, *et al.*, 2003).

A autofagia é um tipo de morte celular em que as proteínas e organelas não desejadas são degradadas ou por proteólise mediada por ubiquitinas que são encontradas nos proteossomas ou são direcionadas e degradadas dentro dos lisossomos (Klionsky & Ohsumi, 1999; Kim & Klionsky, 2000). Sua morfologia é caracterizada pela condensação parcial da cromatina nuclear, formação de prolongamentos (Blebs) e pelo o aumento no número de vesículas autofágicas, que

normalmente apresentam uma dupla camada, visualizada apenas em microscópio eletrônico (Okada & Mak, 2004).

O termo catástrofe mitótica consiste em uma definição ampla que é bastante utilizada para explicar um tipo de morte celular típica de mamíferos, e que é ocasionada por mitoses defeituosas. Caracterizada pela formação de células multinucleadas, gigantes, e cromossomos não condensados (Okada & Mak, 2004).

A senescência é observada, principalmente, em células primárias em cultura, pois estas inicialmente entram em um período de rápida proliferação, durante o qual, os telômeros se tornam significativamente menores. Eventualmente, o crescimento celular desacelera e a célula entra em uma parada permanente no ciclo celular. A senescência possui uma morfologia típica que é o achatamento do citoplasma e o aumento da granulosidade celular (Dimri *et al.*, 1995).

A necrose geralmente é uma consequência de uma condição patofisiológica adquirida por infecções, inflamações ou isquemias. É considerado um processo de morte desregulado e traumático, associado normalmente com a liberação de componentes intracelulares no meio extracelular, gerando inflamação dos tecidos adjacentes. Quando em necrose a célula apresenta sua membrana distorcida e rompida, além da degradação das organelas e um inchaço celular. Resultando em falhas nas vias fisiológicas normais da célula, desregulando o transporte de íons, a produção de energia e o pH da célula (Okada & Mak, 2004).

Apoptose é um processo altamente regulado que ocorre em quase todas as células vivas e pode ser desencadeada por diversos estímulos fisiológicos e patológicos. A ativação de uma série de eventos moleculares que leva a morte celular por apoptose é caracterizada por mudanças bioquímicas e morfológicas típicas tais como redução celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos, e formação de blebs (Chen *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2004). As características bioquímicas associada com a apoptose incluem a clivagem de DNA internucleossomal, formando oligonucleossomas (DNA ladder), externalização da fosfatidilserina, ativação de caspases e clivagem de substratos intracelulares (Martin & Green, 1995). Como resultado destas mudanças, as células

apoptóticas são fagocitadas sem eliminar o seu conteúdo intracelular no meio, evitando que ocorra uma resposta inflamatória (Zimmermann *et al.*, 2001).

O componente central para que ocorra o processo de apoptose, consiste em um sistema proteolítico, o qual envolve proteases denominadas de caspases. Caspases são uma família de proteínas intracelulares envolvidas no processo de iniciação e execução da apoptose. As caspases iniciadoras são capazes de ativar as caspases efetoras ou amplificar a cascata de caspases através do aumento da ativação das caspases iniciadoras (Walker *et al.*, 1994; Thornberry & Lazebnik, 1998).

Com base em estudos anteriores sabe-se que existem quatro vias de morte, em que há a ativação de caspases para que ocorra a apoptose, denominadas de via intrínscica ou mitocondrial, extrínscica ou via de receptor de morte, via da granzima B e a via do retículo endoplasmático (Wang *et al.*, 2005).

A via do retículo endoplasmático é caracterizada pela liberação de cálcio citoplasmático ativando a caspase 12, o que ocorre provavelmente devido a translocação de membros da família Bcl₂ (Broker *et al.*, 2005).

A via mediada pela Granzima B pode induzir morte celular por duas vias: a via citossólica envolvendo ativação de caspases pró-apoptóticas, e a via nuclear que provavelmente está envolvida com proteínas reguladoras do ciclo celular e ativação de quinases (Berthou *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2005)

Quando a célula é ativada para a morte por via intrínscica (**figura-2**) o primeiro passo é a permeabilização da membrana mitocondrial resultando na liberação de proteínas que normalmente estavam localizadas no espaço intermembranar, (citocromo c, o fator de indução da apoptose (AIF), entre outros). Em seguida, o potencial transmembrânico da mitocôndria é reduzido (Chang & Yang, 2000; Green & Kroemer, 1998; Green & Reed, 1998). A liberação do citocromo c leva a formação de um complexo, denominado apoptossomo. O apoptossomo é formado quando o citocromo c se liga a Apaf-1 e a procaspase-9. Este complexo irá ativar a caspase-9 (Chang & Yang, 2000; Acehan *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 1999). A caspase-9 (caspase iniciadora) cliva as caspases efetoras 3, 6 e 7 ativando-as e estas irão fragmentar o DNA causando a morte da célula (Nicholson & Thornberry, 1997).

A via de receptor de morte ou via extrínscica (**Figura-2**) envolve a ativação de receptores de membrana. Eles são membros da superfamília de receptores de fatores de necrose tumoral (TNFR). Estão inclusos nessa família os receptores de membrana TNFR1, FAS (CD95), TRAIL entre outros. Esses receptores possuem um domínio distinto dentro do seu citoplasma denominado de domínio de morte (DD) (Ashkenazi & Dixit, 1998). Após a associação dos receptores de membrana ao seu correspondente domínio DD, ocorre uma mudança conformacional nos receptores o que promove o recrutamento de uma molécula adaptadora FAS que irá associar-se com o domínio de morte (DD) formando o FADD (Garg & Aggarwal, 2002; Mirkes, 2002). Este complexo formado é o responsável por iniciar a cascata de caspases, pois o FADD se liga a procaspase-8, que ativa a caspase-8. A caspase-8 ativa caspases efetoras como a caspase-3, promovendo o início da cascata de caspases da apoptose, levando a célula a morte (Chang & Yang, 2000).

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

Nos últimos anos diversas técnicas têm sido empregadas a fim de distinguir como ocorre o processo de morte celular. Para este fim, são utilizados métodos de análises quantitativos e qualitativas tais como: métodos em microscopia eletrônica e microscopia de luz. Análises morfométricas e citométricas podem ser realizadas por microscopia de luz, além de microscopia confocal e de fluorescência, bem como através de microscopia de eletrônica de transmissão (MET). Algumas destas técnicas

são largamente empregadas em laboratórios de pesquisa. Por exemplo, a MET é bastante utilizada para diferenciar morte por autofagia. Já a microscopia de luz é um modo simples e eficiente para identificar e quantificar morte celular. Células apoptóticas não são facilmente diferenciadas de outros tipos de morte através da microscopia de luz, portanto é necessária a utilização de outras técnicas para fazer a distinção entre os vários tipos de morte que pode ser encontrado em uma célula (Tinari *et al.*, 2008).

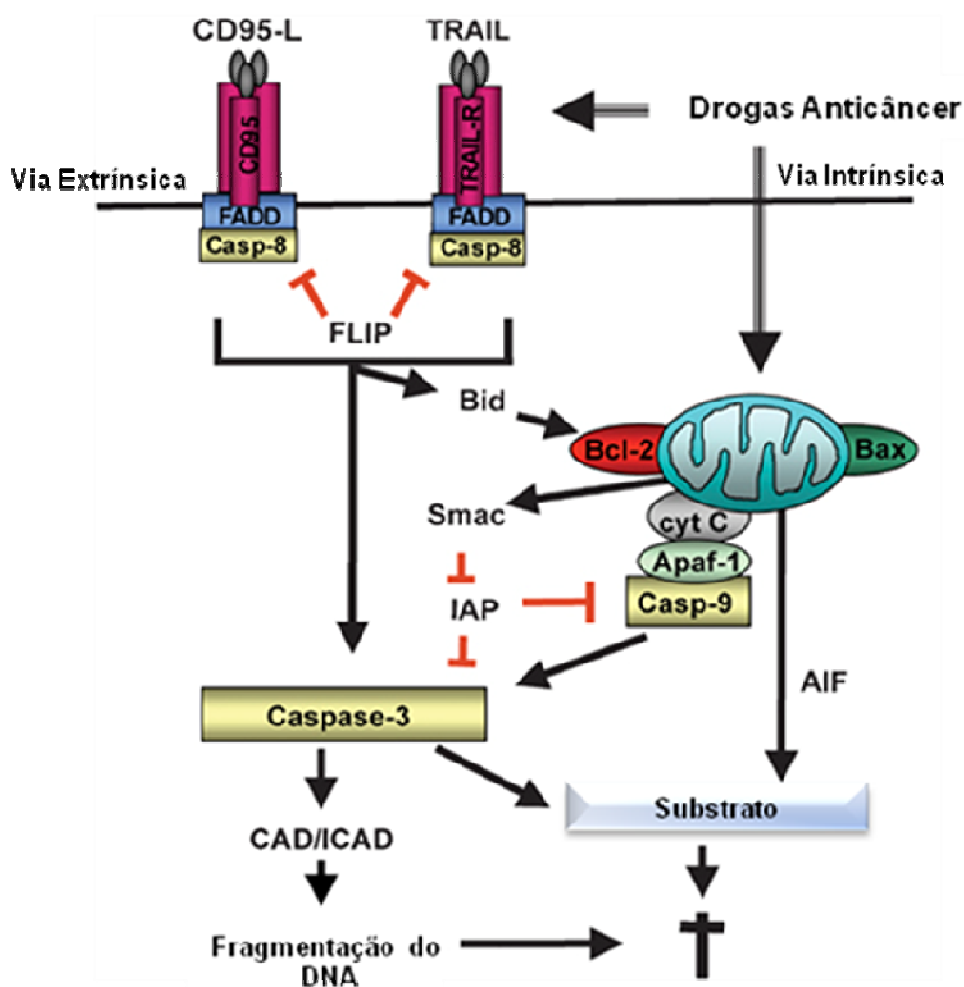


Figura-2. Esquema das vias intrínscita e extrínscita da apoptose.

1.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição bioquímica caracterizada pelo desequilíbrio entre a presença de níveis relativamente elevados de espécies tóxicas reativas e o mecanismo de defesa antioxidativo. Essas espécies tóxicas são constituídas principalmente de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). (Thannickal & Fanburg, 2000; Haddad, 2004; Carmody, 2001). As EROs e ERNs são moléculas orgânicas e inorgânicas que possuem um número ímpar de elétrons (elétrons não pareados) e são formadas, *in vivo*, por meio de reações de oxidação e de redução. Ao mesmo tempo em que o oxigênio pode ser um substrato importante no metabolismo oxidativo, ele também pode ser parcialmente reduzido para formar EROs (Aslan & Ozben, 2003).

Tradicionalmente, as espécies reativas de oxigênio (EROs) consistem principalmente de radicais anion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), oxigênio singlet, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxilas (OH^{\bullet}) altamente reativos, sendo consideradas como um grupo de moléculas bastante perigosas às células, tecidos e ao organismo como um todo (Ushio-Fukai & Nakamura, 2008). No entanto, é sabido que as EROs são essenciais para a vida, devido ao seu papel em muitos processos vitais, tais como, transdução sinais, além de agir como bactericida (Conklin, 2004).

As EROs, especialmente o H_2O_2 , são moléculas importantes em vias de sinalização tanto de animais quanto de plantas (Hancock *et al.*, 2001). Em animais as EROs podem influenciar na proliferação celular, ativando ou inibindo a apoptose e quando presente em altas concentrações podem causar necrose (Mates, 2000) além disso, podem estar envolvidas na expressão de genes e na ativação de várias vias de sinalização celular. Crawford e colaboradores, já em 1988, observaram que em presença de H_2O_2 havia o aumento de expressão de vários genes como o c-myc e o c-fos, posteriormente foi observado que o H_2O_2 também aumentava a expressão da glutathione-S-transferase e da fenilalanina (Desikan *et al.*, 1998), além de proteínas quinases e proteínas de reparo do DNA (Desikan *et al.*, 2000). A via JAK/STAT é também ativada pelo H_2O_2 o que provoca a transdução de mensagens para o núcleo (Simon *et al.*, 1998). Assim as EROs podem estar envolvidas em várias vias de

sinalização promovendo ativação de moléculas que podem estar envolvidas em numerosos processos celulares.

A grande maioria dos efeitos tóxicos ocasionados pelas EROs podem ser atribuídas ao radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$). No entanto, as EROs normalmente são formadas durante o metabolismo aeróbico normal, onde as células possuem sistemas de defesa antioxidantes efetivos tais como: enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase), além de radicais seqüestradores de EROs como ácido ascórbico, tocoferol e N-acetil-L-cisteína (Asche, 2005).

Teoricamente, as EROs podem reagir com todos os componentes da célula incluindo proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucléicos. Diversos estudos mostram que a liberação celular de EROs pode burlar o sistema de defesa antioxidativo e promover danos oxidativos típicos no DNA, lipídios, proteínas e carboidratos, portanto as EROs estão intimamente relacionadas com diversos tipos de doenças tais como o câncer e processos neurodegenerativos (O'Brien, 1991; Öllinger, 2002).

O estresse oxidativo celular pode induzir diversas respostas biológicas, incluindo parada no crescimento da célula momentaneamente, levando a adaptação; transcrição de genes; iniciação na via de transdução de sinais além de reparo e dano do DNA (Davies, 1990; Mates, 2000). Esses eventos determinam se a célula entrará em processo de morte seja por necrose, senescência ou apoptose ou se a célula sobreviverá retornando a sua proliferação normal (Mates, 2000).

Atualmente é bem estabelecido que diversos agentes quimioterápicos e a terapia por radiação promovem a geração de EROs em pacientes durante o tratamento do câncer (Conklin, 2004; Lamson & Brignall, 1999). Entre os quimioterápicos conhecidos que geram altos níveis de EROs estão as antraciclinas, epipodofilotoxinas, agentes alquilantes e camptotecinas (Conklin, 2004) já os taxanos e os alcalóides da vinca geram baixos níveis de EROs (Ozben, 2007).

Já no metabolismo redox (**Figura 3**), a homeostase das EROs e a sua metabolização são de suma importância na sinalização celular e na apoptose. Um aumento na geração de EROs, ou a redução de sua eliminação resulta na indução de

apoptose através da despolarização mitocondrial e da permeabilização da membrana mitocondrial. Com a permeabilização da membrana mitocondrial, proteínas intermembranares mitocondriais solúveis são liberadas, tais como o citocromo c e o fator de indução da apoptose, ativando a cascata de caspases e nucleases, levando a célula à morte pelo processo de apoptose (Costantini *et al.*, 2000).

Vários fármacos atualmente utilizados na clínica como a doxorrubicina e o rituximab geram EROs seguido pela despolarização da membrana mitocondrial (Bellosillo, *et al.*, 2001). Por outro lado, alterações no metabolismo redox podem levar a uma resistência medicamentosa (Rudin *et al.*, 2003).

Com esse propósito, diversos agentes experimentais estão em fase de estudo visando o desenvolvimento de novos medicamentos. Estes novos fármacos têm como objetivo, ocasionar morte celular principalmente pelo processo de apoptose, através do aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas ou por induzir apoptose diretamente através da mitocôndria, acompanhado pelo o aumento da geração de EROs, além da inibição de vias antiapoptóticas ou a depleção da glutathione (Renschler, 2004).

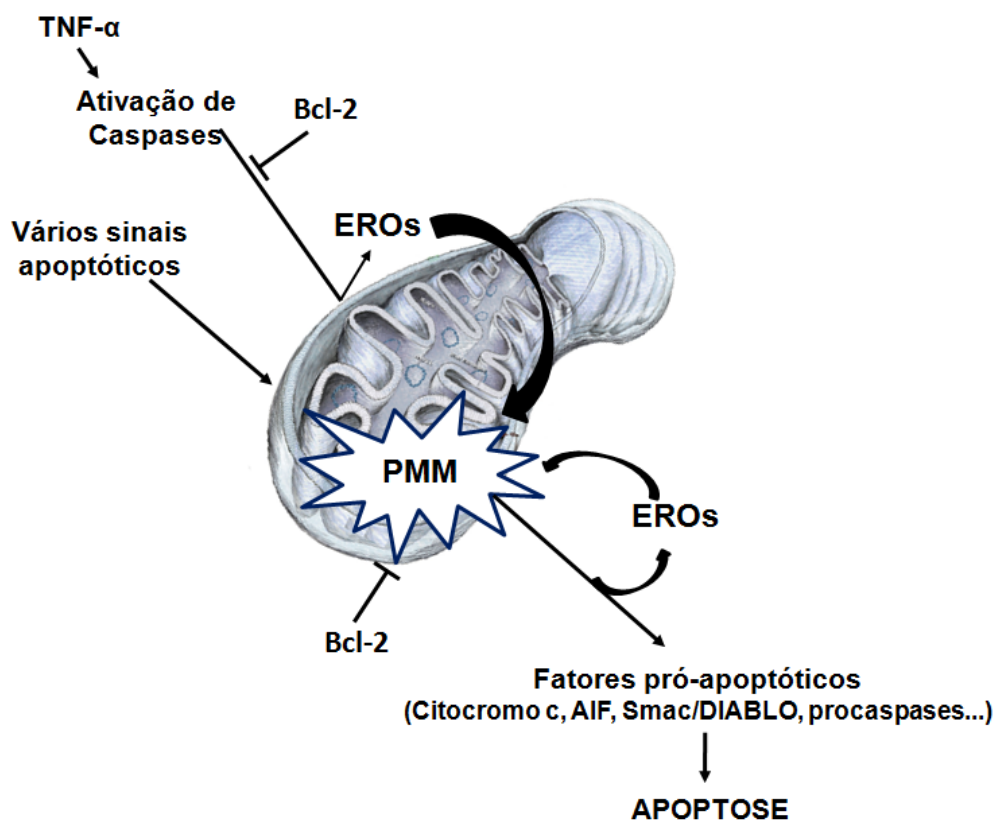


Figura 3: Modelo esquemático do papel das EROs mitocondrial na apoptose. Diversos sinais podem levar a apoptose e a indução das vias parece convergir a eventos que levam ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial (PMM) e a liberação de fatores pró-apoptóticos da mitocôndria. Fonte: adaptação de Fleury et al., 2002.

1.4 Produtos Naturais

Ao longo do tempo, os produtos naturais têm sido considerados inestimáveis ferramentas para decifrar lógicas de biossínteses e como protótipos para desenvolver drogas de primeira linha contra doenças tais como o câncer (Schwartzmann *et al.*, 2002; Cragg & Newman, 2005; Cragg *et al.*, 2006; Newman & Cragg, 2007).

As plantas têm uma longa história no tratamento do câncer (Hartwell, 1982; Cragg & Newman, 2005), sendo consideradas como uma importante fonte de substâncias utilizadas na terapia desta doença. Neste contexto, mais de 60% dos agentes usados constantemente no tratamento do câncer são oriundos direta ou indiretamente de fontes naturais incluindo plantas, organismos marinhos e micro-organismos (Cragg *et al.*, 2005; Newman *et al.*, 2003).

A pesquisa por agentes anti-câncer obtidos a partir de plantas começou seriamente na década de 50 com o descobrimento e o desenvolvimento dos alcalóides vinca, com a vimblastina e a vincristina, e através do isolamento de podofilotoxinas citotóxicas. Como resultado, o Instituto do Câncer dos Estados Unidos iniciou um extensivo programa de coletas de plantas em 1960, focando principalmente em plantas de regiões temperadas. Isto conduziu a descoberta de novas moléculas que mostraram ampla atividade citotóxica (Cassady & Douros, 1980), incluindo os taxanos e camptotecinas. No entanto, o desenvolvimento destes como agentes clinicamente ativos duraram cerca de 30 anos, de 1960 a 1990 (Cragg & Newman, 2005).

Dentre os produtos naturais, encontram-se os chamados metabólitos secundários, um grupo de substâncias que se destacam pelo grande potencial farmacológico. Estes são produtos de vias condicionais que são ativadas em contextos ou situações particulares. Os metabólitos secundários podem ser divididos em diversas classes estruturais: terpenos, lignanas, taninos, lactonas, esteróides, chalconas, flavonas, flavanonas, alcalóides, quinonas, dentre outros (Clardy & Walsh, 2004).

Muitas dessas substâncias são utilizadas como molde para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos, tais como a vimblastina (Velban®) e a vincristina (Oncovin®) e os análogos vindesina (Eldisine®) e vinorelbina (Navelbine®); o paclitaxel (Taxol®) e o análogo docetaxel (Taxotere®); a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (Etopophos®) e teniposídeo (Vumon®); e a camptotecina e os análogos, topotecano (Hycamtin®) e irinotecano (Camptosar®), atualmente utilizados na terapia anticâncer. Esses medicamentos apresentam uma participação no mercado que movimenta cerca de 50 bilhões de dólares anualmente (Pinto *et al.*, 2002).

A camptotecina (**Figura 4.1**) foi primeiramente isolada da planta *Camptotheca acuminata*, no entanto esta molécula pode ser encontrada em diversas plantas do mundo (Srivastava *et al.*, 2005). Estudos realizados na década de 70 mostraram que a camptotecina apresentava forte efeito citotóxico inibindo a topoisomerase I de maneira irreversível e causando fragmentação de DNA. Posteriormente a

camptotecina foi aprovada pelo FDA para testes clínicos de fase I e II, sendo indicada para pacientes com tumores gastrointestinais, no entanto o composto apresentou severos efeitos adversos como mielosupressão, vômitos, diarreia e cistite hemorrágica. Obviamente estes resultados inviabilizaram a continuação dos testes de fase II em 1972 (Srivastava *et al.*, 2005). Devido aos seus diversos e severos efeitos adversos, muitos estudos têm sido feitos a procura de análogos menos tóxicos. Com o passar dos anos a remodelação química produziu análogos como o topotecano (**Figura 4.2**) e o irinotecano (**Figura 4.3**) que se mostraram menos tóxicos e mais efetivos, sendo os únicos aprovados para utilização na clínica (Ormrod & Spencer, 1999).

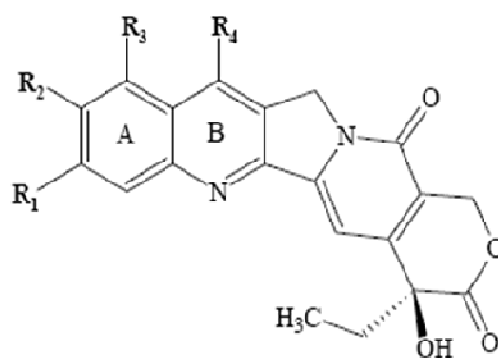
Além da camptotecina outro composto bastante estudado obtido de plantas é o paclitaxel (**Figura 5.4**) (Taxol®). O paclitaxel é um complexo diterpenóide polioxigenado extraído das cascas da planta *Taxus brevifolia* (Wani *et al.*, 1971). Inicialmente mostrou resultados animadores contra tumores de pulmão, ovário, mama e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço sendo aprovado em 1992 pelo FDA para o tratamento de metástases de carcinoma de ovário (Eisenhauer & Vermorken, 1998). Seu mecanismo de ação é através da estabilização dos microtúbulos, enquanto outros agentes antineoplásicos agem desestabilizando este processo, no entanto a principal desvantagem encontrada no taxol foi a sua baixa biodisponibilidade, isso ocorre principalmente devido a sua baixa solubilidade em água, além de possuir diversos efeitos colaterais, uma vez que essa droga causou fortes náuseas, formigamento nas extremidades, leucopenia e trombocitopenia (Schiff *et al.*, 1979; Hortwiz *et al.*, 2004).

Docetaxel (**Figura 5.5**) (Taxotere®) é um análogo relacionado estruturalmente ao paclitaxel, que apresentou atividade anticâncer e solubilidade em água melhor que o paclitaxel (Bissery *et al.*, 1991; Ringel & Hortwitz 1991) sendo utilizada em pacientes com metástases avançadas de câncer de pulmão e mama (Pazdur *et al.*, 1993), apesar de causar diversos efeitos adversos.

A Podofilotoxina (**Figura 6.6**) e o deoxipodofilotoxina são dois ariltetralina lignanos de ocorrência natural bastante conhecidos. A podofilotoxina foi primeiramente isolada da planta *Podophyllum peltatum*, sendo isolada posteriormente

de diversas outras plantas (Podwyssotzki, 1880). Age inibindo a organização dos microtúbulos, além de provocar uma parada do ciclo celular na metáfase (Gordaliza *et al.*, 2000 & Srivastava *et al.*, 2005). A podofilotoxina apresenta excelente atividade antitumoral contra cânceres genitais, pulmonares e linfomas, no entanto não obteve sucesso como um antineoplásico, devido apresentar diversos efeitos colaterais, tais como, náuseas, vômitos e danos aos tecidos saudáveis. (Utsugi *et al.*, 1996; Subrahmanyam *et al.*, 1998; Srivastava *et al.*, 2005). Conseqüentemente a podofilotoxina não é utilizada como uma droga anticâncer, no entanto serviu como um protótipo para duas novas drogas, etoposideo (**Figura 6.7**) e o teniposideo (**Figura 6.8**), que se apresentam mais potentes e menos tóxicos que a podofilotoxina e são utilizados no tratamento de leucemias agudas, linfomas, tumores de bexiga, cérebro, pulmão, ovário e contra câncer testicular (Schacter, 1996; Srivastava *et al.*, 2005).

Como pôde ser observado nos exemplos acima, os produtos naturais não necessariamente precisam ser o melhor composto para o uso farmacêutico (Kingston, 1996). Esses compostos podem servir como protótipo na remodelagem química para criar novos compostos e assim o desenvolvimento de uma segunda geração de agentes com características melhoradas, dentre elas o aumento da eficácia e da estabilidade, a melhora das propriedades farmacocinéticas e a diminuição dos efeitos colaterais (Ortholand & Ganesan, 2004). A obtenção de análogos é um processo comumente utilizado para descobrir os grupamentos essenciais à atividade biológica, através do uso da relação entre a estrutura e atividade biológica.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Camptotecina (1)	H	H	H	H
Topotecano (2)	H		CH ₂ N(CH ₃) ₂	H
Irinotecano (3)	H		H	Etil

Figura-4. Estruturas da Camptotecina (1) e de seus análogos Topotecano (2) e Irinotecano (3).

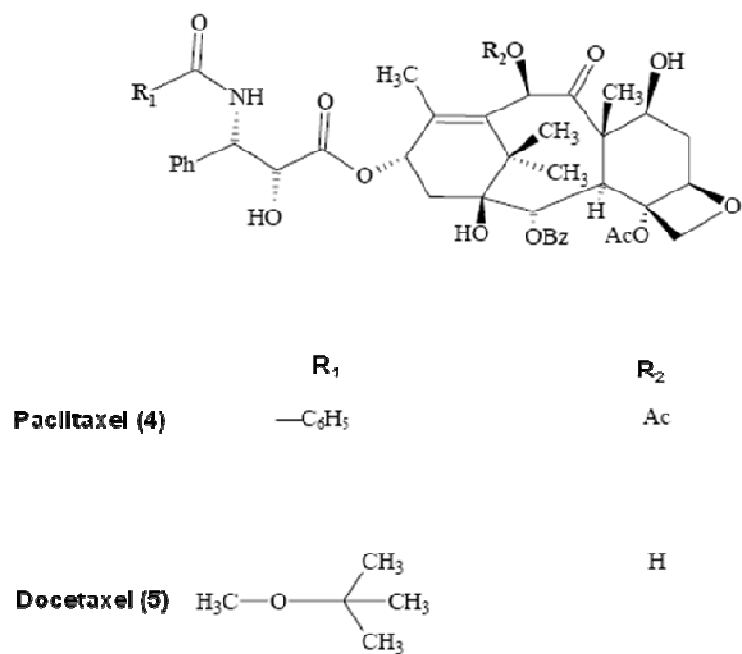


Figura-5. Estrutura do paclitaxel (4) e seu análogo docetaxel (5).

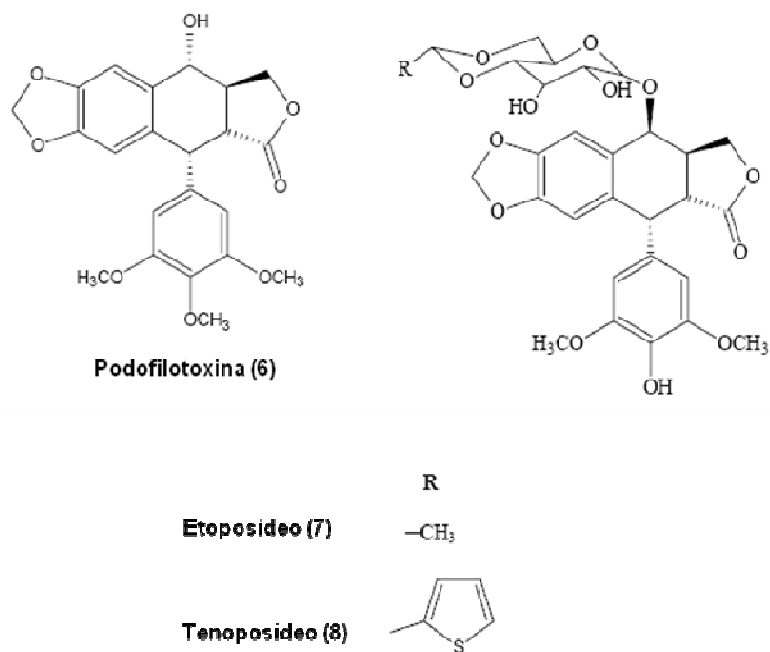


Figura-6. Estruturas da Podofiloxina (6), do Etoposídeo (7) e do Tenoposídeo (8)

1.5 Quinonas

As quinonas fazem parte de uma grande classe de compostos, que podem ter origem natural ou sintética (Asche, 2005). Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico: benzoquinonas - um anel benzênico; naftoquinonas - um anel naftalênico; antraquinonas - um anel antracênico linear ou angular (**Figura 5**) (Silva *et al.*, 2003).

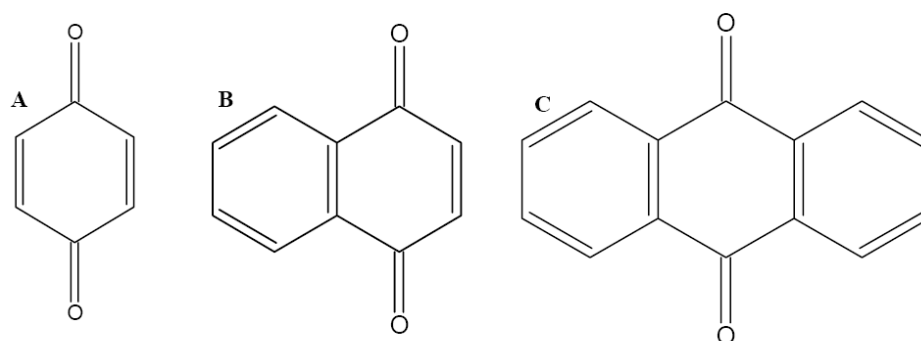


Figura 7. Estrutura esquemática de (A)- benzoquinona, (B) naftoquinona e (C) antraquinona

As quinonas apresentam uma enorme variedade de atividades biológicas. Por exemplo, a coenzima Q é uma benzoquinona que possui a habilidade de carrear elétrons na cadeia transportadora de elétrons. A vitamina K é uma naftoquinona necessária para a coagulação do sangue além de participar na carboxilação do glutamato formando o γ -carboxiglutamato. A juglona é, outra naftoquinona de origem natural, obtida da planta *Juglans nigra* e a plumbagina extraída da *Plumbago rósea*, apresentaram atividades bactericida, anticâncer e fungicida. (Asche, 2005; Cenas *et al.*, 2006). As antraciclina são entre os quimioterápicos mais utilizados para o tratamento de câncer. Os principais representantes desta classe são a doxorubicina e a daunorrubicina, pois são altamente prescritos para o tratamento de neoplasias. A daunorrubicina é utilizada, principalmente, para o tratamento de leucemias agudas, enquanto a doxorubicina pode ser utilizada tanto para o tratamento de leucemias agudas quanto para o tratamento de vários tipos de tumores sólidos (Asche, 2005). O mais interessante é que estas duas substâncias apresentam estruturas bastante

semelhantes, diferindo apenas em um grupo hidroxila na cadeia lateral 9. No entanto ambas as substâncias apresentam diversos efeitos adversos, muitas vezes inviabilizando o tratamento a longo prazo (Asche, 2005).

Como pôde ser observado, as quinonas representam uma classe de compostos de grande interesse farmacológico e toxicológico. Muitas drogas clinicamente importantes na terapia do câncer contêm o núcleo quinonoídico, apresentando excelente atividade anticâncer (Foye, 1995; Monks & Lau, 1998; Monks & Jones, 2002).

A atividade citotóxica das quinonas pode estar relacionada ao seu comportamento químico. Assim vários mecanismos de ação já foram propostos para explicar sua atividade citotóxica. Estudos prévios mostraram que as quinonas podem sofrer redução eletrônica por enzimas como NADPH: citocromo P450 redutase ou a NADH ubiquinona oxidoreductase, produzindo radicais semiquinonas. Sob condições aeróbias estes radicais semiquinonas participam do ciclo redox para gerar EROs, como ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio. Outro mecanismo proposto está relacionado com a capacidade desses compostos reagirem com grupos tióis de proteínas e glutatona (GSH), levando em consideração que quinonas são compostos altamente eletrofílicos. Deste modo, ao reagirem com a glutatona espontaneamente ou catalizadas pela glutatona-S-transferase formam conjugados denominado hidroquinonas-glutationil. Uma vez que o GSH diminui a sua concentração, proteínas dependentes de grupos tióis (SH) celulares podem ser alquiladas, ocasionando mudanças irreversíveis e levando a célula à morte (Monks & Lau, 1998; Monks & Jones, 2002; Chung *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 2004). No entanto seu exato mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido (Asche, 2005).

Apesar da variedade de atividades, muitas das quinonas atualmente conhecidas e utilizadas como fármacos apresentam vários efeitos adversos, devido principalmente à formação de metabólitos gerados a partir do metabolismo oxidativo das quinonas. Por exemplo, o analgésico acetaminofeno pode causar hepatotoxicidade severa em altas doses. Esta hepatotoxicidade é atribuída a dois metabólitos formados que são a benzoquinoneimina, formada pelo citocromo P 450, e a p-benzoquinona formada pela hidrólise da benzoquinoneimina (Pascoe *et al.*, 1988). A fenetidina

outro analgésico estruturalmente relacionado ao acetaminofeno foi retirado do mercado devido apresentar graves efeitos colaterais como nefropatite e câncer pélvico, após o tratamento a longo prazo (Larsson *et al.*, 1986). Assim torna-se necessária a busca contínua por novos fármacos que sejam mais efetivos e causem menos efeitos colaterais.

1.6 Gênero *Cordia*

O gênero *Cordia* é constituído por aproximadamente 250 espécies com distribuição pantropical. Este gênero possui o maior centro de diversidade taxonômica no novo mundo, sendo particularmente bem representado no Brasil, onde são encontradas aproximadamente um quarto do total (Taroda & Gibbs, 1986; Barroso, 1986).

O gênero *Cordia* é composto por três subgêneros: *Varronia* (L), *Cordia* (L) e *Myxa* Taroda, sendo este último subdividido em três seções: seção *Myxa* (Endl.) D.C., seção *Gerascanthus* (Brousne) Don. e seção *Superbiflorae* Taroda (Taroda & Gibbs, 1987). No Brasil, o subgênero *Varronia* é representado por trinta espécies já o subgênero *Myxa* é representado por trinta e cinco espécies. O gênero *Cordia* L. foi descrito por Linnaeus em 1753 (Taroda, 1984) e pertence a família *Boraginaceae*, a qual conta com cerca de 100 gêneros e 2.000 espécies difundidas nos trópicos, nas regiões temperadas e árticas (Angely, 1970; Barroso, 1986; Ficarra *et al.*, 1995).

Apesar da importância econômica e etnofarmacológica apresentada por algumas espécies do gênero *Cordia* e do crescente número de trabalhos em fitoquímica, pouco se conhece sobre as ações farmacológicas, embora várias espécies sejam bastante utilizadas nos sistemas de medicina tradicionais em várias partes do mundo (Arrebola *et al.*, 2004).

Muitas plantas deste gênero são usadas na medicina tradicional, principalmente, como cicatrizante, diurético, anti-helmíntico e anti-térmico; no tratamento de infecções urinárias, malária, hanseníase e doenças pulmonares (Tiwari *et al.*, 1967; Saito & Oliveira, 1986; Marston *et al.*, 1988). Alguns estudos também foram realizados com extratos e pôde ser observado atividade contra o vírus do HIV

(Matsuse *et al.*, 1998), atividade antimicrobiana (Souza *et al.*, 2004) e atividade antialérgica e antiinflamatória (Passos *et al.*, 2007).

Com os constituintes químicos isolados, foram encontradas atividades bactericida, antifúngica, larvicida, inseticida e antiinflamatória (Marston *et al.*, 1988; Bieber *et al.*, 1990; Sertié *et al.*, 1990). Além disso, foi observado que uma benzoquinona isolada das raízes de *Cordia globosa* apresentou atividade anticâncer contra algumas linhagens de células tumorais humanas (Menezes *et al.*, 2005).

Gibbs, em 1974, estudando membros da família *Boraginaceae* Jussieu, sob ponto de vista químico, indicou a presença das seguintes classes de substâncias no gênero *Cordia* L.: quinonas, hidroquinonas, terpenóides, alcoóis terpênicos, compostos fenólicos, flavonóides, saponinas, taninos, compostos cianogenéticos, mucilagens, esteróides, compostos nitrogenados (alantoína e alcalóides pirrolizidínicos), e ácidos graxos (ácido gama linolênico).

Bieber *et al.*, em 1990, em trabalho realizado em cooperação com o Departamento de Antibióticos de Recife no Brasil e o Instituto de Clínica da Universidade Católica Sacro Cuore de Roma, na Itália, isolaram e identificaram, duas quinonas merosesquiterpenóides denominadas por eles de Cordiaquinona A e B. Quatro anos depois em 1994, Bieber, Krebs e Schafer, isolaram as cordiaquinonas denominadas C e D.

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

Todas as Cordiaquinonas apresentaram potente atividade antifúngica, contra os fungos *Cladosporium cucumerinum* e *Candida albicans*, e larvicida, contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* (Arkoudis & Stratakis, 2008). Diniz e colaboradores em 2009 isolaram mais duas novas cordiaquinonas (L e M) extraídas das raízes de *Cordia leucocephala*. Sendo que, ainda não foram descritas nenhuma atividade biológica para estas novas cordiaquinonas.

Dentre as várias espécies do gênero *Cordia* encontramos a *C. leucocephala* Moric., popularmente conhecida com Maria-preta, moleque duro, negro-duro, bamburral, entre outros. Esta ocorre apenas no Brasil (Taroda, 1984). Devido a beleza de suas flores é muito cultivada em todo o Brasil com fins ornamentais. É uma planta de largo uso na medicina popular, onde, em várias localidades do Nordeste brasileiro, todas as partes da planta são utilizadas para este fim. Usa-se na forma de infusão e decostos, sobretudo das folhas. Usa-se no combate ao reumatismo, indigestão e como tônico, em geral. O xarope de suas folhas é usado no tratamento do raquitismo infantil e artrites (Agra, 1996). Segundo Chiappeta e colaboradores. (1983) a planta possui atividade bactericida e fungicida contra os seguintes microorganismos: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans*.

Apesar de haver poucos estudos relacionados à atividade citotóxica das cordiaquinonas, a avaliação de suas propriedades anticâncer é extremamente válida, devido principalmente aos efeitos observados por outras naftoquinonas previamente estudadas.

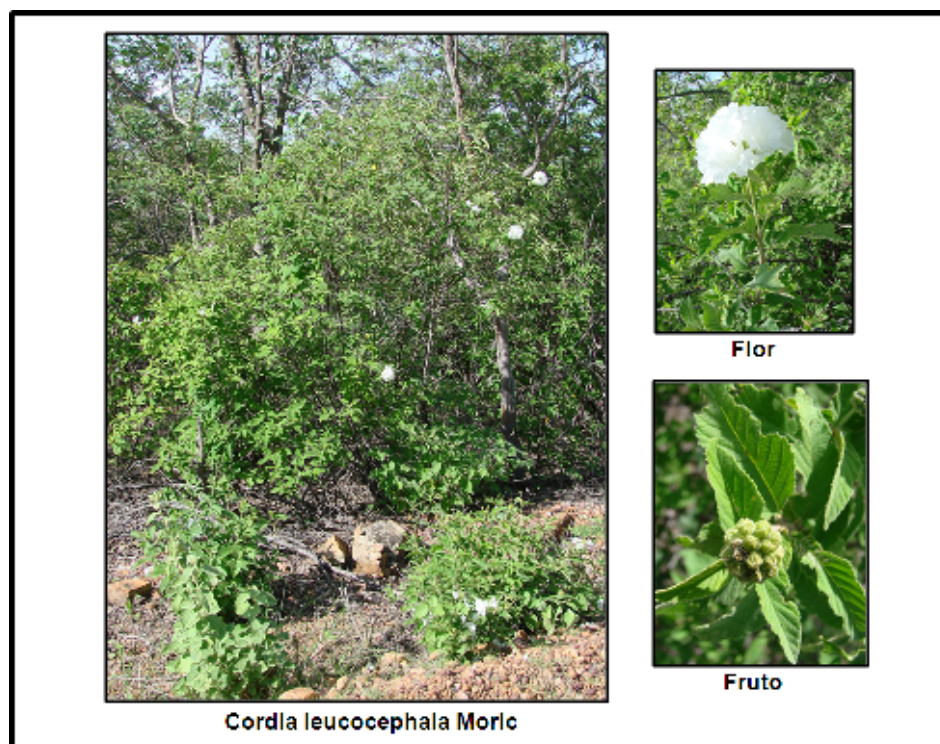


Figura 8. *Cordia leucocephala* Moric

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo geral estudar as propriedades citotóxicas da cordiaquinona J isolada das raízes de *Cordia leucocephala* Moric.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da cordiaquinona J sobre a viabilidade de células tumorais e células normais;
- Avaliar o efeito da cordiaquinona J sobre a progressão do ciclo celular e determinar qual tipo de morte celular induzida em células leucêmicas humanas;
- Avaliar o efeito citotóxico da cordiaquinona J de uma maneira tempo dependente em células leucêmicas humanas;
- Avaliar o potencial redox da cordiaquinona J sobre as células leucêmicas humanas

*Materiais e
 Métodos*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Equipamentos

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2

Agitador de tubo, Donner AD 8850

Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di

Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212

Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403

Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin

Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte mini

Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter

Fluxo laminar, VECO

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

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

Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot

Microscópio de fluorescência, Olympus

Micrótomo, Slee Mainz

pHmetro, Micronal B474

Pipetas automáticas, Gilson

Soluções, Reagentes e Fármacos

Ácido Acético	-	Vetec
Ácido Clorídrico	-	Vetec
Álcool Etílico	70 %	Vetec
Alamar Blue	0,3 mg/mL	Sigma®
Anticorpo anti-BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU	Sigma®
	BSA 5 % q.s.p. 500 µL de solução	Dako
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan	Sigma®
	PBS q.s.p. 100 mL de solução	-
BrdU 10mM	-	Sigma®
Brometo de Etídio 100 µg/mL	1mg de brometo de etídeo	Sigma®
	PBS q.s.p 10 mL de solução	-
Citrato de Sódio	-	Grupo Química

Cloreto de Sódio (NaCl)	-	Labsynth®
	5 µL de DAB	Immunotech©
Diaminobenzidina (DAB)	1 mL de Tris-HCl (Tris 0,05M) pH=7,6	Proquímios
	2 µL de H ₂ O ₂	Proquímios
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	Vetec®
Doxorrubicina – fornecida pelo Instituto do Câncer do Ceará – ICC	2,5 mg/mL	Zodiac®
EDTA	-	Qeel
	0,5 g de Eosina	Doles©
Eosina 0,5%	80 mL de Álcool etílico	Vetec
	0,5 mL de Ácido acético	Vetec
	20 mL de H ₂ O	-
Eosina-Azul de Metileno (May-Grunwald)	0,2 g Metanol q.s.p. 100 mL de solução	Reagen

Estreptavidina – peroxidase	1 µL de Estreptavidina – peroxidase	Sigma®
	BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução	Dako®
Ficoll	-	Sigma®
Fitohemaglutinina	-	Sigma®
Giemsa	-	Bioclin
	0,5 g de Hematoxilina	Doles®
	10 mL de Glicerina	Labsynth®
Hematoxilina 0,1%	25 g de Sulfato de alumínio	Labsynth®
	0,1 g de Iodeto de potássio	Labsynth®
	H ₂ O q.s.p. 500 mL de solução	-
Hidróxido de Sódio (NaOH)	-	Vetec®
	1 mg de iodeto de propídeo	Boehringer©
Iodeto de propídeo 50 µg/mL	PBS q.s.p. 50 mL	
Laranja de Acridina	1 g de laranja de acridina (100 µg/mL)	Fluka®
	H ₂ O q.s.p. 10 mL de solução	-

Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e esterelizada, filtrado em filtro millipore (0,22 µm) e complementado com SBF 10 %, 1 % de glutamina, 1 % de antibióticos, 1 % de bicarbonato de sódio (0,75 %) e 25 mM de HEPES	Cultilab®
MTT	20 mg de MTT	Sigma®
	PBS q.s.p. 100 mL de solução	-
Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL	Cultilab®
	Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab®
Solução de Neutralização	Tris 0,4 M, pH = 7,5	
Solução desnaturante (para análise de incorporação de BrdU)	Formamida 70 % 2x SSC (pH entre 6,5 e 7,5 a 70 °C)	Vetec®
Soro fetal bovino	-	Cultilab®
Solução salina (para hemólise)	8,5 g de Cloreto de sódio (0,85 %)	Labsynth®
	1,11 g de Cloreto de cálcio (10 mM)	Reagen®
	H ₂ O q.s.p 1 L de solução	-

	Cloreto de sódio 1,5 M	
SSC 10X	Citrato de sódio 0,15 M	-
	H ₂ O	
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio	Labsynth®
	2,14 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O	Labsynth®
	0,276 g de NaHPO ₄ .H ₂ O	Labsynth®
	H ₂ O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	-
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M	Labsynth®
	Tris 0,5 M (pH= 7,6)	Proquímios®
	H ₂ O	-
	50 mL de Tripsina 2,5 %	Cultilab®
Tripsina 0,25%	0,125 g de EDTA	Proquímios®
	450 mL de PBS	-
Triton X -100	-	Isofar
Xilol 10 %	100 mL de formaldeído	Dinâmica®

H₂O q. s. p. 1 L

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Obtenção da Cordiaquinona J

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

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

Um composto puro (68,9 mg) foi isolado da fração 22/23, que foi identificado como cordiaquinona J. Posteriormente a estrutura da cordiaquinona J foi determinada por ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D.

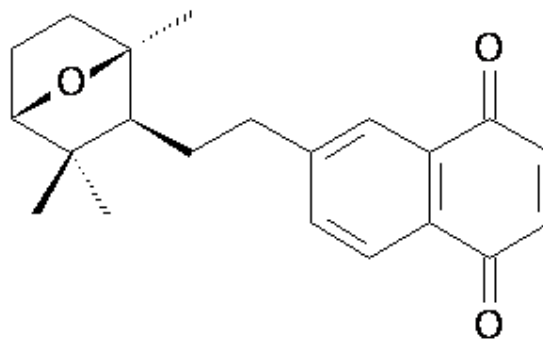


Figura 9. Estrutura da cordiaquinona J isolada das raízes de *Cordia leucocephala*

3.2.2. Cultivo das células

Nesse trabalho foram utilizadas quatro linhagens celulares, sendo uma linhagem em suspensão (HL-60) e três linhagens aderidas (MDA-MB-435, HCT-8 e SF-295), todas obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD) (**Tabela 2**). As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm², volume de 250 mL para células em suspensão), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95 % de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas.

Tabela 2 - Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade in vitro

Linhagem Celular	Tipo Histológico do Câncer/Origem	Concentração de Plaqueamento (cél/s/mL)
HL-60	Leucemia promielocítica humana	0,3 x 10 ⁶
MDA-MB 435	Melanoma	0,1 x 10 ⁶
HCT-8	Carcinoma de cólon humano	0,1 x 10 ⁶
SF-295	Glioblastoma humano	0,1 x 10 ⁶

3.2.3. Avaliação da atividade citotóxica em células tumorais *in vitro*

A citotoxicidade da cordiaquinona J foi avaliada, através do método do MTT.

O método consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT), de cor amarela, para o formazan, composto de cor azul. Essa conversão do MTT em formazan só ocorre em células viáveis e metabolicamente ativas, através da ação da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias, o que permite desta forma a quantificação indireta da porcentagem de células vivas (Mosmann, 1983).

Procedimento experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram plaqueadas em placas de 96 poços numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL, para células em suspensão e $0,1 \times 10^6$ células/mL para células aderidas. A cordiaquinona J foi incubada juntamente com as células durante 72 horas, em concentrações variando de 0,03 a 15,4 μM , em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 e 95 % de umidade. A doxorrubicina (0,01 a 8,6 μM) foi utilizada como controle positivo. Após 69 horas de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm / 15 min.) e o sobrenadante foi descartado. Em seguida em cada poço foi adicionado 200 μL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640), e novamente incubada por mais 3 horas. Após esse período, as placas foram centrifugadas (3000 rpm/10 min.) e tiveram o sobrenadante descartado, permanecendo somente o precipitado azul de formazan. O precipitado foi então ressuspenso em 150 μL de DMSO e agitado por cerca de 10 minutos até sua completa dissolução. Para a quantificação do sal de MTT reduzido, as absorvâncias foram medidas no espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595nm.

Análise dos dados

Os compostos foram testados em diluição seriada, em duplicata, e suas CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e

respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram determinados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 4.0 (GraphPad Software).

3.2.4. Avaliação da atividade citotóxica em células normais in vitro – Alamar Blue

A citotoxicidade da cordiaquinona J em células normais foi avaliada através do ensaio do alamar blue, utilizando células mononucleadas de sangue periférico humano CMSP, que inclui linfócitos e monócitos. O alamar blue, recentemente identificado como resazurina (O'Brien *et al.*, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico, onde em sua forma oxidada apresenta uma coloração azul (não fluorescente/célula não viável) e em sua forma reduzida uma coloração rósea (fluorescente/célula viável). Assim como o MTT, o alamar blue reduz-se em células vivas, e assim pode ser quantificado e utilizado para avaliar a viabilidade celular.

Procedimento experimental

As células mononucleadas foram obtidas do sangue periférico de voluntários sadios após centrifugação em gradiente de Ficoll. As células foram removidas, lavadas com tampão fosfato e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina para uma concentração final de 3×10^5 células/mL. Fitohemaglutinina (3%) foi adicionada para induzir a proliferação dos linfócitos. Após 24 horas de incubação das células, a cordiaquinona J foi adicionada em cada poço durante 72 horas, em concentrações variando de 0,03 a 15,4 µM, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95 % de umidade. A doxorubicina (0,01 a 8,6 µM) foi utilizada como controle positivo. Vinte e quatro horas antes de completar o período de incubação, 10 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue foram adicionados em cada poço. Após 72 horas de incubação as absorbâncias foram medidas no espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado).

Análise dos dados

A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % proliferação = $A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$. Onde, A_{LW} e A_{HW} são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0 = AO_{LW}/AO_{HW}$. Onde, AO_{LW} e AO_{HW} são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. Os compostos foram testados em diluição seriada, em duplicata ou triplicata, e suas CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram determinados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 4.0 (GraphPad Software).

3.2.5. Avaliação da atividade antiproliferativa em células leucêmicas HL-60 através da exclusão por azul de tripan

Este ensaio consiste em avaliar a cinética de crescimento de células leucêmicas (HL-60) tratadas com cordiaquinona J e assim poder avaliar o efeito o efeito antiproliferativo desta substância após 24 horas de incubação

O corante azul de tripan permite a distinção individual das células viáveis das não-viáveis, onde o corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o azul de tripan para fora, fazendo com que as células mortas apresentem uma coloração azulada.

Procedimento experimental

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas com a cordiaquinona J nas concentrações de 1,5 e 3,0 μ M. A doxorubicina (0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo. Após o período de incubação (24 horas) foi retirada uma alíquota de 90 μ L da suspensão de células e adicionado a 10 μ L do azul de tripan. Em seguida uma alíquota de 10 μ L foi colocada em uma câmara de Neubauer e as células diferenciadas e contadas em viáveis e não viáveis.

Análise dos dados

O número de células contadas em cada experimento foram expressos como a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.2.6. Inibição da síntese de DNA – BrdU

A bromodeoxiuridina (BrdU) é uma base nitrogenada análoga a timina. Quando as células estão sintetizando DNA o BrdU é incorporado no lugar da timina. A detecção do BrdU incorporado nas células é feita por técnicas imunocitoquímicas, onde se ligam anticorpos monoclonais e um cromógeno específico, a diaminobenzidina (DAB), que vai conferir uma coloração marrom ao núcleo das células que incorporaram o BrdU. (Matsuoka *et al.*, 1990).

Procedimento Experimental

As células HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 h com a cordiaquinona J nas concentrações de 1,5 e 3,0 μM . A doxorubicina (0,5 μM) foi usada como controle positivo. Três horas antes do período de incubação o BrdU (0,01 μM) foi adicionado em cada poço da cultura de células. Após o período de incubação, lâminas foram preparadas em citocentrífuga (cytospin) e postas para secar por 2 horas. Após o período de secagem foram fixadas em metanol por 1 minuto. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 minutos a 70° C e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram circuladas com caneta hidrofóbica e incubadas com anticorpo primário e deixadas na geladeira durante a noite em câmara úmida. As células foram incubadas com anticorpo secundário biotilado por 20 minutos e, então, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 minutos. Adicionou-se o cromógeno DAB por poucos segundos, o qual foi removido com água destilada. A hematoxilina foi utilizada como contracorante.

Análise dos dados

Duzentas células foram contadas, diferenciando-as entre núcleo marrom (incorporaram o BrdU) e não-marrom (não incorporam o BrdU). Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes (realizados em duplicata). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnet, utilizando o programa Prisma versão 4.0 (GraphPad Software), com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

3.2.7. Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

O método de coloração pelo brometo de etídio / laranja de acridina permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da coloração diferencial por fluorescência com base em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (MCGAHON *et al.*, 1995). A laranja de acridina (LA) consegue atravessar membranas celulares intactas e se ligam ao DNA, conferindo uma aparência verde ao núcleo das células. O brometo de etídio (BE) é incorporado principalmente por células com a membrana já danificada (não viáveis), ligando-se ao DNA e corando-o de laranja. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE. Morfologicamente, observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células em necrose (lesão de membrana) apresentam um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e não há formação de corpos apoptóticos. Possivelmente, as membranas plasmáticas permaneçam intactas durante o fenômeno apoptótico até os últimos estágios quando se tornam permeáveis aos solutos normalmente retidos.

Procedimento Experimental

As células HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 horas com a cordiaquinona J nas concentrações de 1,5 e 3,0 μ M. A doxorubicina (0,5 μ M) foi usada como controle positivo. Uma alíquota de 1 mL da suspensão de células foi transferida para um tubo

ependorf e centrifugada por 5 min a 2000rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 20 μ L de solução de PBS. Em seguida, 1 μ L da solução de BE:LA foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células transferido para uma lâmina, montado com lamínula, e em seguida levadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares.

Análise dos dados

Para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas), foram contadas 300 células de cada amostra. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnet, utilizando o programa Prisma versão 4.0 (GraphPad Software), com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

3.2.8. Análise morfológica - Coloração por May-Grunwald-Giemsa

A coloração por May-Grunwald-Giemsa baseia-se em interações eletrostáticas entre os corantes e moléculas-alvo. Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma.

Procedimento experimental

Células HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 h com a cordiaquinona J na concentração de 1,5 e 3,0 μ M. A doxorubicina (0,5 μ M) foi usada como controle positivo. Para observar a morfologia das células, lâminas foram preparadas, com 50 μ L da suspensão de células, em citocentrífuga (cytospin) e fixadas com metanol 100% por 30 segundos. Em seguida as laminas foram coradas com May-Grunwald, por 10 segundos, e em seguida com Giemsa por 10 segundos.

Análise dos dados

As lâminas com as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle negativo (não-tratado). O registro das alterações celulares foi feito através de fotografias.

.3.2.9. Determinação da Integridade da Membrana

Este método consiste na capacidade do iodeto de propídeo (PI) se ligar ao DNA de células cuja membrana plasmática esteja rompida, como nos casos de apoptose tardia e necrose, emitindo uma alta fluorescência quando excitado pelo laser de argônio (488nm). Nas células cuja membrana permanece íntegra (células viáveis), o PI não consegue penetrar e, portanto emite uma fluorescência mais baixa, com isso as células vivas podem diferenciadas das mortas.

Procedimento Experimental

Células HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 0,5; 3; 6 e 24 horas com a cordiaquinona J nas concentrações de 1,5 e 3,0 μM . A doxorubicina (0,5 μM) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50 μL da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 5 minutos com 100 μL de PI (50 $\mu\text{g/mL}$). Em seguida as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies).

Análise dos dados

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

3.2.10. Avaliação do ciclo celular e fragmentação de DNA.

Esse método consiste na capacidade do iodeto de propídeo se ligar ao DNA das células, cuja membrana plasmática foi primeiramente lisada por um detergente

para permitir a entrada do corante no núcleo. O ciclo celular é constituído pelas seguintes fases: G_1 , S, G_2 e M. Durante o período de crescimento celular (fase G_1) uma célula diplóide apresenta um conteúdo $2n$ (n – conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomos) em DNA nuclear, i.e., possui duas cópias de cada gene. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear ($2 \rightarrow 4n$) e na fase seguinte (fase G_2) ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo em DNA nuclear é mantido no nível $4n$. Em seguida ocorre a mitose (fase M, $4n$) durante a qual a célula se divide, formando-se duas células filhas, cada uma com um conteúdo $2n$ em DNA. As células que não se encontram em divisão celular (G_0) apresentam um conteúdo $2n$ em DNA. Assim, as diferentes fases do ciclo celular podem ser determinadas a partir do conteúdo de DNA que elas apresentam (Fischer *et al.*, 2004 & Foster, 2008).

Quando as células se apresentam com a cromatina condensada e/ou DNA fragmentado (sub- G_1), a quantidade de PI incorporada é menor, e, portanto emitem uma fluorescência mais baixa.

Procedimento Experimental

Células HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 0,5; 3; 6 e 24 horas com a cordiaquinona J nas concentrações de 1,5 e 3,0 μM . A doxorubicina (0,5 μM) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50 μL da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 30 minutos com 100 μL de uma solução de lise contendo PI (50 $\mu\text{g/mL}$), Triton X-100 (0,1%) e citrato de sódio (0,1%). Em seguida as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies), onde foram obtidas histogramas representando a quantidade de células em cada fase do ciclo celular (G_1 , S e G_2/M) e a quantidade de células com DNA fragmentado.

Análise dos dados

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes

realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados serão comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.2.11. Determinação do Potencial Transmembrânico de Mitocôndria

A mitocôndria está envolvida em diversas vias apoptóticas intrínsecas. O citocromo c liberado da membrana externa da mitocôndria irá contribuir para desdobramento de rotas apoptóticas e o espaço liberado funcionará como poro. Através destes poros formar-se-á um efluxo de íons H^+ , induzindo uma alteração de seu potencial transmembrânico. A rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, é seqüestrado para dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina ligada às cargas positivas internas enquanto que as mitocôndrias das células apoptóticas terão menos afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência (Pithon-Curi *et al.*, 2003).

Procedimento Experimental

Células HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 0,5; 3; 6 e 24 horas com a cordiaquinona J nas concentrações de 1,5 e 3,0 μM . A doxorubicina (0,5 μM) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50 μL da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 15 minutos com 200 μL de uma solução de rodamina 123 (1 $\mu g/mL$ em PBS), na ausência de luz e a 37 °C. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em PBS e reincubado por mais 30 minutos e analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies).

Análise dos dados

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas

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

3.2.12. Determinação da externalização da fosfatidilserina (PS)

Um dos principais processos que ocorrem na apoptose é a perda da assimetria da membrana fosfolipídica com a translocação da fosfatidilserina do membrana interna da bicamada lipídica da superfície celular. A externalização da PS ainda continua como um processo não totalmente conhecido, mas se sabe-se que a externalização da fosfatidilserina funciona como um sinal da célula para que os macrófagos as fagocitem, antes da perda da integridade da membrana celular.

Procedimento Experimental

Células HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 3 horas com a cordiaquinona J nas concentrações de 1,5 e 3,0 μM . A doxorubicina (0,5 μM) foi usada como controle positivo. A externalização da fosfatidilserina foi analisada por citometria de fluxo após coloração da fosfatidilserina com a anexina V (Vermes *et al.*, 1995). Foi utilizado o kit Guava Nexin para determinar apoptose inicial e tardia. Células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e resuspendidas em 135 μL de PBS com 5 μL de 7-amino-actinomicina (7AAD) e 10 μL de anexina V conjugada com ficoeritrina (PE). As células foram gentilmente agitadas e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente (20–25°C) no escuro. Posteriormente, as células foram analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte/Guava Technologies). Anexina V é uma proteína ligada a um fosfolípido que tem alta afinidade por PS. 7AAD, é uma corante hidrofílico impermeável em células intactas, e é utilizado como um indicador da integridade da membrana celular. A fluorescência da anexina V conjugada com a ficoeritrina foi mensurada por fluorescência amarela-583nm e o 7AAD na fluorescência vermelha a 680nm. A percentagem de células viáveis e de células apoptóticas inicial e tardia foi calculada.

Análise dos dados

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

3.2.13. Determinação da ativação de caspases efetoras 3 e 7

As caspases pertencem a família de proteases cisteínas. A ativação das caspases 3 e 7 possui papel fundamental no mecanismo de apoptose, sendo responsável pela clivagem de vários componentes celulares relacionados ao reparo e ao controle do DNA. Assim, a quantificação dos níveis de caspase efetoras como a 3 e a 7 permite avaliar os mecanismos de indução apoptótica (Mehmet, 2002).

Procedimento Experimental

A detecção das caspases 3 e 7 foi analisada por citometria de fluxo utilizando o Kit FAM de caspases 3 e 7 após 3 horas de incubação. As células ($0,3 \times 10^6$) foram incubadas com o Inibidor de caspases com marcador fluorescente (FLICA™) e mantida por uma 1 hora a 37°C em uma incubadora de CO₂. Após a incubação, 80 μ L de tampão de lavagem foram adicionados e então, as células centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. O pellet resultante foi resuspendido em 200 μ L de tampão de lavagem e centrifugado novamente. Em seguida as células foram resuspendidas em uma solução contendo iodeto de propídeo e tampão de lavagem e analisadas imediatamente utilizando citometria de fluxo.

Análise dos dados

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

3.2.14. Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio intracelulares foram monitoradas utilizando o diacetato de 2'7'-diclorohidrofluoresceína (H₂-DCF-DA), que é convertido em um produto altamente fluorescente denominado de diclorofluoresceína (DCF) na presença de espécies reativas de oxigênio intracelulares (LeBel *et al.*, 1992).

Procedimento Experimental

No final do tratamento de 1 e 3 horas, as células foram incubadas a 20 µM de H₂-DCF-DA e mantidas a 37°C por 30 minutos no escuro. Após terminar o período total de incubação as células foram centrifugadas por duas vezes, lavadas e ressuspendidas em tampão PBS e analisadas imediatamente utilizando citometria de fluxo com comprimento de onda de excitação e emissão de 490 e 530 nm, respectivamente. β-lapachona (2µM) foi utilizada como controle positivo. E a N-acetil-L-cisteína (NAC), é um agente antioxidante, que foi utilizado como um inibidor de espécies reativas de oxigênio. O NAC (5 mM) foi pré-incubado com as células por 1 hora. Após o período de incubação com o NAC, as células foram incubadas por mais 1 hora com a cordiaquinona J para determinar se após o pré-tratamento com o NAC a cordiaquinona J ainda era capaz de gerar EROs.

Em outro experimento posterior, as células foram pré-incubadas com o NAC e após este período foram incubadas por mais 3 horas com a cordiaquinona J, para determinar se após o pré-tratamento com o NAC as células ainda apresentavam características necróticas e apoptóticas. Estas características foram avaliadas por citometria de fluxo e por coloração de May-Grunwald-Giemsa.

Análise dos dados

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

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Citotoxicidade da cordiaquinona J

As análises realizadas pelo teste do MTT mostraram que a cordiaquinona J exibiu atividade citotóxica contra todas as linhagens testadas, com CI_{50} variando de 2,7 a 6,6 μM em HL-60 e SF-295, respectivamente, após 72 horas de incubação (**Tabela 3**). Para as células normais de sangue periférico (CMSP) o valor de CI_{50} apresentado pela cordiaquinona J foi de 10,4 μM . A doxorrubicina, utilizada como controle positivo, apresentou valor de CI_{50} de 1,7 μM para as células normais CMSP e nas células tumorais teve valor de CI_{50} variando de 0,02 a 0,8 μM em HCT-8 e MDA-MB-435, respectivamente (**Tabela 3**). A ausência de atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos ($CE_{50} > 500 \mu\text{M}$, dados não mostrados) sugere que a citotoxicidade da cordiaquinona J não está relacionada ao dano inespecífico da membrana.

As células HL-60 foram especialmente sensíveis aos efeitos antiproliferativos da cordiaquinona J, e a partir de então, todos os estudos foram realizados com esta linhagem celular, utilizando doses correspondentes aos valores da CI_{50} (3,0 μM) e a metade do valor da CI_{50} (1,5 μM) obtidos pela cordiaquinona J em células HL-60.

Tabela 3. Atividade citotóxica *in vitro* da cordiaquinona J isolada da *Cordia leucocephala* Moric em linhagens de células tumorais.

Linhagem	Origem	Cordiaquinona J CI ₅₀ (µM)	Doxorrubicina CI ₅₀ (µM)
HL-60	Leucemia	2,7 2,1 - 3,5	0,03 0,02 - 0,05
HCT-8	Cólon	4,9 3,6 - 6,7	0,02 0,02 - 0,03
SF-295	S.N.C.	6,6 5,7 - 7,5	0,4 0,3 - 0,6
MDA-MB-435	Melanoma	5,1 3,7 - 7,0	0,8 0,6 - 1,1
CMSP	Linfócitos	10,4 9,2 - 11,8	1,7 0,9 - 3,1

Os dados são apresentados em valores de CI₅₀ µM e o intervalo de confiança de 95% de dois experimentos independentes realizado em triplicata pelo método do MTT após 72 horas de incubação para as linhagens MDA-MB435 (melanoma), SF-295 (glioblastoma), HL-60 (leucemia) e HCT-8 (cólon).

4.2. Estudo dos efeitos da cordiaquinona J em células leucêmicas: proliferação e morfologia

Com o objetivo de caracterizar os efeitos antiproliferativos induzidos pela cordiaquinona J em linhagem leucêmica HL-60, foram avaliados a viabilidade celular, a incorporação do BrdU e a morfologia celular após 24 horas de tratamento com a cordiaquinona J.

O teste do azul de tripan foi realizado antes de cada experimento acima citado para determinar a viabilidade celular. Em todas as concentrações testadas, a cordiaquinona J reduziu a viabilidade celular, dados que corroboram com as análises do MTT ($p < 0,05$; **Figura 10A**).

A fim de avaliar a inibição da proliferação celular, a inibição da síntese de DNA foi determinada pela redução da incorporação do BrdU nas células HL-60. A cordiaquinona J inibiu 66,04% e 87,11% da incorporação do BrdU nas concentrações de 1,5 µM e 3,0 µM, respectivamente ($p < 0,05$; **Figura 10B**). Já a doxorrubicina que foi utilizada como controle positivo inibiu a incorporação do BrdU em 66,19% na dose de 0,5 µM.

As mudanças morfológicas foram observadas utilizando a coloração diferencial LA/BE por microscopia de fluorescência e a percentagem de células viáveis,

apoptóticas e necróticas foram calculadas. Mais de 90% das células do grupo controle (não tratado) se apresentaram viáveis, com coloração verde uniforme e morfologia normal. Após o tratamento com a cordiaquinona J um aumento no número de células apoptóticas foi observado ($p < 0,05$; **Figura 10C**). As células tratadas com doxorubicina também apresentaram características apoptóticas semelhantes. Após o tratamento com a cordiaquinona J na menor concentração (1,5 μM), 22,5 % das células apresentavam-se em apoptose, no entanto, não houve aumento significativo de células necróticas. Já na concentração de 3,0 μM , 29,67 % apresentavam características apoptóticas e 7,6 % estavam em necrose.

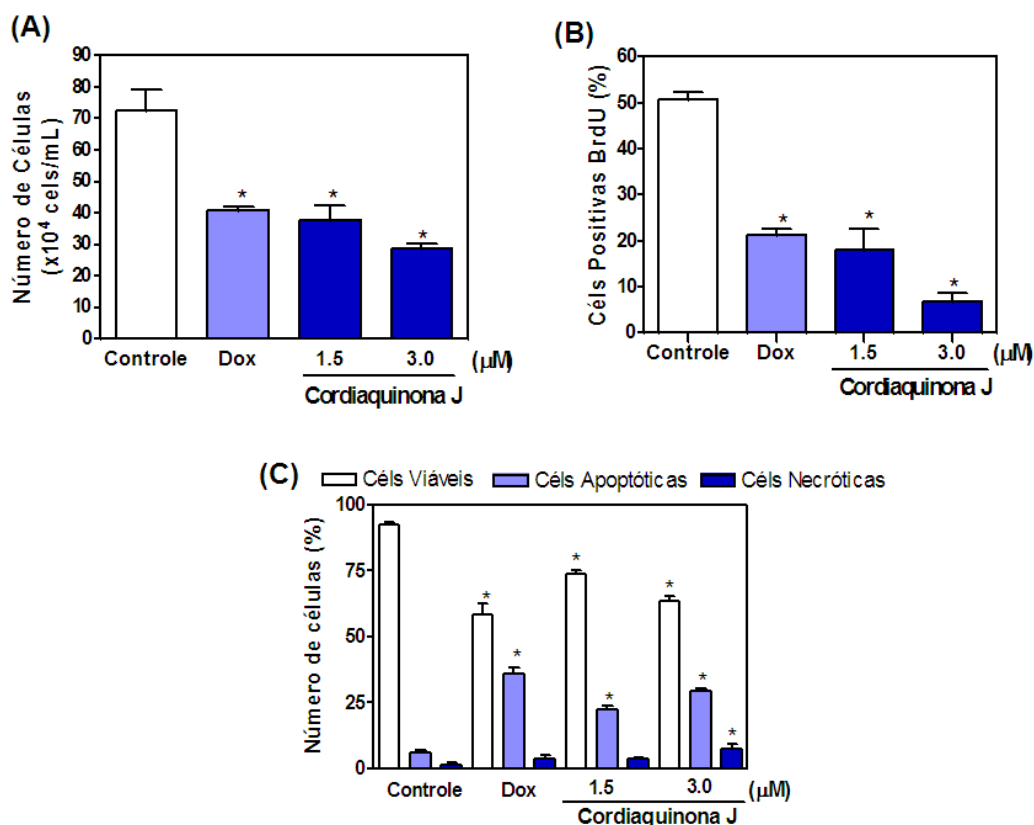


Figura 10. Efeitos da cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) sobre a viabilidade celular determinado por coloração de azul de tripan (A); sobre a incorporação do BrdU (B) e sobre a viabilidade celular determinada por microscopia de fluorescência LA/BE (C) em Celulas HL-60. Em todos os experimentos o controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras testadas. As células foram tratadas por 24 horas de incubação. Doxorubicina, Dox (0.5 μM) foi utilizada como controle positivo. * $p < 0.05$ comparado como controle por ANOVA seguido pelo teste de Dunnet. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) obtidos de dois experimentos independentes feitos em duplicata ($n=4$).

Mudanças morfológicas também foram avaliadas utilizando a coloração por May-Grunwald-Giemsa. Na presença da cordiaquinona J, em ambas as doses testadas, após 3 horas de incubação, foi observado a presença de numerosas células com o DNA fragmentado e condensado, além da formação de corpos apoptóticos e blebs, características comuns no processo da apoptose, no entanto também foi observado que diversas células estavam em processo de necrose, pois apresentavam-se eosinofílicas e com perda da integridade da membrana celular. Após 6 horas de incubação com a substância foi observado características morfológicas bastante semelhantes ao período de 3 horas de incubação, só que de uma maneira mais intensa tanto no padrão morfológico da apoptose quanto da necrose.

No entanto, este padrão morfológico, como citado acima foi mais evidente no tratamento com a cordiaquinona J somente após 3 e 6 horas de incubação (**Figura 11**). Estes achados se tornaram mais intensos quando as células foram tratadas com a dose de 3,0 μM (**Figura 11**). Estas mudanças morfológicas também foram observadas quando as células foram tratadas com doxorubicina por 24 horas na concentração de 0,5 μM (**Figura 11**). Após 24 horas de incubação com a substância, a população de células necróticas foi bem menos evidente, a grande maioria das células apresentavam o seu volume bem reduzido quando comparado ao controle.

Como mostrado na **figura 11**, os resultados sugerem que a cordiaquinona J induz mudanças morfológicas celulares rapidamente (com apenas 3 horas de incubação) (**Figure 11**), mas não tem efeitos após meia hora de tratamento. É interessante perceber, que após 3 e 6 horas de tratamento, surge uma população de células necróticas anteriormente não observadas após 24 horas de incubação (**Figura 11**), sugerindo um rápido mecanismo de indução de necrose.

A partir de então os experimentos foram conduzidos com o objetivo de determinar a partir de que momento começa os efeitos da cordiaquinona J sobre células leucêmicas tumorais e caracterizar sua dependência de tempo.

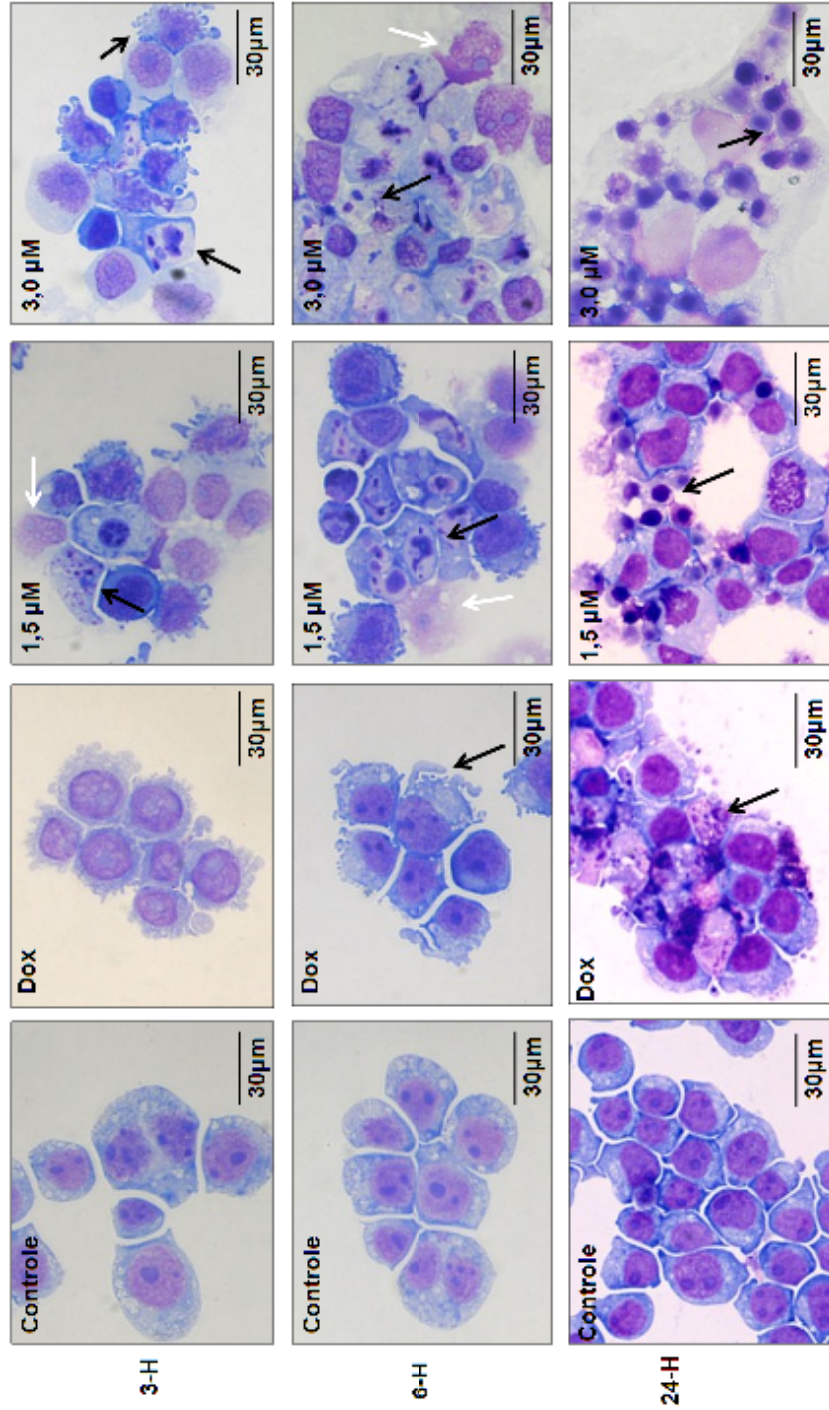


Figura 11. Análises microscópicas por coloração de May-Grunwald-Giemsa em células HL-60 após 3, 6 e 24 horas de incubação como a cordiaquinona J nas concentrações de 1,5 e 3,0 μM . Em todos os experimentos o controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras testadas. Doxorubicina, Dox (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo. As células foram analisadas por microscopia de luz (x 400). As setas pretas mostram células apoptóticas, com tamanho reduzido, fragmentação nuclear e corpos apoptóticos e as setas brancas mostram células eosinofílicas e com membrana celular rompida.

4.3. Estudo dos mecanismos envolvidos nos efeitos da cordiaquinona J em células leucêmicas: análise temporal

A densidade celular e a integridade de membrana foram determinadas pela exclusão do iodeto de propídeo (**Figura 12**). Como já evidenciado pelos testes do MTT, BrdU e o azul de tripan, a cordiaquinona J também reduziu o número de células em ambas as concentrações testadas.

Estes efeitos podem ser observados com apenas de 3 horas de incubação (**Figura 12A**). As análises da integridade de membrana foram compatíveis com o observado com as análises morfológicas, pois após 3 horas de tratamento pode ser observada uma diminuição da integridade da membrana a partir da concentração de 1,5 M evoluindo com o aumento da concentração. Após 6 horas de incubação com a cordiaquinona J (3,0 μ M), observou-se que em torno de 40% das células tinham sua membrana rompida, enquanto que com 3 horas de incubação, na mesma dose, apenas 16,5% das células não apresentava membrana íntegra, sugerindo a indução de necrose em uma população de células de maneira tempo dependente (**Figura 12B e 12C**). Após 24 horas de tratamento, a população de células necróticas ainda pode ser observada, no entanto de uma maneira reduzida quando comparado com 6 horas de tratamento.

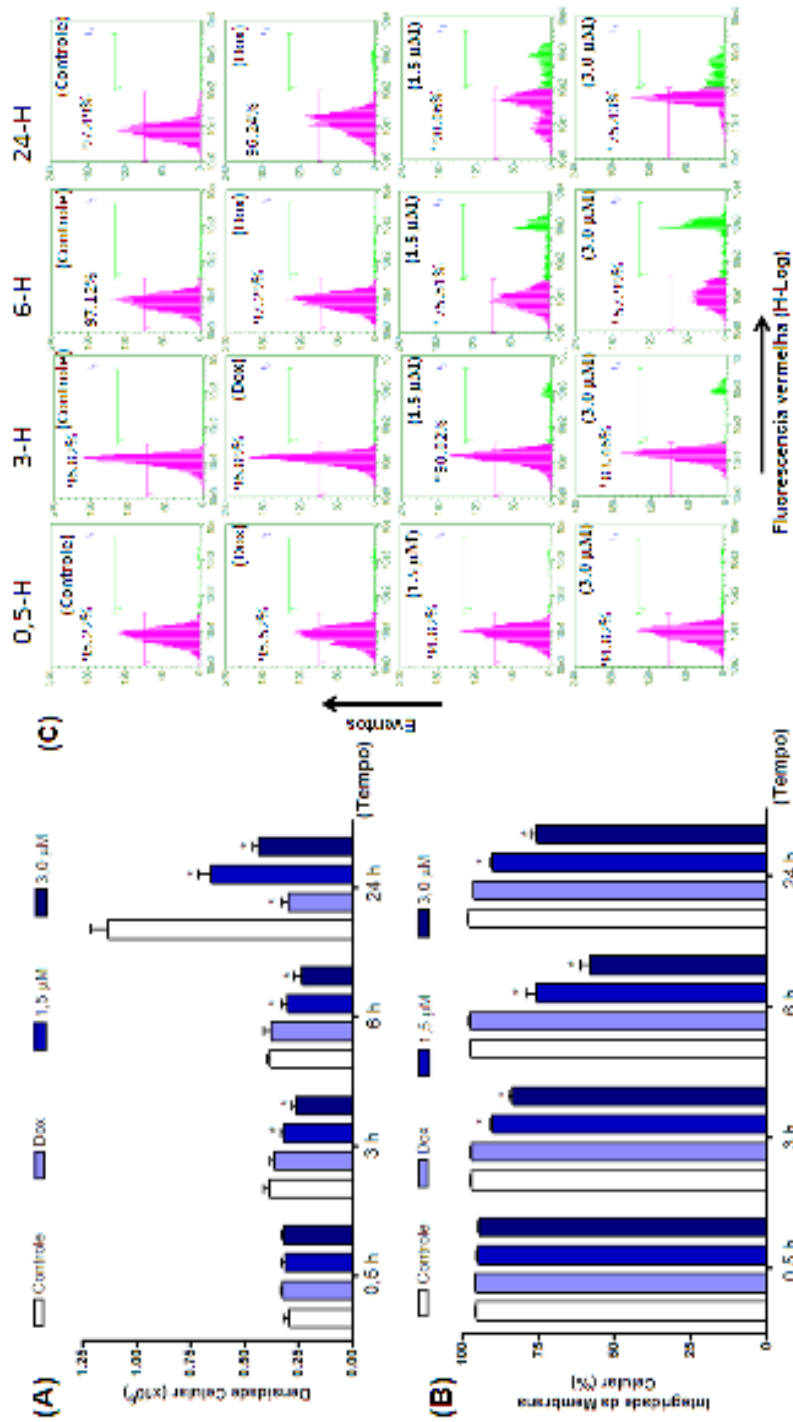


Figura 12. Efeitos da cordaquinona J (1,5 e 3,0 μM) em células HL-60 sobre a densidade celular **(A)** e a integridade de membrana **(B e C)** determinada por citometria de fluxo utilizando iodoeto de propídeo após 0,5, 3, 6 e 24 horas de incubação. As células HL-60 foram não tratadas **(controle)**, tratadas com cordaquinona J (1,5 e 3 μM) e com doxorubicina, Dox 0,5 μM . Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro E.P.M. obtidos de três experimentos independentes feitos em triplicata. * $p < 0,05$, comparado como controle por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Cinco mil eventos foram adquiridos em cada experimento.

Além disso, a cordiaquinona J também causou compactação celular em ambas concentrações testadas. Essa compactação pôde ser observada pela diminuição da dispersão da luz frontal “forward light scatter” (FSC), condensação nuclear e pela diminuição da dispersão da luz lateral “side scatter” (SSC), características estas compatíveis com células em apoptose (Figura 13).

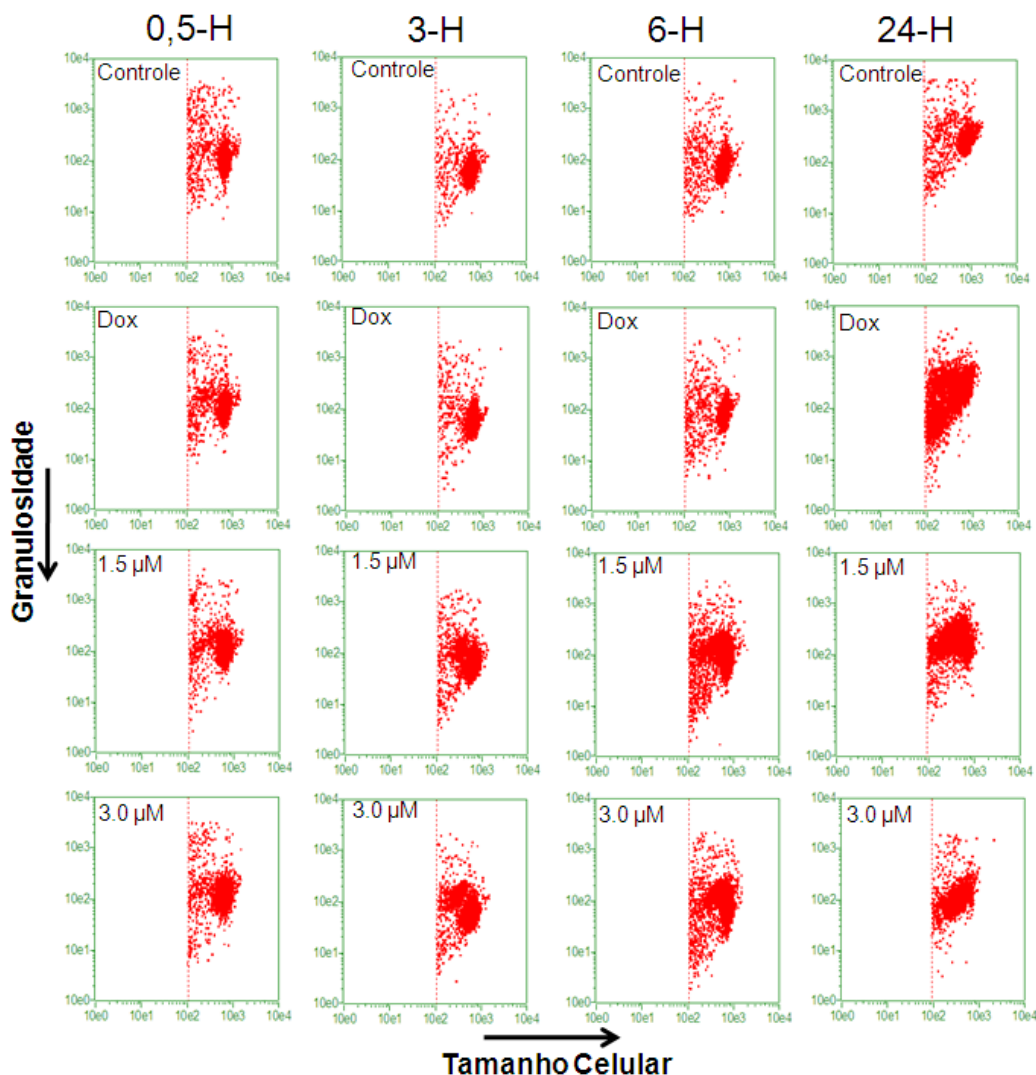


Figura 13. Efeitos da cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) em células HL-60 sobre a morfologia celular determinada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo após 0,5, 3, 6 e 24 horas de incubação. As células HL-60 foram não tratadas (**controle**), tratadas com cordiaquinona J (1,5 e 3 μM) e com doxorrubicina, Dox 0,5 μM . Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro E.P.M. obtidos de três experimentos independentes feitos em triplicata. * $p < 0.05$, comparado como controle por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Cinco mil eventos foram adquiridos em cada experimento.

Para determinar se a cordiaquinona J induziu citotoxicidade envolvendo alterações na progressão do ciclo celular, foram realizadas as análises de distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo. Entretanto o composto testado não apresentou efeitos sobre fases específicas do ciclo celular em nenhum tempo ou concentração testada (**Tabela 4**). No entanto, assim como esperado, a cordiaquinona J em ambas as concentrações testadas aumentou a fragmentação do DNA (sub-diploide) em mais de 30 % quando comparado ao grupo controle após 3 horas de incubação. O grupo controle após 3 e 6 horas de tratamento apresentou fragmentação do DNA em torno de $15,4 \pm 1,7$ e $13,7 \pm 1,6$ % respectivamente, enquanto que a cordiaquinona J na maior concentração testada apresentou $42 \pm 2,9$ % de fragmentação após 3 horas de incubação e $57,1 \pm 3,5$ % após 6 horas (**Figura 14**). Os maiores níveis de fragmentação foram observados após o tratamento com a cordiaquinona J por 24 horas de incubação, apresentando valores $77,0 \pm 3,9$ % em $1.5 \mu\text{M}$ e $89,3 \pm 1,9$ % em $3,0 \mu\text{M}$ (**Figura 14**).

Tabela 4. Efeitos da cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) sobre as fases do ciclo celular em células HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando iodoeto de propídeo, triton X-100 e citrato após 0,5, 3, 6, e 24 horas de incubação. Em todos os experimentos o controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras testadas. Doxorubicina (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro E.P.M. obtidos de três experimentos independentes feitos em triplicata. * $p < 0,05$, comparado como controle por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Cinco mil eventos foram adquiridos em cada experimento. Dados analisados com ModFit LT 3.1 software (Verity software house).

Período de Incubação	Substâncias	Concentração (μM)	Fases do Ciclo Celular		
			G_0G_1	S	G_2M
0,5 hora	Controle	-	21,2 \pm 0,9	72,5 \pm 0,9	6,3 \pm 0,8
	Doxorrubicina	0,5	20,0 \pm 0,4	73,9 \pm 0,5	6,0 \pm 0,7
	Cordiaquinona J	1,5	21,5 \pm 0,7	71,8 \pm 0,9	6,7 \pm 1,0
		3,0	22,7 \pm 0,9	71,4 \pm 0,6	5,9 \pm 0,6
3 horas	Controle	-	16,6 \pm 0,8	79,4 \pm 1,6	3,9 \pm 0,9
	Doxorrubicina	0,5	16,2 \pm 1,4	79,4 \pm 1,8	4,4 \pm 0,9
	Cordiaquinona J	1,5	15,8 \pm 0,7	80,3 \pm 1,3	4,0 \pm 0,7
		3,0	18,8 \pm 1,6	77,9 \pm 1,9	3,1 \pm 0,6
6 horas	Controle	-	15,5 \pm 1,3	76,2 \pm 2,8	6,6 \pm 1,0
	Doxorrubicina	0,5	13,4 \pm 0,8	79,9 \pm 1,9	8,3 \pm 1,4
	Cordiaquinona J	1,5	16,6 \pm 1,1	75,6 \pm 1,7	7,5 \pm 0,8
		3,0	19,2 \pm 1,2	77,0 \pm 1,6	4,1 \pm 0,2
24 horas	Controle	-	27,2 \pm 3,5	63,3 \pm 4,4	9,4 \pm 1,0
	Doxorrubicina	0,5	23,8 \pm 4,5	72,4 \pm 4,2	3,7 \pm 0,9*
	Cordiaquinona J	1,5	26,0 \pm 2,7	63,5 \pm 3,5	10,5 \pm 1,5
		3,0	27,5 \pm 1,7	64,8 \pm 3,2	7,7 \pm 1,9

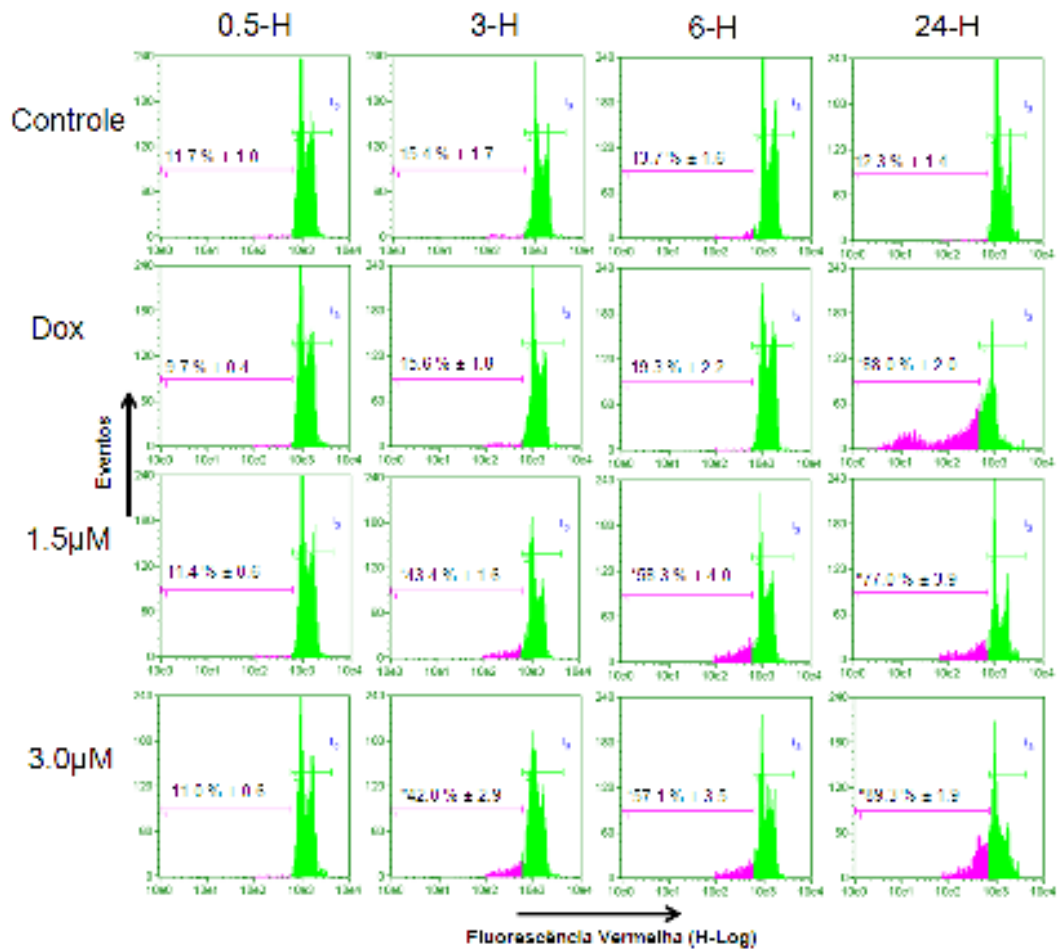


Figura 14. Efeitos da cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) sobre a fragmentação internucleossomal do DNA em células HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, triton X-100 e citrato após 0,5, 3, 6, e 24 horas de incubação. Em todos os experimentos o controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras testadas. Doxorubicina, Dox (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro E.P.M. obtidos de três experimentos independentes feitos em triplicata. * $p < 0,05$, comparado como controle por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Cinco mil eventos foram adquiridos em cada experimento. Dados analisados com ModFit LT 3.1 software (Verity software house).

Posteriormente, o potencial transmembrânico mitocondrial foi também avaliado em células HL-60. Alterações significantes foram observadas neste parâmetro. Pôde-se observar que $34,2 \pm 4,7$ % das células após 24 horas de tratamento com a cordiaquinona J estavam com a membrana mitocondrial despolarizada, sugerindo morte relacionada a apoptose por via intrínscita. No entanto esta população de células que apresentaram o potencial

transmembrânico mitocondrial alterado, também pôde ser observado precocemente, com apenas 30 minutos de incubação, onde as células tratadas com cordiaquinona J apresentaram $17,8 \pm 2,2$ %, de despolarização mitocondrial, enquanto que no controle foi de apenas $8,5 \pm 1,7$ % (Figura 15). Este efeito mitocondrial foi intensificado com o aumento do período de incubação com a cordiaquinona J (3 e 6 horas). No entanto o controle positivo (doxorubicina) foi apresentar efeitos mitocondriais com apenas 24 horas de incubação.

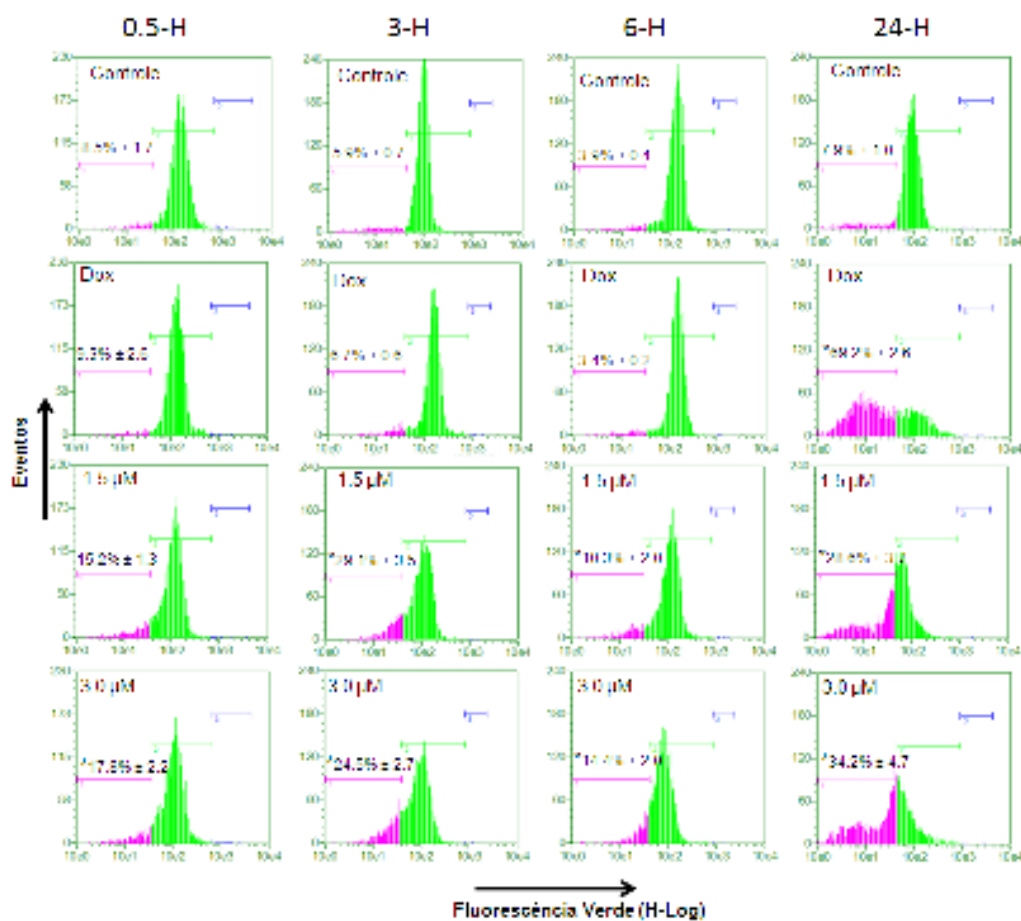


Figura 15. Efeitos da cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) sobre despolarização da membrana mitocondrial em células HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando rodamina 123, após 0,5, 3, 6, e 24 horas de incubação. Em todos os experimentos o controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras testadas. Doxorubicina, Dox (0.5 μM) foi utilizada como controle positivo. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro E.P.M. obtidos de três experimentos independentes feitos em triplicata. * $p < 0.05$, comparado como controle por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Cinco mil eventos foram adquiridos em cada experimento.

Na tentativa de confirmar se as células tratadas com a cordiaquinona J realmente induzem a morte por apoptose, foram avaliados os seguintes parâmetros, externalização da fosfatidilserina e a ativação da caspase 3 e 7 por citometria de fluxo, após 3 horas de incubação. Em ambas as concentrações testadas a cordiaquinona J promoveu a exposição da fosfatidilserina, indicando a presença de $66,38 \pm 2,3 \%$ e $58,8 \pm 1,5 \%$ de células apoptóticas nas concentrações de 1,5 e 3,0 μM respectivamente, além de determinar a presença de células em apoptose tardia e/ou necrose em $34 \pm 0,9 \%$ das células tratadas com cordiaquinona J na maior concentração. (**Figura 16**).

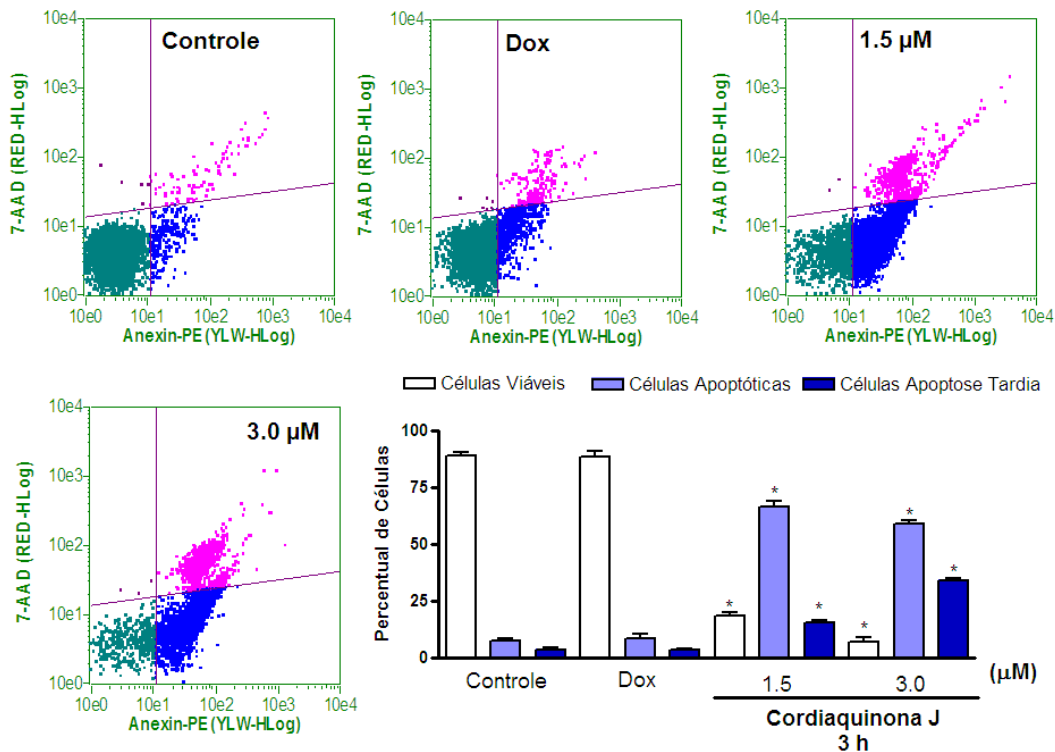


Figura 16. Efeitos da cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) sobre externalização da fosfatidilserina em células HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando anexina V-PE e 7AAD, após 3 horas de incubação. Em todos os experimentos o controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras testadas. Doxorubicina, Dox (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro E.P.M. obtidos de dois experimentos independentes feitos em triplicata. * $p < 0.05$, comparado como controle por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Cinco mil eventos foram adquiridos em cada experimento.

Após essa confirmação, através do teste da externalização da fosfatidilserina, de que a cordiaquinona J induz apoptose, foi avaliado o envolvimento das caspases efetoras (3 e 7) no processo de indução de apoptose por esse composto. Os dados obtidos mostraram que com apenas 3 horas de incubação, a cordiaquinona J promoveu a ativação de caspase. Na maior concentração testada (3,0 μM) observou-se que 25% das células estavam em apoptose inicial dependente de caspase, enquanto 24% das células estavam em necrose (Figura 17).

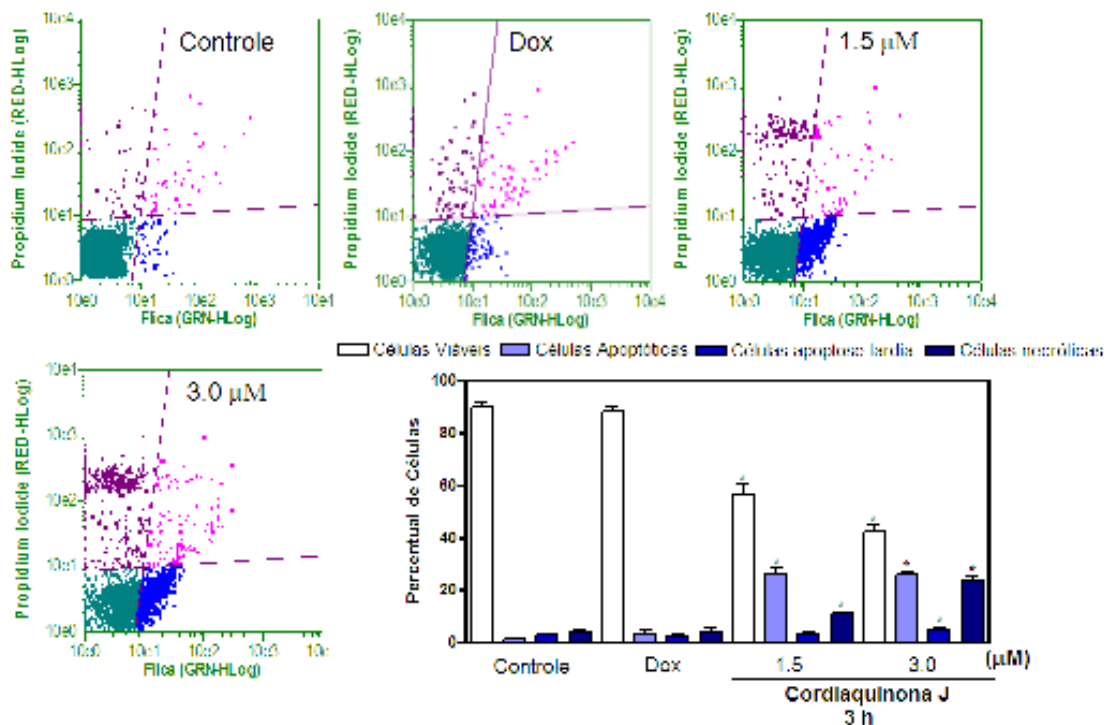


Figura 17. Efeitos da cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) sobre a atividade das caspase 3 e 7 em células HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo e FLICA, após 3 horas de incubação. Em todos os experimentos o controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras testadas. Doxorubicina, Dox (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro E.P.M. obtidos de dois experimentos independentes feitos em triplicata. * $p < 0,05$, comparado como controle por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Cinco mil eventos foram adquiridos em cada experimento.

Como pode ser observado, a maioria dos efeitos da cordiaquinona J surgem com apenas 3 horas de incubação, no entanto a alteração do potencial mitocondrial pode ser visto ainda mais cedo, com apenas 30 minutos de incubação. Baseado nesses achados, as células foram submetidas a uma pré-incubação de 30 minutos com cordiaquinona J e após esse período as células

foram lavadas duas vezes por centrifugação em meio livre de droga, e então as células foram reincubadas por mais 2,5 horas, completando um período de incubação final de 3 horas. Os resultados adquiridos por citometria de fluxo de densidade celular, integridade de membrana, fragmentação do DNA e despolarização mitocondrial foram semelhantes aos resultados obtidos com a exposição das células à cordiaquinona J continuamente por 3 horas. Com isto, podemos sugerir que a cordiaquinona J necessita de um curto tempo de exposição com as células tumorais, para desencadear o processo de morte destas células (**Figura 18**).

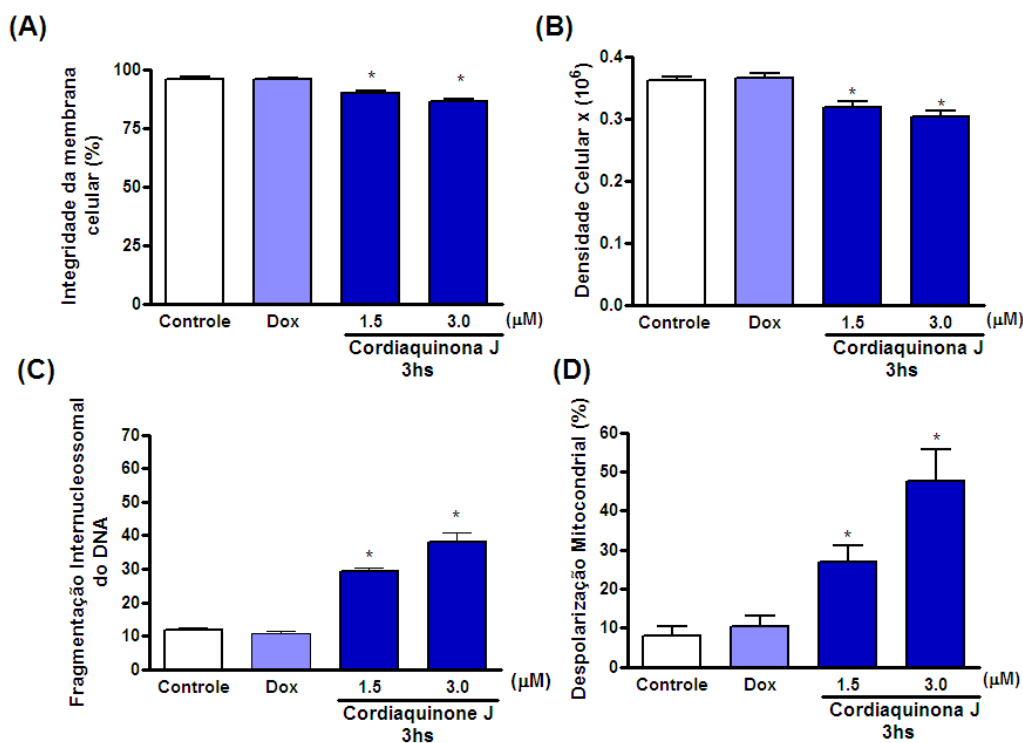


Figura 18. Células HL-60 foram incubadas com cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) e mantidas no escuro a 37°C por 30 minutos. Posteriormente as células foram centrifugadas, lavadas e resuspendidas em meio RPMI e incubadas novamente por mais 2,5 horas e analisadas utilizando citometria de fluxo. Os efeitos da cordiaquinona J foram avaliados sobre **(A)** integridade de membrana **(B)** densidade celular utilizando iodeto de propídeo; **(C)** despolarização da membrana mitocondrial, utilizando rodamina 123 e **(D)** fragmentação internucleossomal do DNA, utilizando iodeto de propídeo, Triton X-100 e citrato. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras testadas. Doxorrubicina, Dox (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo. Os dados estão apresentados como os valores da média ± erro E.P.M. obtidos de três experimentos independentes feitos em triplicata. * p < 0,05, comparado como controle por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Cinco mil eventos foram adquiridos em cada experimento.

4.4. Avaliação da participação da indução da formação de EROs no efeito da cordiaquinona J em células leucêmicas

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) é considerada como um dos principais mecanismos de citotoxicidade das quinonas. Por esse motivo, o estado redox das células HL-60 tratadas com cordiaquinona J foi monitorado utilizando um corante fluorescente sensível a oxidação (H₂-DCF-DA) após 1 e 3 horas de incubação. Um aumento na fluorescência foi detectado em células tratadas com a substância de uma maneira dose dependente, após 1 hora de tratamento. Quando as células foram tratadas por 3 horas não houve um aumento significativo na fluorescência (**Figura 19A**).

Finalmente, foi investigado se o estresse oxidativo é essencial para os efeitos causados pela cordiaquinona J. Para explorar esta possibilidade as células HL-60 foram pré-tratadas com N-acetil-L-cisteína (NAC) na concentração de 5 mM. A incubação com o NAC foi de 1 hora antes do tratamento com a cordiaquinona J. Primeiramente foi avaliado a capacidade da cordiaquinona J gerar EROs em células de HL-60 após o pré-tratamento com NAC. Para isso, após o pré-tratamento com o antioxidante (NAC), as células foram reincubadas por mais uma hora na presença de cordiaquinona J nas concentrações de 1,5µM e 3,0µM e posteriormente analisadas por citometria de fluxo, como descrito anteriormente. Posteriormente, as células pré-tratadas com NAC foram reincubadas por mais 3 horas com cordiaquinona J, nas mesmas concentrações citadas acima, e avaliadas por citometria de fluxo para quantificação da integridade de membrana celular, da densidade celular, da fragmentação de DNA e da despolarização mitocondrial. As alterações morfológicas foram avaliadas por coloração diferencial com May-Grunwald-Giemsa (**Figura 19B**).

Após o tratamento com NAC pôde ser observado que a formação de EROs foi abolida totalmente (**Figura 19B**), bem como a perda da integridade da membrana celular (**Figura 20A**), a redução no número de células (**Figura 20B**) e a despolarização mitocondrial também não apresentaram nenhuma diferença quando comparadas ao controle (**Figura 20C**), no entanto a

fragmentação do DNA foi somente parcialmente inibida. Quando em presença somente da cordiaquinona J (1,5 μM), após 3 horas de incubação, foi observado que $43,4 \pm 1,58$ % das células apresentavam o seu DNA fragmentado, no entanto quando avaliado o efeito da cordiaquinona J sobre os mesmos parâmetros, mas com tratamento prévio com NAC na concentração de 5mM, observou-se que houve uma diminuição no percentual de células fragmentadas para $26,42 \pm 2,27$ %. No entanto, na maior concentração não foi observado diferença estatisticamente significativa em relação a fragmentação do DNA entre o grupo previamente tratado com NAC e o grupo não tratado com NAC (**Figura 20D**).

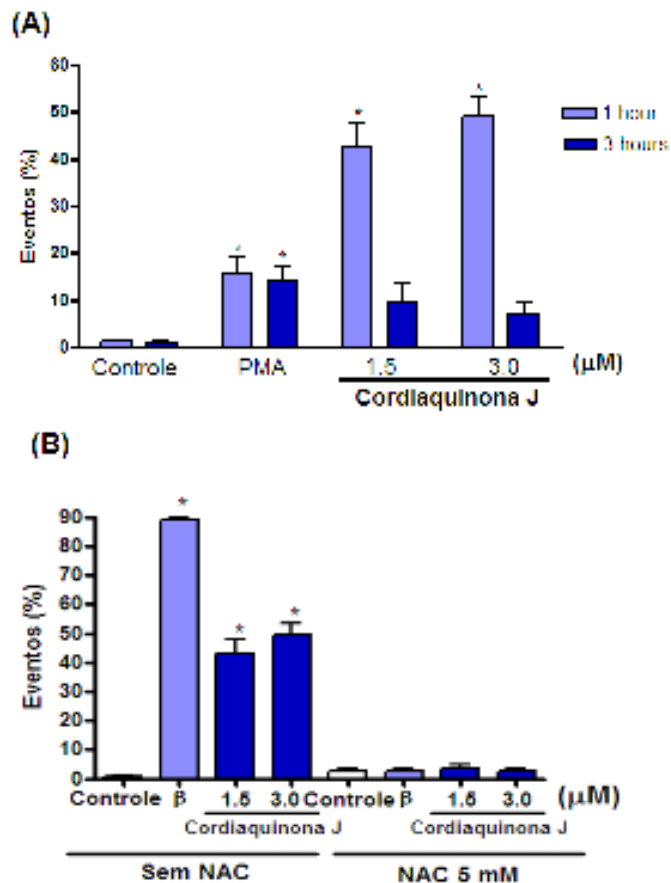


Figura 19. Efeitos da cordiaquinona J sobre a geração de EROs em células HL-60. **(A)** As células foram tratadas com cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) por 1 e 3 horas. PMA foi utilizado como controle positivo. **(B)** NAC (5mM) foi adicionado 1 hora antes do tratamento de 1 hora com a cordiaquinona J. β -lapachona (β) (2 μM) foi utilizada como controle positivo. As células foram coradas com $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ e cinco mil eventos foram adquiridos. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras testadas. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro E.P.M. obtidos de três experimentos independentes feitos em triplicata. * $p < 0,05$, comparado como controle por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

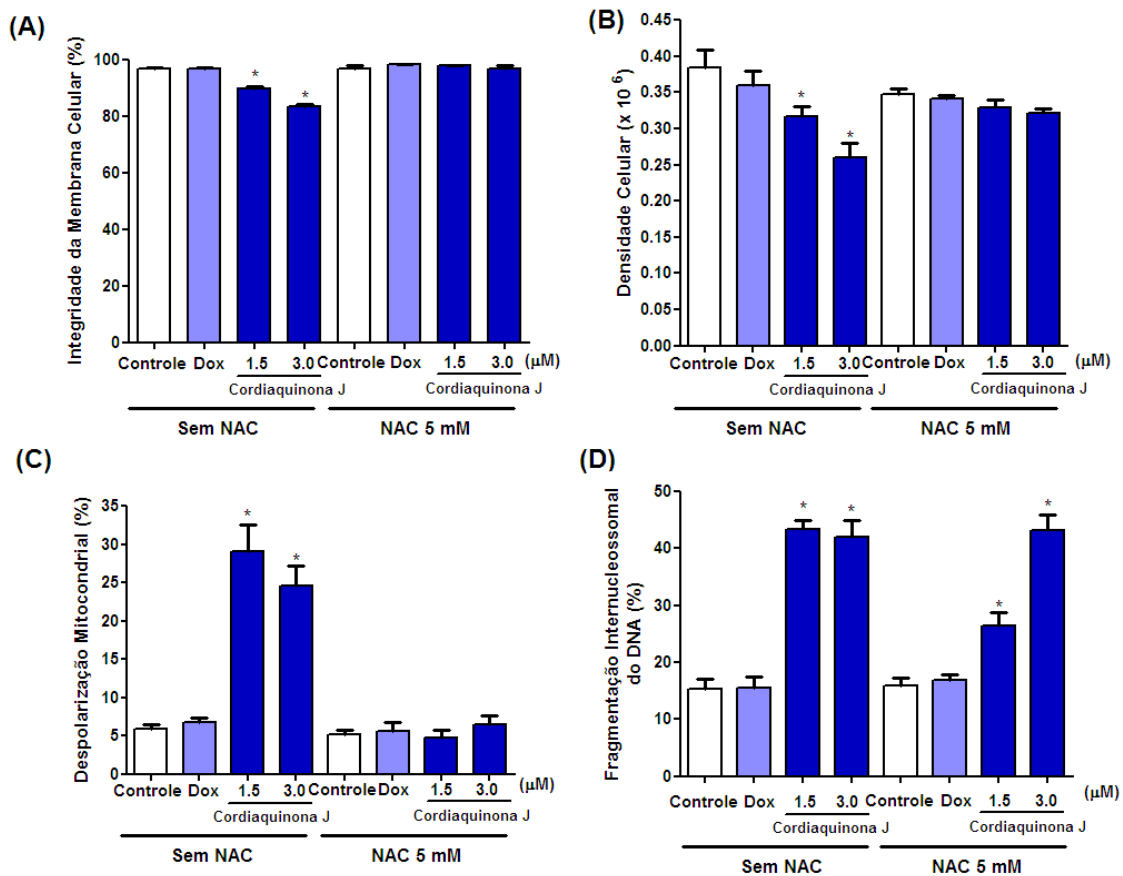


Figura 20. Efeitos da cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) sobre a geração de EROs em células HL-60. NAC (5mM) foi adicionado 1 hora antes do tratamento de 3 horas com a cordiaquinona J. As células foram coradas com $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ e cinco mil eventos foram adquiridos. Os efeitos da cordiaquinona J foram avaliados sobre **(A)** integridade de membrana **(B)** densidade celular utilizando iodeto de propídeo; **(C)** despolarização da membrana mitocondrial, utilizando rodamina 123 e **(D)** fragmentação internucleossomal do DNA, utilizando iodeto de propídeo, Triton X-100 e citrato. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras testadas. Doxorubicina, Dox (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro E.P.M. obtidos de três experimentos independentes feitos em triplicata. * $p < 0.05$, comparado como controle por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

A análise morfológica mostrou que a população de células necróticas induzidas pelo tratamento com a cordiaquinona J após 3 horas de exposição foi abolida com o pré-tratamento com o NAC, no entanto células com padrão apoptótico continuaram mesmo com o pré-tratamento. **(Figure 21)**.

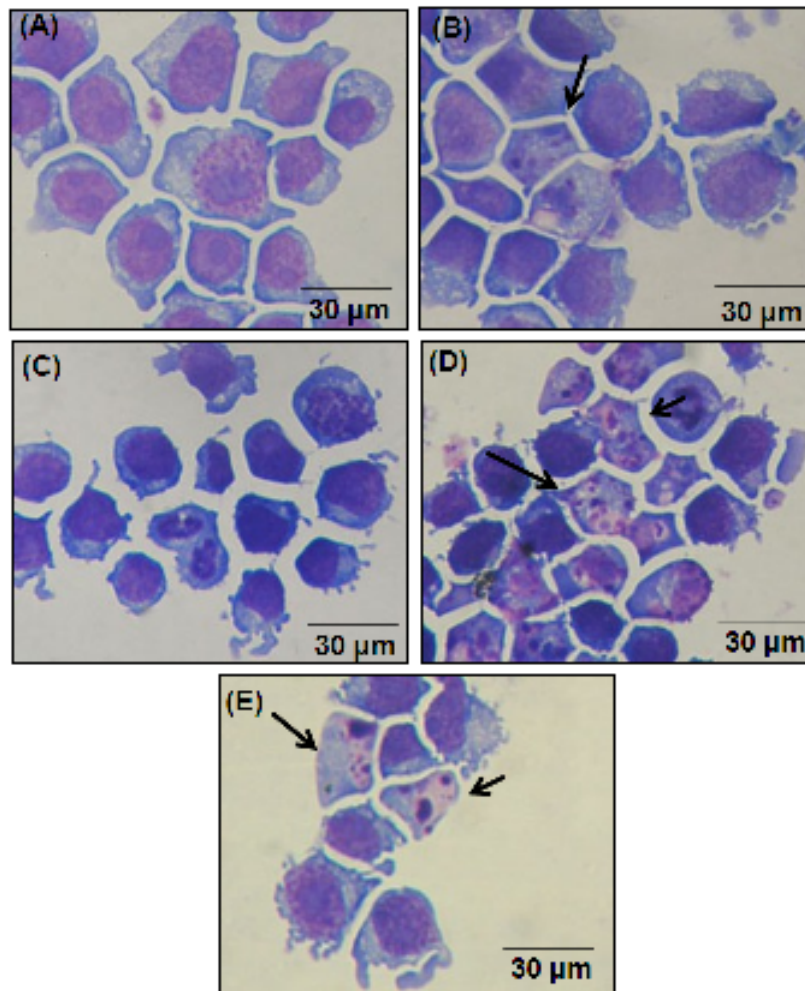


Figura 21. Análises microscópicas por coloração de May-Grunwald-Giemsa em células HL-60. NAC (5mM) foi adicionado 1 hora antes do tratamento de 3 horas com a cordiaquinona J. **(A)** Células do controle negativo (ausência de NAC); **(B)** células controle (presença de NAC); **(D)** cordiaquinona J 1,5 μM ; **(E)** cordiaquinona J 3,0 μM . Em todos os experimentos o controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras testadas. **(C)** β -lapachona (2 μM) foi utilizada como controle positivo. As células foram analisadas por microscopia de luz (x 400). As setas pretas mostram fragmentação nuclear.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Quinonas são compostos de origem natural, que também podem ser amplamente obtidos por síntese orgânica. Muitas quinonas apresentam-se ativas contra diversos tipos de doenças como: câncer e malária, além de possuir atividade bactericida e fungicida (Huang *et al.*, 2002). A atividade antitumoral das quinonas é observada nos três grupos quinônicos conhecidos como benzoquinona, naftoquinona e antraquinona (Inbaraj *et al.*, 1999), sendo que o núcleo quinona está presente em diversas drogas anticâncer tais como: antraciclina (daunorrubicina, doxorubicina), mitomicina e mitoxantrona, que são utilizadas clinicamente na terapia de tumores sólidos (Foye, 1995).

Aproximadamente 300 naftoquinonas, de diferentes estruturas, já foram isoladas de plantas, bactérias e fungos. Estes compostos de ocorrência natural vêm sendo bastante utilizados na medicina popular. Recentes estudos mostraram o valor terapêutico de naftoquinonas tanto de origem natural quanto sintéticas, principalmente como agentes antiparasitários e anticâncer (Munday *et al.*, 1995; Tandon *et al.*, 2004). Particularmente, em relação às naftoquinonas, destacam-se moléculas como o Lapachol e a β -lapachona que consistem em um grupo promissor de compostos com atividade citotóxica e antitumoral (Asche, 2005).

O lapachol (2-hidroxi-3-(3-metilbutenil)-1,4-naftoquinona) é considerado um dos principais representantes do grupo de quinonas das tabebuias (da Silva *et al.*, 2003). Foi primeiramente isolado por Paterno a partir da *Tabebuia avellanedae* em 1882. *T. avellanedae* é uma árvore da família da Bignoniaceae, comumente conhecida como “pau d’arco” no Brasil. Sua casca é usada como analgésico, antiinflamatório, anti-neoplásico e diurético pela população local em partes do nordeste do Brasil (Miranda *et al.*, 2001; Hussain *et al.*, 2007).

O principal mecanismo de ação descrito para o lapachol reside na sua capacidade de induzir estresse oxidativo através da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion-

radical superóxido ($O_2 \cdot^-$) e o radical hidroxila ($HO\cdot$). Estas espécies podem danificar alguns componentes celulares importantes, tanto de células normais como de células tumorais (da Silva *et al.*, 2003).

A eficácia antitumoral do lapachol foi testada em seres humanos, onde verificou-se uma redução das lesões e da dor após quatro administrações de 20-30 mg/kg/dia (Santana *et al.*, 1980). O Lapachol avançou nos estudos clínicos conduzidos pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos na década de 70, mas devido a severidade dos efeitos colaterais foi descartado (Newman & Cragg, 2005). Mais recentemente, a β -lapachona, estruturalmente relacionada ao lapachol, aparece como uma alternativa no tratamento do câncer. (Li *et al.*, 1999; Huang and Pardee, 1999). Este composto está em fase 1 de estudos clínicos nos Estados Unidos sob responsabilidade da ArQule (Newman & Cragg, 2005).

O estresse oxidativo é um processo comum desencadeado pelas quinonas, que induzem a formação deletéria endógena de espécies bioativas derivadas do oxigênio (Matés & Sánchez-Jiménez, 2000). Além do estresse oxidativo, as quinonas são conhecidas por intercalarem no DNA (Asche, 2005) e por inibir o complexo das topoisomerasas, o que pode provocar o desencadeamento da apoptose celular. A interferência das quinonas na apoptose constitui-se atualmente em uma linha de pesquisa interdisciplinar, cruzando fronteiras entre a química e as áreas médicas, existindo grande expectativa quanto à delineação de estratégias racionais visando o combate de neoplasias (da Silva *et al.*, 2003).

Neste trabalho, foram investigados os efeitos da cordiaquinona J, isolada da planta *Cordia leucocephala*, sobre a proliferação de células tumorais e normais (CMSP). Posteriormente o mecanismo de ação da cordiaquinona J foi avaliado utilizando células leucêmicas da linhagem HL-60.

A análise do MTT mostrou que a cordiaquinona J exibiu atividade citotóxica contra todas as linhagens de câncer testadas, no entanto as células normais CMSP também foram afetadas pela substância. Apesar da CI_{50} para

as células normais ter sido 3,85 vezes maior do que para as células tumorais (HL-60), esses valores ainda são considerados citotóxicos, levando-se em consideração que são células normais. Estes resultados implicam em uma baixa seletividade da cordiaquinona J para células tumorais.

Quando pensamos em produzir novos medicamentos para o tratamento do câncer é muito importante mensurar quais seriam os possíveis efeitos colaterais apresentados pela substância teste, por isso a necessidade de se avaliar se a substância testada mostra efeitos nocivos em células em divisão tais como: as células da pele, do trato gastrointestinal, plaquetas, glóbulos vermelhos (hemácias) e brancos (leucócitos) (Zuco *et al.*, 2002; Anazetti *et al.*, 2003). Adicionalmente, a ausência de atividade hemolítica em concentrações acima de 500 μM em eritrócitos de camundongo sugere que a citotoxicidade do composto não está relacionado com dano inespecífico de membrana.

Para confirmar os efeitos antiproliferativos da Cordiaquinona J observados no ensaio do MTT, outros testes antiproliferativos foram realizados utilizando células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24 horas de incubação. Os efeitos de diminuição da proliferação celular, observados pela cordiaquinona J, foram confirmados pelo teste de exclusão do azul de tripan, e pela inibição da síntese de DNA através da incorporação do BrdU.

O conteúdo de DNA e a incorporação de 5-BrdU podem ser medidos conjuntamente para determinar o índice de síntese de DNA através da porcentagem de células que incorporaram a 5-BrdU (Dolbeare *et al.*, 1983). O ciclo celular de células em proliferação é composto pelas fases G_1 , S, G_2 e M, enquanto a fase G_0 refere-se às células que estão quiescentes (Raza *et al.*, 1991). As células na fase S, de síntese, estão sintetizando novo material genético e, portanto, utilizando os nucleotídeos presentes no meio (Holm *et al.*, 1998). Estas células obrigatoriamente irão incorporar BrdU, análogo da timidina, em seu DNA que, por sua vez, pode ser detectado com o uso de anticorpos conjugados anti-BrdU e técnicas de imuno-histoquímica para sua marcação.

A incorporação de 5-BrdU foi inversamente proporcional a concentração, sendo que a de 1,5 μM (valor da $\text{CI}_{50}/2$) inibiu a proliferação celular em valores percentuais semelhantes ao da doxorubicina, em torno de 66%. A concentração de 3,0 μM promoveu 87,11% de inibição. Assim, os resultados obtidos corroboraram com os ensaios de citotoxicidade realizados por MTT e os testes de viabilidade por azul de tripan, confirmando a atividade inibitória da cordiaquinona J sobre a divisão celular.

As colorações por May-Grunwald-Giemsa e a coloração diferencial de laranja de acridina e brometo de etídio (LA/BE) permitem analisar as características morfológicas das células, principalmente em relação ao padrão de morte, assim estas metodologias são úteis para sugerir o tipo de morte celular, seja por necrose ou apoptose.

A apoptose corresponde a um tipo de morte celular programada, a qual desempenha papel fundamental na homeostase em vários sistemas biológicos, regulando o número de células e eliminando células danificadas e senescentes. A apoptose é um processo altamente regulado que induz a morte celular (suicídio celular) eliminando células ou tecidos indesejados protegendo o organismo contra a proliferação de células defeituosas. Quando o mecanismo de apoptose está danificado pode ocasionar diversas patologias, inclusive câncer (Majno; Joris, 1995; Opalka *et al.*, 2002). Células em apoptose apresentam algumas alterações morfológicas e bioquímicas típicas como diminuição do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, alteração no potencial transmembrânico da mitocôndria, externalização da fosfatidilserina e ativação de caspases (Van Cruchten & Van den Broeck, 2002). Diferentemente da apoptose, a morte por necrose é caracterizada pelo aumento do volume celular, seguido da perda da integridade da membrana plasmática com conseqüente liberação dos componentes celulares e indução de inflamação aos tecidos adjacentes (Wyllie *et al.*, 1980).

A análise morfológica, tanto pela coloração diferencial por LA/BE quanto por May-Grunwald-Giemsa, após 24 horas de incubação, revelou que as células tratadas com o composto teste apresentaram características típicas de

apoptose, incluindo prolongamentos da membrana plasmática, condensação da cromatina com marginalização da cromatina para a membrana nuclear, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos (Galluzzi *et al.*, 2007) e uma pequena população com características de necrose. Entretanto, quando o tempo de incubação foi reduzido para 3 e 6 horas, uma população representativa de células necróticas foi observada, sugerindo um rápido mecanismo de indução de necrose que é gradualmente sobreposto pela ativação de vias apoptóticas. De fato, a exposição por 3 horas foi suficiente para desencadear ambos efeitos da Cordiaquinona J.

A indução de morte celular por apoptose e necrose vêm sendo discutida para outras quinonas. A β -lapachona, por exemplo, pode causar tanto apoptose (Planchon *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1993) quanto necrose (Li *et al.*, 1999) dependendo da célula alvo, do tempo e da dose utilizada (Weller *et al.*, 1997). Essa naftoquinona induz morte celular via apoptose em várias células de carcinoma humano e células leucêmicas humanas (Chau *et al.*, 1998; Don *et al.*, 2001). No entanto, em células de osteosarcoma humana (U2-OS), a β -lapachona induziu necrose em vez de apoptose, sendo caracterizado, principalmente pela perda da integridade de membrana, mas neste caso, houve também liberação do citocromo c, diminuição do potencial transmembrânico mitocondrial e depleção de ATP (Liu *et al.*, 2002).

Além da β -lapachona, outras naftoquinonas têm sido descritas quanto a sua capacidade de induzir morte celular por apoptose e/ ou necrose, dependendo da linhagem celular, tempo e dose utilizadas. Samali e colaboradores, em 1999, realizaram um estudo comparativo entre a menadiona (vitamina K) e uma estrutura análoga (α CD95) quanto à indução de morte em células de carcinoma hepatocelular (HepG2). Nessa linhagem, a menadiona causou apenas necrose, enquanto o seu análogo induziu somente apoptose, no entanto, a liberação de citocromo c da mitocôndria foi o único mecanismo em comum de ambas as moléculas. Estudos com microscopia eletrônica realizados em linhagem de osteosarcoma humano (143B) após 24 horas de tratamento com a menadiona na dose de 100 μ M mostrou a de células em processo de morte por apoptose e necrose (Kamiński *et al.*, 2002).

Inicialmente, apoptose e necrose eram consideradas como dois processos de morte distintos induzidos pelo mesmo estímulo ou por estímulos diferentes. No entanto, estudos posteriores têm sugerido que ambos processos de morte podem dividir muitos componentes moleculares em estágios iniciais (Chautan *et al.*, 1999; Chi *et al.*, 1999; Filipovic *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002). O que pode ser facilmente observado acima.

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

Os experimentos de citometria de fluxo foram realizados e corroboraram com os achados anteriores. Após 3, 6 e 24 horas de incubação, foram evidenciadas uma diminuição significativa do número de células e perda da integridade da membrana celular nas concentrações testadas (1,5 e 3,0 μM). Alguns autores consideram a distinção entre apoptose e necrose difícil de ser detectada e controversa. No entanto a distinção morfológica da necrose em comparação a apoptose se baseia, principalmente, na perda da integridade de membrana, onde as células em apoptose permanecem com suas membranas íntegras até um estágio final da morte (apoptose tardia) (Masquelier *et al.*, 2004). Com isso, podemos sugerir que o rompimento da membrana plasmática das células tratadas com a Cordiaquinona J está relacionado à indução de necrose. Outros compostos podem induzir necrose após curtos períodos de tratamento. A pristimerina, na concentração de 0,8 μM , induziu necrose após 6 horas de incubação em células de HL-60 (Costa *et al.*, 2008). A piplartina também induz necrose em células leucêmicas HL-60 e K-562, no entanto

somente após 24 horas de incubação, dependendo da concentração testada (Bezerra *et al.*, 2007).

Além disso, foi observada diminuição do tamanho e da granulosidade das células, através da diminuição da dispersão frontal e lateral da luz, respectivamente. O ciclo celular também foi avaliado, mas não houve diferença em fases específicas do mesmo, quando comparado com as células do controle negativo. No entanto, quando avaliado a fragmentação do DNA foi observado que a partir de 3 horas de tratamento, em ambas as doses testadas, houve um aumento de células com o DNA fragmentado. Esse aumento foi intensificado de maneira tempo e dose dependente.

Como dito anteriormente, a perda da integridade da membrana plasmática é uma das características observadas na morte celular por necrose, (Wyllie *et al.*, 1980) ao passo que, a fragmentação de DNA em células com membrana íntegra e a diminuição do tamanho e granulosidade da célula seria uma alteração típica de um processo de apoptose (Van Cruchten & Van den Broeck, 2002). Como pôde ser observado, a análise morfológica está de acordo com os dados da citometria de fluxo, inclusive com o momento em que começa o processo de necrose e de apoptose nas células. Indicando que as células de HL-60 tratadas com a cordiaquinona J, estão em processo de morte tanto por necrose quanto por apoptose em apenas 3 horas de incubação com a droga.

A morte celular por apoptose possui duas vias principais de sinalização: a via extrínseca, iniciada pela ativação de receptores de morte ligados a membrana levando a clivagem de caspases (Ashkenazi & Dixit, 1998), e a via intrínseca, caracterizada pela despolarização mitocondrial, liberação do citocromo c e subsequente ativação de caspases (Green & Reed, 1998; Khosravi-Far & Esposti, 2004). Assim, reunindo os dados citados acima, acompanhado com a informação sobre a despolarização mitocondrial podemos indicar a via envolvida na indução da apoptose. Células HL-60 tratadas com a cordiaquinona J apresentaram despolarização mitocondrial de maneira dose e tempo dependente. Na concentração de 3,0 μM , com apenas 30 minutos de

incubação, a cordiaquinona J apresentou 17,8% de despolarização mitocondrial, dados estes, significativamente diferente quando comparados aos dados do controle negativo. Após 3 e 6 horas de incubação esta despolarização tornou-se ainda mais intensa alcançando níveis máximos após 24 horas de incubação. Assim, podemos sugerir que a cordiaquinona J induz a ativação de apoptose por via intrínseca em apenas 3 horas de incubação. Com esse período de incubação, podemos observar vários parâmetros que indicam o tipo de morte envolvido na citotoxicidade da cordiaquinona J. Com apenas 30 minutos de incubação foi observado apenas a despolarização mitocondrial, não sendo então possível assegurar de que a substância esteja causando apoptose em um período tão curto.

Muitos fatores, tais como produção de EROs, dano ao DNA, disfunção mitocondrial, ativação do PARP e clivagem de caspases estão envolvidas na regulação do mecanismo de morte celular (Liu *et al.*, 2002). A mitocôndria está intimamente envolvida no processo de apoptose em várias células. A liberação do citocromo c do espaço intermembranar da mitocôndria constitui um dos passos iniciais para desencadear o processo da apoptose e pode ocorrer nas primeiras horas de tratamento. Isso pôde ser visto no tratamento de células de carcinoma de próstata (DU-145), onde a β -lapachona, na concentração de 4 μ M, promoveu a liberação do citocromo c com apenas 1 hora de incubação (Li *et al.*, 1999).

Apesar de tanto a fragmentação de DNA quanto a diminuição do potencial transmembrânico de mitocôndria serem processos característicos da apoptose, esses efeitos também podem ser encontrados em células necróticas (Zong & Thompson, 2006). No entanto, a indução de apoptose pôde ser confirmada pela capacidade da cordiaquinona J induzir ativação de caspases efectoras 3 e 7 em células de HL-60. As caspases são enzimas essenciais para o processo de apoptose e até então não foram evidenciadas em células necróticas (Nicholson & Thornberry, 1997; Zong & Thompson, 2006). A avaliação da externalização da fosfatidilserina também foi útil para comprovar a morte celular via apoptose. A fosfatidilserina é um fosfolípido interno de membrana, que ao ser externalizado sinaliza para os macrófagos que a célula

seja fagocitada, evitando a liberação do conteúdo celular no meio (Zimmermann *et al.*, 2001). A externalização da fosfatidilserina é um evento que ocorre em células que estão no processo de apoptose e geralmente é um evento que ocorre de maneira caspase-dependente (Martin *et al.*, 1996) e corresponde a um processo que acontece horas depois da liberação do citocromo c pela mitocôndria e da perda da integridade da membrana mitocondrial (Goldstein *et al.*, 2000).

Primeiramente foi avaliado, por citometria de fluxo, a capacidade da cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) induzir a externalização da fosfatidilserina em células de HL-60 após 3 horas de incubação. Foi utilizada uma dupla coloração com 7-AAD e anexina V para determinar a presença de apoptose. A anexina V é um membro de uma família de proteínas ligadas a fosfolipídios dependentes de cálcio, que possuem alta afinidade por bicamadas fosfolipídicas de membrana, ricas em fosfatidilserina (Thiagarajan & Tait, 1990). Fluorocromos conjugados podem ser uma ferramenta fundamental para monitorar mudanças na assimetria de membranas celulares fosfolipídicas (Koopman *et al.*, 1994), sendo portanto um excelente método para determinar a presença de células apoptóticas. Então, pôde ser observado que com apenas 3 horas de incubação com a cordiaquinona J, na maior concentração testada, cerca de 60% das células estavam em apoptose inicial, sendo que em torno de 34% das células se encontravam em um estágio mais avançado da apoptose ou em necrose inicial, pois as células estavam marcadas positivamente para ambos os corantes, o que indica que as células tiveram as suas membranas plasmáticas rompidas.

Após a confirmação da externalização da fosfatidilserina das células de HL-60 em presença da substância foi avaliada a capacidade da cordiaquinona J em induzir a ativação de caspases após 3 horas de incubação. O percentual de células viáveis, apoptóticas iniciais e tardias foi mensurado através da utilização de iodeto de propídeo e de um inibidor de caspases fluorescente (FLICA™) o qual identifica especificamente a presença de caspases 3 e 7 ativadas. O reagente FLICA se liga covalentemente às caspases 3 e 7 ativas ficando retido nas células, enquanto que as moléculas de FLICA não ligadas

são difundidas para fora da célula. Células que apresentam coloração positiva para o FLICA são denominadas de células apoptóticas. As células marcadas com iodeto de propídeo são consideradas um estágio final da apoptose ou células necróticas, pois o iodeto de propídeo é excluído das células saudáveis e de células em apoptose inicial, mas é permeável em células em apoptose tardia e em células necróticas (Salvesen & Dixit, 1997; Slee *et al.*, 1999; Alnemri *et al.*, 1996; Ekert *et al.*, 1999). Com isso podemos determinar o percentual de células que estavam em processo de apoptose inicial/tardia ou de necrose após a incubação de 3 horas com a cordiaquinona J.

Como visto anteriormente, a cordiaquinona J, com apenas 3 horas de incubação induziu ativação das caspases efectoras 3 e 7, que pôde ser observada pelo percentual de células nos estágio iniciais e tardio da apoptose, sugerindo a rápida indução de apoptose por via intrínseca dependente de caspase. A presença de células em necrose, visualizadas pela penetração de iodeto de propídeo, sugere que a cordiaquinona J atua em pelo menos dois mecanismos de ação distintos, um promovendo apoptose dependente de caspase e outro mecanismo envolvido na indução de necrose.

Diversas naftoquinonas vêm sendo avaliadas quanto ao seu potencial anticâncer, no entanto tem sido encontrado um limitado potencial terapêutico (Lamson & Plaza, 2003; Kaminski *et al.*, 2002). Diversas naftoquinonas apresentam efeitos em pequenos períodos de incubação tais como, a plumbagina que apresenta características morfológicas de apoptose após 4 horas de incubação, além disso, a plumbagina também induziu a externalização da fosfatidilserina e ativação de caspases, indicando indução de apoptose, no entanto também apresentou células necróticas após 16 horas de incubação (Montoya *et al.*, 2004).

Com o objetivo de mensurar se apenas um estímulo inicial seria capaz de promover mudanças morfológicas e bioquímicas que puderam ser observadas com 3 horas de incubação com a cordiaquinona J, células HL-60 foram incubadas por 30 minutos e posteriormente foram lavadas e reincubadas em meio livre de droga por mais 2 horas e 30 minutos. Após este tratamento as

células foram imediatamente analisadas quanto a integridade da membrana celular, número de células, despolarização mitocondrial e fragmentação do DNA por citometria de fluxo e os parâmetros morfológicos por May-Grunwald-Giemsa. Foi observado que as células HL-60 incubadas com a cordiaquinona J necessitam de apenas um curto estímulo para causar efeitos apoptóticos e necróticos semelhantes aos apresentados após 3 horas de incubação.

Estudos feitos com linhagens de próstata, pulmão e ovário, mostraram que com apenas um estímulo inicial de 4 horas, e reincubação com meio livre de droga, por mais 20 horas com a β -lapachona na concentração de 4 μ M, resultou em despolarização mitocondrial em todas as linhagens citadas. Esta despolarização pôde ser observada tanto no processo apoptótico quanto necrótico nas linhagens citadas (Li *et al.*, 1999).

Atualmente sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidas no processo de morte celular e que muitos agentes indutores de apoptose geram radicais livres (Inbaraj *et al.*, 2004). Srinivas e colaboradores em 2004 demonstraram que a plumbagina induziu apoptose através da geração de espécies reativas de oxigênio em uma via dependente de caspases. A β -lapachona também induziu apoptose em células HL-60, promovendo dano ao DNA através de estresse oxidativo (Shiah *et al.*, 1999).

As células HL-60 possuem sistemas antioxidantes, NQO1, glutathione e a superóxido dismutase, pouco eficientes (Manna *et al.*, 1999) favorecendo o efeito de substâncias geradoras de EROs como a β -lapachona e a cordiaquinona J. Isso pôde ser confirmado quando a células de MCF-7, que são células que possuem sistemas antioxidantes eficientes, foram incubadas com a β -lapachona e não causaram aumento de EROs (Don *et al.*, 2001) indicando que dependendo das células testadas as substâncias podem ter diferentes mecanismos de ação.

No entanto, além de apoptose, as espécies reativas de oxigênio podem também causar necrose (Zong & Thompson, 2008). Níveis fisiológicos de EROs podem regular a transcrição, agir como moléculas sinalizadoras, além de

proteger o organismo contra invasões de patógenos. Enquanto a excessiva produção de EROs promove estresse oxidativo, danos em moléculas e organelas intracelulares e finalmente a necrose (Zong & Thompson, 2008).

Com isso foi observado que a cordiaquinona J é capaz de induzir a formação de EROs em células de HL-60 após 1 hora de incubação, onde observou-se que, na presença de cordiaquinona J 3,0 μM , 49,17% das células apresentavam formação de EROs intracelular.

Podemos sugerir que a formação de EROs são eventos que ocorrem inicialmente nas células e que podem provocar diversos efeitos colaterais sobre as mesmas (Bironaite *et al.*, 2004). Por isso estudos devem ser realizados a procura de fármacos que gerem quantidades adequadas de EROs para o tratamento desejado e além disso, determinar as condições ótimas para indução de apoptose por agentes geradores de EROs é extremamente necessário, pelo menos para agentes anticâncer como a daunorrubicina, doxorrubicina, cisplatina entre outros, que são fármacos causadores de diversos efeitos colaterais, muitas vezes ocasionados por níveis elevados de EROs. Os níveis de efeitos colaterais desses compostos em pacientes pode ser fortemente dependente das doses e da quantidade de EROs induzido (Bironaite *et al.*, 2004). Fisiologicamente a geração de EROs é normalmente reduzida por agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, tais como: glutathiona (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalases e peroxidases. Portanto o estresse oxidativo pode ser resultado de um desequilíbrio entre os altos níveis de EROs gerados que não são desintoxicados pelos agentes antioxidantes celulares ou pela inibição de agentes antioxidantes (Wang & Yi, 2008).

No entanto, ainda existem problemas de como identificar a exata quantidade e a maneira de desintoxicação das espécies reativas de oxigênio. Uma das possibilidades de investigar a origem de EROs no processo da apoptose é através de antioxidantes (Bironaite *et al.*, 2004). Grupos tióis, em particular a glutathiona (GSH), são um dos principais protetores do organismo contra EROs. A N-acetil-L-cisteína (NAC) possui um grupo tiol em sua

estrutura, e age como um antioxidante molecular intracelular muito eficiente, além disso, é precursora da glutatona e inibidora de diversos radicais livres ($O_2 \bullet-$, $OH\bullet$) (Steenwooden *et al.*, 1996).

As células HL-60 foram pré-incubadas com o NAC e posteriormente incubadas com a cordiaquinona J, afim de avaliar por qual mecanismo a substância teste está induzido as espécies reativas de oxigênio e além disso, determinar se as EROs influenciam na indução da necrose e da apoptose.

Aparentemente, a geração de EROs observada após o tratamento com a cordiaquinona J levou a um processo de morte rápido por necrose, enquanto que as células que sobreviveram a esse estresse oxidativo intenso entraram no processo de apoptose por via intrínseca. No entanto, a presença de fragmentação do DNA, após o pré-tratamento com NAC, na maior concentração testada (3.0 μ M), mesmo na ausência de despolarização mitocondrial, da geração de EROs e da perda da integridade de membrana, sugere que além dos efeitos de estresse oxidativo induzidos pela cordiaquinona J, esta poderia também estar apresentando efeitos diretos sobre o DNA, mecanismo de ação este empregado por diversas outras quinonas, tais como as antraciclinas (Asche, 2005; Hillard *et al.*, 2008).

As naftoquinonas são compostos bem caracterizados pela sua atividade antitumoral. A Cordiaquinona J, apesar de pouco explorada, mostrou ser um candidato em potencial como agente anticâncer. No entanto outros testes devem ser realizados para desvendar o real mecanismo de ação da Cordiaquinona J.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

A cordiaquinona J isolada da planta *Cordia leucocephala* possui potente atividade citotóxica com baixa seletividade para células tumorais. A cordiaquinona J apresentou maior atividade em células tumorais leucêmicas (HL-60), causando tanto apoptose pela via intrínseca quanto necrose. Esses efeitos estão intimamente relacionados à sua capacidade de indução de estresse oxidativo nas células tratadas.

Referências

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., Akey, C. W. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. **Molecular Cell**, 9: 423-32, 2002.

Agra, M. F. **Plantas da Medicina Popular dos Cariris Velhos**. Editora União. p. 112, 1996.

Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thorn-Berry, N. A., Wong, W. W., Yuan, J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. **Cell** 87:171, 1996.

Anazetti, M. C., Melo, P. S., Duran, N., Haun, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, 188: 261–274, 2003.

Angely, J. Flora analítica e fitogeográfica do Estado de São Paulo. *Phyton: International Journal of Experimental Botany*, p.819-825, 1970.

Arkoudis, E., Stratakis, M. Synthesis of Cordiaquinones B, C, J, and K on the Basis of a Bioinspired Approach and the Revision of the Relative Stereochemistry of Cordiaquinone C. **Journal of Organic Chemistry**, 73: 4484–4490, 2008.

Arrebola, M. R. B., Peterlin, M. F., Bastos, D. H. M., Rodrigues, R. F. de O., Carvalho, P. O. Estudo dos componentes lipídicos das sementes de três espécies do gênero *Cordia* L. (Boraginaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 14: 57-65, 2004.

Asche, C. Antitumor quinones. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 5: 449-467, 2005.

Ashkenazi, A., Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, 281:1305-1308, 1998.

Aslan, M., Ozben, T. Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways. **Antioxidants & Redox Signaling**, 5: 781-788, 2003.

Axworthy, C.A., Hoffmann, K. J., Streeter, A.J., Calleman, C.J., Pascoe, G.A., Baillie, T.A. Covalent binding of acetaminophen to mouse hemoglobin. Identification of major and minor adducts formed in vivo and implications for the nature of the arylating metabolites. **Chemico-Biological Interactions**, 68: 99-116, 1988.

Barroso, G. M. Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 88-94, 1986.

Bellosillo, B., Villamor, N., López-Guillermo, A., **Marcé, S., Esteve, J., Campo, E., Colomer, D., Montserrat, E.** Complement mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. **Blood**, 98: 2771–2777, 2001.

Bergman, P. J., Harris, D. Radioresistance, chemoresistance and apoptosis resistance. The past, present and future. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 27: 47-57, 1997.

Berthou, C., Zhang, Y., Sasportes, M. Granzyme B: an essential protease for the inflammatory response. **Pathologie-biologie (Paris)**, 46: 617-624, 1998.

Bezerra, D. P., Militão, G. C. G., Castro, F. O., Pessoa, C., Moraes, M. O., Silveira, E. R., Lima, M. A. S., Elmiro, F. J. M., Costa-Lotufo, L. V. Piplartine induces inhibition of leukemia cells proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in Vitro**, 21: 1-8, 2007.

Bieber, L. W., Krebs, H. C., Schäfer, W. Further meroterpenoid naphthoquinones from *Cordia corymbosa*. **Phytochemistry**, 35: 1027-1028, 1994.

Bieber, L. W., Messana, I., Lins, S. C. N., Silva Filho, A. A., Chiapreta, A., Mello J. F. Meroterpenoid naphthoquinoses from *Cordia Corymbosa*. **Phytochemistry**, 29: 1955-1959, 1990.

Bironaite, D., Kalvelyte, A. V., Imbrasaite, A., Stulpinas, A. The intracellular antioxidant balance of HL-60 cells and its implication in the apoptosis induced by quinoidal compounds. **BIOLOGIJA**, 1: 48-51, 2004.

Bissery, M. C., Guénard, D., Guéritte-Voegelein, F. Lavelle, F. Experimental Antitumor Activity of Taxotere (RP 56976, NSC 628503), a Taxol Analogue. **Cancer Research**, 51: 4845-4852, 1991.

Brand, J. D., Fisher, F. J. Reductive transformation of 10-deoxydaunomycinone. **Journal Organic Chemistry**, 55: 2518-2530, 1990.

Broker, L. I., Kruyt, F. A. E., Giaccone, G. Cell death independent of caspases: A review. Review. **Clinical Cancer Research**, 11: 3155-3162, 2005.

Carmody, R. J., Cotter, T. G. Signalling apoptosis: A radical approach. **Redox Report**, 6: 77-90, 2001.

Carvalho, P., Tirnauer, J. S., Pellman, D. Surfing on microtubule ends. **Trends in Cell Biology**, 5: 229-237, 2003.

Cassady, J. M., Douros, J. D. **Anticancer Agents Based on Natural Product Models**. Academic Press, New York, 1980.

Cenas, N., Prast, S., Nivinskas, H., Sarlauskas, J., Arnér, E. S. J. Interactions of nitroaromatic compounds with the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase and the relation to induction of apoptosis in human cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, 281: 5593-5603, 2006.

Chang, H. Y., Yang, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64: 821-846, 2000.

Chau, Y. P., Shiah, S. G., Don, M. J., Kuo, M. L. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor beta-lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. **Free Radical Biological & Medicine**, 24: 660-670, 1998.

Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P., Golstein, P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. **Current Biology**, 9: 967-970, 1999.

Chen, Y. C., Lin-Shiau, S. Y., Lin, J. K. Involvement of heat-shock protein 70 and p53 proteins in attenuation of UVC-induced apoptosis by thermal stress in hepatocellular carcinoma cells. **Photochemistry and Photobiology**, 70: 78-86, 1999.

Chi, S., Kitanaka, C., Noguchi, K., Mochizuki, T., Nagashima, Y., Shirouzu, M., Fujita, H., Yoshida, M., Chen, W., Asai, A., Himeno, M., Yokoyama, S., Kuchino, Y. Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. **Oncogene**, 18: 2281-2290, 1999.

Chiappeta, A.; Mello, J. F., Maciel, G. M. Higher Plants with Biological Activity - Plants of Pernambuco I. **Revista do Instituto de Antibióticos**, 21: 43-50, 1983.

Chung, S. H., Chung, S. M., Lee, J. Y., Kim, S. R., Park, K. S., Chung, J. H. The biological significance of non-enzymatic reaction of menadione with plasma thiols: enhancement of menadione-induced cytotoxicity to platelets by the presence of blood plasma. **FEBS Letters**, 23: 235-240, 1999.

Clardy, J., Walsh, C. Lessons from Natural Molecules. **Nature**, 432: 829-837, 2004.

Conklin, K. A. Chemotherapy-associated oxidative stress: Impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**, 3: 294-300, 2004.

Costa, P. M., Ferreira, P.M.P., Bolzani, V.S., Furlan, M., Santos, V.A.F.F.M., Corsino, J., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., Montenegro, R.C., Pessoa, C.O. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**, 22: 854-863, 2008.

Costantini, P., Jacotot, E., Decaudin, D., Kroemer, G. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. **Journal of the National Cancer Institute**, 92: 1042-1053, 2000

Cragg, G. M., Kingston, D. G. I., Newman, D. J. (Eds.). *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL., 2005.

Cragg, G. M., Newman, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, 100: 72-79, 2005.

Cragg, G. M., Newman, D. J. Yang, S.S. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. **Journal of Natural Products**, 69: 488-98, 2006.

da Silva, M. N., Ferreira; V. F., de Souza, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, 26: 407-416, 2003.

Davies, K. J. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: A new paradigm for oxidative stress. **IUBMB Life**, 48: 41–47, 1999.

Desikan, R., Neill, S. J., Hancock, J. T. Regulation of the *Arabidopsis* Transcriptome by Oxidative Stress. **Free Radical Biology & Medicine**, 28: 773-778, 2000.

Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, J. T., Neill, S. J. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. **Biochemical Journal**, 330: 115-120, 1998.

[Dimri, G. P.](#), [Lee, X.](#), [Basile, G.](#), [Acosta, M.](#), [Scott, G.](#), [Roskelley, C.](#), [Medrano, E. E.](#), [Linskens, M.](#), [Rubelj, I.](#), [Pereira-Smith, O.](#) Peacocke, M., Campisi, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 92: 9363-9367, 1995.

Diniz, J. C., Viana, F. A., Oliveira, O. F., Maciel, M. A., Torres, M. C.; Braz-Filho, R., Silveira, E.R., Pessoa, O. D. ¹H and ¹³C NMR assignments for two new cordiaquinones from roots of *Cordia leucocephala*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 47: 190-193, 2009.

Dolbeare, F., Gratzner, H., Pallavicini, M.G., Gray, J. W. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 80: 5573-5577, 1983.

Don, M. J., Chang, Y. H., Chen, K. K., Ho, L. K., Chau, Y. P. Induction of CDK inhibitors (p21(WAF1) and p27(Kip1)) and Bak in the beta-lapachone-induced apoptosis of human prostate cancer cells. **Molecular Pharmacology**, 59: 784-794, 2001.

Eisenhauer, E. A., Vermorken, J. B. The Taxoids: Comparative Clinical Pharmacology and Therapeutic Potential. **Drugs**, 55: 5-30, 1998.

Ekert, P. G., Silke, J., Vaux D. L. Caspase inhibitors. **Cell Death & Differentiation**, 6: 1081-1086, 1999.

Ficarra, R., Ficarra, P., Tommasini, S. Leaf extracts of some *Cordia* species analgesic and anti-inflammatory activities as well as their chromatographic analysis. **Fármaco**, 50: 245-256, 1995.

Filipovic, D. M., Meng, X., and Reeves, W. B. Inhibition of PARP prevents oxidant-induced necrosis but not apoptosis in LLC-PK1 cells. **American Journal of Physiology**, 277: 428-436, 1999.

Fischer, P. M., Glover, D. M., Lane, D. P. Targeting the cell cycle. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, 1: 417-423, 2004.

Fleury, C., Mignotte, B., Vayssière, J. L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. **Biochimie**, 84: 131-141, 2002.

Foster, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, 14: 144-149, 2008.

Foye, W. O. (Ed.) **Cancer Chemotherapeutic Agents**. American Chemical Society: Washington, D.C. 205:239, 1995.

Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer, G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differentiation**, 14: 1237-1266, 2007.

Garg, A. K., Aggarwal, B. B. Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. **Molecular Immunology**, 39: 509-517, 2002.

Gaudiano, G., Koch, T. H. Redox chemistry of anthracycline antitumor drugs and use of captodative radicals as tools for its elucidation and control. **Chemical Research in Toxicology**, 4: 2-16, 1991.

Gibbs, R. D. **Chemotaxonomy of flowering plants**. London: Mc. Gill-Queen's: University Press. 3: 1748-1755, 1974.

Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I., Green, D. R. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. **Nature Cell Biology**, 2: 156-162, 2000.

Gordaliza, M., Castro, M. A., Del Corral, J. M., San Feliciano, A. Antitumor Properties of Podophyllotoxin and Related Compounds. **Current Pharmaceutical Design**, 6: 1811-1839, 2000.

Green, D. R., Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, 281: 1309-12, 1998.

Green, D., Kroemer, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? **Trends in Cell Biology**, 8: 267-271, 1998.

Haddad, J. J. Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: Immuno-pharmaco-redox conception of oxidative siege versus cell death commitment. **International Immunopharmacology**, 4: 475-493, 2004.

Haimovitz-Friedman, A. Radiation-induced signal transduction and stress response. **Radiation Research**, 150: 102-108, 1998.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**. 100: 57-70, 2000.

Hancock, J. T., Desikan, R., Neill, S. J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. **Biochemical Society Transactions**, 29: 345-350, 2001.

Hillard, E. A., Abreu, F. C., Ferreira, D. C. M., Jaouen, G., Goulart, M. O. F., Amatore, C. Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. **Chemical Communications**, (London), 23: 2612-2628, 2008.

Hodge, S., Hodge, G., Scicchitano, R., Reynolds, P. N., Holmes, M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. **Immunology & Cell Biology**, 81: 289-296, 2003.

Holm, M., Thomsen, M., Hoyer, M., Hokaland P. Optimization of a flow cytometric method for the simultaneous measurement of cell surface antigen, DNA content, and in vitro BrdU incorporation into normal and malignant hematopoietic cells. **Cytometry**, 32: 28-36, 1998.

Hortwitz, S. B. Personal recollections on the early development of taxol. **Journal of Natural Products**, 62: 136-138, 2004.

Huang, L., Pardee, A.B. Beta-lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. **Molecular Medicine**, 5: 711-720, 1999.

Huang, S. T., Kuo, H. S., Hsiao, C. L., Lin, Y. L. Efficient Synthesis of "Redox-Switched" Naphthoquinone Thiol-Crown Ethers and Their Biological Activity Evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 10: 1947-1952, 2002.

Hussain, H., Krohn, K., Uddin V., Ghulam, A., Miana, A., Green. I. R. Lapachol: an overview. **Arkivoc**, 2: 145-171, 2007.

Inbaraj, J. J. Chignell, C. F. Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. **Chemical Research in Toxicology**, 17: 55–62, 2004.

Inbaraj, J. J., Gandhidasan, R., Murugesan, R. Cytotoxicity and superoxide anion generation by some naturally occurring quinones. **Free Radical Biology and Medicine**, 26: 1072-1078, 1999.

Instituto Nacional do Câncer (**INCA**). Estimativa 2008 – Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, p. 23-24, 2008. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.

loset I. R., Marston A., Gupta M. P., Hostettmann, K. Antifungal and larvicidal cardioquinones from the roots of *Cordia curassavica*. **Phytochemistry**, 53: 613-617, 2000.

loset, J. R., Marston, A., Gupta, M. P. Hostettmann, K. Antifungal and larvicidal meroterpenoid naphthoquinones and a naphthoxirene from the roots of *Cordia linnaei*. **Phytochemistry**, 47: 729-734, 1998.

Kamiński, M., Karbowski, M., Miyazaki, Y., Kędzior, J., Spodnik, J. H., Gil, A., Woźniak, M., Wakabayashi, T. Co-existence of apoptotic and necrotic features within one single cell as a result of menadione treatment. **Folia Morphologica**, 61: 217-220, 2002.

Khosravi-Far, R., Esposti, M. D. Death receptor signals to mitochondria. **Cancer Biology & Therapy**, 3: 1051-1057, 2004.

Kim, J., Klionsky, D. J. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. **Annual Review of Biochemistry**, 69: 303-342, 2000.

Kingston, D. G. I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: **The Practice of Medicinal Chemistry**. Ed. by Wermuth CG. Academic Press Limited, p. 102-114, 1996.

Klionsky, D. J., Ohsumi, Y. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 15: 1-32, 1999.

Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., van Oers, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, 84:1415-1420, 1994.

Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenberghe, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M. V., Malorni, W., Knight, R. A., Piacentini, M., Nagata, S., Melino, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death & Differentiation**, 12: 1463-1467, 2005.

Lamson, D. W., Brignall, M. S. Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. **Alternative Medicine Review**, 4: 304-329, 1999.

Lamson, D. W., Plaza, S. M. The anticancer effects of vitamin K. **Alternative Medicine Review**, 8: 303-318, 2003.

Larsson, R., Lindquist, T., Lindeke, B., Moldeus, P. Cellular effects of N(4-ethoxyphenyl) p-benzoquinone imine, a p-phenetidine metabolite formed during peroxidase reactions. **Chemico-Biological Interactions**, 60: 317-330, 1986.

LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., Bondy, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, 5: 227-231, 1992.

Li, C.J., Averboukh, L., Pardee, A.B. β -Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. **Journal of Biological Chemistry**, 268: 22463-22468, 1993.

Li, C.J., Wang, C., Pardee, A.B. Induction of apoptosis by β -lapachone in human prostate cancer cells. **Cancer Research**, 55: 3712–3715, 1995.

Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**, 94: 491-501, 1998.

Li, Y.Z., Li, C.J., Pinto, A.V., Pardee, A.B. Release of mitochondrial cytochrome c in both apoptosis and necrosis induced by beta-lapachone in human carcinoma cells. **Molecular Medicine**, 5: 232-239, 1999.

Lin, T. S., Antonini, I., Cosby, L. A., Sartorelli, A. C. 2,3-Dimethyl-1,4-naphthoquinone derivatives as bioreductive alkylating agents with cross-linking potential. **Journal of Medicinal Chemistry**, 27: 813-815, 2001.

Liu, M. J., Wang, Z., Li, H. X., Wu, R. C., Liu, Y. Z., Wu, Q. Y. Mitochondrial dysfunction as an early event in the process of apoptosis induced by woodfordin I in human leukemia K562 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 194: 141-155, 2004.

Liu, T-J., Lin, S-Y., Chau, Y-P. Inhibition of Poly(ADP-ribose) Polymerase Activation Attenuates β -Lapachone-Induced Necrotic Cell Death in Human Osteosarcoma Cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 182: 116-125 2002.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. **Biologia Celular e Molecular** 4^{ed}. 1054, 2002.

Louro, I.D., Llerena Jr, J.C., Vieira de Melo, M.S., Ashton-Prolla, P., Conforti-Frões, N. **Genética Molecular do Câncer**. 1^a. ed.. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell**, 94: 481-90, 1998.

Majno, G., Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **American Journal of Pathology**, 146: 3-15, 1995.

[Manna, S.K.](#), [Gad, Y.P.](#), [Mukhopadhyay, A.](#), [Aggarwal, B.B.](#) Suppression of tumor necrosis factor-activated nuclear transcription factor-kappaB, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis by beta-lapachone. **Biochemical Pharmacology**, 57: 763-774, 1999.

Marston, A., Zagorski, M. G., Hostettmann, K. Antifungal polyphenols from *Cordia goetzei* Gurke. **Helvetica Chimica Acta**, 71: 1210-1219, 1988.

Martin, S. J., Finucane, D. M., Amarante-Mendes, G. P., O'Brien, G. A., Green, D. R. Phosphatidylserine externalization during CD95- induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. **Journal of Biological Chemistry**, 271: 28753-28756, 1996.

Martin, S. J., Green, D. R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? **Cell**, 82: 349-352, 1995.

Masquelier, M., Zhou, Q. F., Gruber, A., Vitols, S. Relationship between daunorubicin concentration and apoptosis induction in leukemic cells. **Biochemical Pharmacology**, 67: 1047-1056, 2004

Matés, J. M., Sánchez-Jiménez, F. M. Role of reactive oxygen species in apoptosis implications for cancer therapy. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 32: 157-70, 2000.

Matsuoka, K., Nomura, K., Hashino, T. Mutagenic Effects of Brief Exposure to Bromodeoxyuridine on Mouse FM3A Cells. **Cell & Tissue Kinetics**, 5: 495-503, 1990.

Matsuse, I. T., Lim, Y. A., Hattori, M., Correa, M., Gupta, M. P. A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. **Journal of Ethnopharmacology**, 64: 15-22, 1999.

McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R. J., Nishioka, W. K., Green, D. R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods in cell biology**, 46: 153-185, 1995.

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

Menezes, J. E. S. A., Lemos, T. L. G., Pessoa, O. D. L., Braz-Filho, R. Montenegro, R. C., Wilke, D. V., Costa-Lotufo, L. V., Pessoa, C. Moraes, M. O., Silveira, E. R. A cytotoxic meroterpenoid benzoquinone from roots of *Cordia globosa*. **Planta Medica**, 71: 1-5, 2005,

Miranda, F. G. G., Vilar, J. C., Alves, I. A. N., Cavalcanti, S. C. H., Antonioli, A. R. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellaneda* Lor. ex Griseb. inner bark.. **BMC Pharmacology**, 1: 1-6, 2001.

Mirkes, P. E. Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development. **Teratology**, 65: 228-239, 2002.

Monks, T. J., Jones, D.C. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinine methides, and quinone-thioethers. **Current Drug Metabolism**, 3: 425-438, 2002.

Monks, T. J., Lau, S. S. The pharmacology and toxicology of polyphenolicglutathione conjugates. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 38: 229-255, 1998.

Mosmann, T. J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65: 55-63, 1983.

Munday, R., Smith, B. L., Munday, C. M. Comparative toxicity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones in rats. **Chemico-Biological Interactions**, 98: 185-192; 1995.

Munoz, L. E., Gaipf, U. S., Franz, S., Sheriff, A., Voll, R. E., Kalden, J. R., Herrmann. M. SLE - a disease of clearance deficiency? **Rheumatology** (Oxford), 44: 1101-1107, 2005.

Newman, D. J., Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, 70: 461-477, 2007.

Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, 66: 1022-1037, 2003.

Newman, D.J., Cragg, G.M. Developments and Future Trends in Anticancer Natural Products Discovery. In: Anticancer Agents from Natural Products. Edited by G.M. Cragg, D.G.J. Kingston, D.J. Newman. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC. Boca Raton, Florida. pp. 553-571, 2005.

Nicholson, D. W., Thornberry, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, 22: 299-306, 1997.

Nicolaou, K. C., Winssinger, N., Pastor, J., Ninkovic, S., Sarabia, F., He, Y., Vourloumis, D., Yang, Z., Li, T., Giannakakou, P., Hamel E. Synthesis of epothilones A and B in solid and solution phase. **Nature**, 387: 238-239, 1997.

[O'brien, J.](#), [Wilson, I.](#), [Orton, T.](#), [Pognan, F.](#) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, 267: 5421-5426, 2000.

O'Brien, P.J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, 80: 1-41, 1991.

Okada, H., Mak, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature reviews**, 4: 592-603, 2004.

Öllinger, K., Kågedal, K. Induction of Apoptosis by Redox-Cycling Quinones **Subcellular Biochemistry**, 36: 151-170, 2002.

Opalka, B., Dickopp, A., Kirch, H.C. Apoptotic genes in cancer therapy. **Cells Tissues Organs**, 172: 126-132, 2002.

Ormrod, D., Spencer, C. M. Topotecan: A Review of its Efficacy in Small Cell Lung. **Cancer Drugs**, 58: 533-551, 1999.

Ortholand, J.Y., Ganesan, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Current Opinion in Chemical Biology**, 8: 271-280, 2004.

Ozben, T. Oxidative Stress and Apoptosis: Impact on Cancer Therapy. **Journal of pharmaceutical sciences**, Review, 1-16, 2007.

Passos, G. F., Fernandes, E. S., Cunha, F. M., Ferreira, J., Pianowski, L. F., Camposa, M. M., Calixto, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, 110: 323-333, 2007.

Paterno, E. Ricerche Sull Acido Lapacico. **Gazzetta Chimica Italiana**, 12: 337-392, 1882.

Pazdur, R., Kudelka, A. P., Kavenagh, J. J., Cohen, P. R., Raber, M. N. The taxoides: paclitaxel (taxol) e docetaxel (taxotere). **Cancer Treatment Reviews**, 19: 351-386, 1993.

Pinto, A. C., Silva, D. H. S., Bolzani, V. S., Lopes, N. P., Epifanio, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, 25: 45-61, 2002.

Pithon-Curi, T. C., Schumacher, R. I., Freitas, J. J. S., Lagranha, C. Newsholme, P. Palanch, A. C., Doi, S. Q., Curi, R. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. **The American Journal of Physiology - Cell Physiology**, 53: 1355-1361, 2003.

Planchon, S.M., Wuerzberger, S., Frydman, B., Witiak, D.T., Hutson, P., Church, D.R., Wilding, G., Boothman, D.A. β -Lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: a p53-independent response. **Cancer Research**, 55: 3706-3711, 1995.

Podwysotszki, V. Pharmakologische Studien über Podophyllum peltatum. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol**, 13: 29-52, 1880.

Rabenhorst, S. H., Burini, R. C., Schmitt, F. C. L. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Revista Brasileira Cancerologia**, 40:141-147, 1994.

Ramanathan, M. Flow cytometry application in pharmacodynamics and drug delivery. **Pharmaceutical Research**, 14: 1106-1114, 1997.

Raza, A., Bokhari, J., Yousu, N., Medhi, A., Mazewski, C., Khan, S., Baker, V. Lampkin, B. Cell cycle kinetic studies in human cancers. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, 115: 873-879, 1991.

Renschler, M.F. The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy. **European Journal of Cancer**, 40: 1934-1940, 2004.

Ringel, I., Hortwitz, S. B. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. J. **National Cancer Institute**, 83: 288-291, 1991.

Rodriguez, C.E., Shinyashiki, M., Froines, J., Yu, R.C., Fukuto, J.M., Cho, A. K. An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. **Toxicology**, 201: 185-196, 2004.

Rudin, C.M., Yang, Z., Schumaker, L.M., VanderWeele, D. J., Newkirk, K., Egorin, M. J., Zuhowski, E. G., Cullen, K. J. Inhibition of glutathione synthesis reverses Bcl-2-mediated cisplatin resistance. **Cancer Research**, 63: 312-318, 2003.

Saito, M. L., Oliveira, F. Morfodiagnose e identificação cromatográfica em camada delgada de chá de bugre - *Cordia ecalyculata* Vell. **Revista Brasileira de Farmácia** 67: 1-16, 1986.

Salvesen, G.C., Dixit, V.M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, 91: 443-446, 1997.

Samali, A., Nordgren, H., Zhivotovsky, B., Peterson, E., Orrenius, S. A Comparative Study of Apoptosis and Necrosis in HepG2 Cells: Oxidant-Induced Caspase Inactivation Leads to Necrosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 255: 6-11, 1999.

Santana, C.F., Lins, L.J.P., Asfora, J.J., Melo, A.M., Lima, O.G. Albuquerque, I.L. Primeiras observações com emprego do Lapachol em pacientes humanos portadores de neoplasias malignas. **Revista do Instituto de Antibióticos de Recife**, 20: 61-68, 1980.

Schacter, L. Etoposide phosphate: what, why, where, and how? **Seminars in Oncology**, 23: 1-7, 1996.

Schiff, P. B., Fant J., Horwitz, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**, 277: 665-667, 1979.

Schwartzmann, G., Ratain, M.J., Cragg, G.M., Wong, J.E., Saijo, N., Parkinson, D.R., Fujiwara, Y., Pazdur, R., Newman, D.J., Dagher, R., Di Leone, I. Anticancer drug discovery and development throughout the world. **Journal of Clinical Oncology**, 15: 47-59, 2002.

Shiah, S. G., Chuang, S. E., Chau, Y. P., Shen, S. C., Kuo, M. L. Activation of c-Jun NH₂-terminal Kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor beta-lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway. **Cancer Research**, 59: 391-398, 1999.

Simon, A. R., Rai, U., Fanburg, B. L., Cochran, B. H. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. **American Journal of Physiology**, 275: 1640-1652, 1998.

Slee, E.A., Adrain, C. Martin, S. J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, 6: 1067-1074, 1999.

Souza, G.C., Haas, A.P.S., Von Poser, G.L., Schapoval, E.E.S., Elisabetsky, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 90: 135-143, 2004.

Srinivas, P., Gopinath, G., Banerji, A., Dinakar, A., Srinivas, G. Plumbagin induces reactive oxygen species, which mediate apoptosis in human cervical cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, 40: 201-211, 2004.

Srivastava, V., Negi, J.K., Gupta, M., Khanuja, S.P.S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 13: 5892-5908, 2005.

Story, M., Kodym, R. Signal transduction during apoptosis; implications for cancer therapy. **Frontiers in Bioscience**, 23: 365-375, 1998.

Subrahmanyam, D., Renuka, B., Rao, C. B., Sagar, P. S., Deevi, D. S., Babu, J. M., Vyas, K. Novel D-ring analogues of podophyllotoxin as potent anti-cancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 8: 1391-1396, 1998.

Tandon, V. K., Chhor, R. B., Singh, R. V., Rai, S., Yadav, D. B. Design, synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antifungal and anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 14: 1079-1083, 2004.

Taroda, N. Taxonomic studies on Brazilian species of *Cordia* L. (Boraginaceae). Ph.D. Thesis, University of Saint Andrews, Endburgh, 231 p, 1984.

Taroda, N., Gibbs, P. E. Studies on the genus *Cordia* L. (Boraginaceae) in Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, 9: 31-40, 1986.

Taroda, N.; Gibbis, P. Studies on the genus *Cordia* L. (Boraginaceae) in Brazil. 2. An outline taxonomic Revision of Subgenus MYXA TARODA. **Hoehnea**, 14: 31-52, 1987.

Thannickal, V.J., Fanburg, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology. Lung Cell Molecular Physiology**, 279: 1005–1028, 2000.

Thiagarajan, P., Tait, J.F. Binding of Annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. **Journal of Biological Chemistry**, 265: 17420-17423, 1990.

Thornberry N.A., Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. **Science**, 281: 1312-1316, 1998.

Tinari, A., Giammarioli, A.M., Manganelli, V., Ciarlo, L., Malorni, W. Analyzing Morphological and Ultrastructural Features in Cell Death. In: **Methods in Enzymology. Programmed Cell Death, General Principles for Studying Cell Death** (Part A) Ed by Khosravi-Far, R., Zakeri, Z., Lockshin, R. A., Piacentini, M. v. 442; p. 2-5, 2008.

Tiwari, R. D., Srivastava, K. C., Shulk, S., Bajpai, R. K. Chemical examination of the fixed oil from seeds of *Cordia myxa*. **Planta Medica**, 15: 240-243, 1967.

Ushio-Fukai, M., Nakamura, Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. **Cancer Letter**, 266: 37-52, 2008.

Utsugi, T., Shibata, J., Sugimoto, Y., Aoyagi, K., Wierzba, K., Kobunani, T., Terada, T., Oh-hara, T., Tsuruo, T., Yamada, Y. Antitumor Activity of a Novel Podophyllotoxin Derivative (TOP-53) against Lung Cancer and Lung Metastatic Cancer. **Cancer Research**, 56: 2809-2814, 1996.

Van Cruchten, S., Van den Broeck, W. Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, 31: 214-223, 2002.

Vandivier, R.W., Fadok, V.A., Hoffmann, P.R., Bratton, D.L., Penvari, C., Brown, K.K., Brain, J.D., Accurso, F.J., Henson, P.M. Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. **The Journal Of Clinical Investigation**, 109: 661-670, 2002.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, 184: 39-51, 1995.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, 36: 131-149, 2003.

Walker, N.P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferenza, Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., Hammill, L. D., Herzog, L., Hugunin, M., Houy, W., Mankovich, J. A., McGuinness, L., Orlewicz, E., Paskind, M., Pratt, Reis, C. A., Summani, P., Terranova, A., Welch, M., Xiong, J. P., Möller, L., Tracey, A., Kamen, D. E., Wong, R., W. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. **Cell**, 78: 343-352, 1994.

Wang, J., Yi, J. Cancer cell killing via ROS To increase or decrease, that is the question. Review, **Cancer Biology & Therapy**, 7: 1875-1884, 2008.

Wang, Z. B., Liu, Y. Q., Cui, Y. F. Pathways to caspase activation. **Cell Biology International**, 29: 489-496, 2005.

Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., McPhail, A.T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, , 93: 2325-2327, 1971.

Weller, M., Winter, S., Schmidt, C., Esser, P., Fontana, A., Dichgans, J., Groscurth, P. Topoisomerase-I inhibitors for human malignant glioma: differential modulation of p53, p21, bax and bcl-2 expression and CD95-mediated apoptosis by camptothecin and β -lapachone. **International Journal of Cancer**, 73: 707-714, 1997.

WHO, Bulletin of the World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicine. Disponível em: <http://www.who.int/en/>

Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cell & Molecular Biology**, 68: 251-306, 1980.

Yin, X.M., Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-R1 death receptors in hepatocytes. **Journal of Molecular Medicine**, 78: 203-211, 2000.

Yu, R., Mandlekar, S., Harvey, K.J., Ucker, D.S., Kong, A.N. Chemopreventive isothiocyanates induce apoptosis and caspase-3-like protease activity. **Cancer Research**, 58: 402-408, 1998.

Zimmermann, K. C., Bonzon, C., Green, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, 92: 57-70, 2001.

Zong, W. X., Thompson, C. B. Necrotic death as a cell fate. Review, **Genes & Development**, 20: 1-15, 2006.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. **Journal of Biological Chemistry**, 274: 11549-11556, 1999.

Zuco, V., Supino, R., Righetti, S. C., Cleris, L., Marchesi, E., Passerine-Gambacorti, C., Formelli, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Letter**, 175: 17-25, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)