



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA DO LAPACHOL E β -LAPACHONA
E ANTICARCINOGENÉTICA DO LAPACHOL, EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE
*Drosophila melanogaster***

Aluno: Wender Ferreira Costa

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

UBERLÂNDIA - MG
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA DO LAPACHOL E β -LAPACHONA
E ANTICARCINOGENÉTICA DO LAPACHOL, EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE
*Drosophila melanogaster***

Aluno: Wender Ferreira Costa

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte
dos requisitos para obtenção do
Título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área de
concentração: Genética).**

**UBERLÂNDIA - MG
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- C837a Costa, Wender Ferreira, 1976-
Avaliação da atividade genotóxica do lapachol e β -lapachona e anticarcinogênica do lapachol, em células somáticas de *Drosophila melanogaster* [manuscrito] / Wender Ferreira Costa. - 2010.
94 f. : il.
Orientador: Júlio César Nepomuceno.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Epitélio - Câncer - Teses. 2. Epitélio – Câncer – Tratamento – Teses. 3. *Drosophila melanogaster* - Teses. 4. Lapachol – Teses. I. Nepomuceno, Júlio César. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 616.591-006.6

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU/ Setor de Catalogação e Classificação

Palavras chaves: lapachol, β -lapachona, *Drosophila melanogaster*, SMART, *wts*, Doxorubicina

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA DO LAPACHOL E β -LAPACHONA
E ANTICARCINOGENÉTICA DO LAPACHOL, EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE
*Drosophila melanogaster***

ALUNO: Wender Ferreira Costa

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira – UFU

Prof^a Dr^a Lee Chen Chen – UFG

Prof^a Dr^a Lusânia Maria Gregg Antunes – USP

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó - UFU

Data da Defesa: 30/4 /2010

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

À minha filha, **Sara Ferreira Carvalho**,
minha eterna paixão.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

**À minha esposa Luciene Pereira de Carvalho,
Meu pai, Joaquim Teodoro Costa,
Minha mãe, Neuza Aparecida Ferreira Costa,
Meu irmão, Marcelo Ferreira Costa,
Minha afilhada, Lorena Nunes Ferreira,
Minha Tia e madrinha, Sonea Maria Ferreira Cruz,
Meu Tio e padrinho Armando Parreira de Oliveira,
Estas são pessoas sem as quais eu não teria a mínima condição de
realizar este trabalho e, principalmente, porque possuem um caráter
inigualável.**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço especialmente os membros componentes da banca examinadora desta tese de doutorado:

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Prof. Dr. Julio César Nepomuceno

Profa. Dra. Lee Chen Chen

Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Agradeço também aos membros suplentes da banca examinadora da tese de doutorado:

Profa. Dra. Rute Magalhães de Brito

Profa. Dra. Sandra Morelli

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno**, pela paciência, amizade e principalmente pelo compromisso da aprendizagem contínua.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade na leitura e sugestões neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Ulrich Graf** do Instituto de Toxicologia-Universidade de Zurich, Schwerzenbach, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*.

Ao **Prof. Dr. Mário Antônio Spanó**, pelo carisma e incentivo durante a realização do trabalho.

À **Prof^a D^{ra}. Alaíde Braga de Oliveira**, Professora Emérita da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela colaboração e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório da Universidade Federal de Uberlândia, desde o nível de graduação, mestrado e doutorado, pela colaboração.

Aos colegas do laboratório de Citogenética e Mutagênese do UNIPAM (Centro Universitário de Patos de Minas), pelo constante apoio e colaboração no trabalho.

APOIO FINANCEIRO

O trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia – MG e no Laboratório de Citogenética e Mutagênese da UNIPAM do Centro Universitário de Patos de Minas – Patos de Minas - MG.

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–CAPES.

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico–CNPq.

- Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

- Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM.

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais–FAPEMIG.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMP** – Adenosina monofosfato
ATP – Adenosina trifosfato
BH – Heterozigoto balanceado
CAS – Chemical Abstract Service
Cenargen - Centro nacional de recursos genéticos
CDK – Kinase dependente de ciclina
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DDT - *para-diclorodifeniltricloroetano*
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DXR – Doxorrubicina
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias
EUA – Estados Unidos da América
flr – *Flare*
G₁/S – Gap₁/Síntese
Gr – Grama
GTP – Guanosina trifosfato
HB – *High Bioactivation Cross*
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
LAP – Lapachol
MH – Marcador trans-heterozigoto
mL – Micro litro
mM – Milimolar
mwh – *multiple wing hairs*
NCI – Instituto nacional do cancer
NAD(P) – Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato
NQO1 - Naftoquinona oxidoreductase 1
NO – Óxido nítrico
O₂ – Oxigênio
OH – Radical Hidroxila

ORR – *Oregon R (R)*

PKA – Proteína quinase-A

RNA – Ácido Ribonucléico

SER - Serina

SMART – *Somatic Mutation And Recombination Test*

ST – Standard Cross

THR - Treonina

TM3 Bd^s – *Third Multiple3 Beaded Serrate*

TYR - Tirosina

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

wts - *warts*

LISTA DE FIGURAS

| Capítulo 1 | Página |
|---|---------------|
| Figura 1. Lapachol (a), α -lapachona (b) e β -lapachona (c) | 10 |
| Figura 2. Fórmula estrutural do quimioterápico Doxorubicina | 16 |
| Figura 3. A ₁ - Pêlos normais; A ₂ - Pêlos <i>multiple wing hairs</i> ; B - Pêlos <i>flare</i> | 18 |
| Figura 4. (A) Fenótipo das asas dos descendentes trans-heterozigotos (<i>mwh + / + flr³</i>); (B) Fenótipo das asas dos descendentes heterozigotos balanceados (<i>mwh + / + TM3, Bd^f</i>) | 19 |
| Figura 5. Esquemas genéticos que apresentam as possibilidades de aparecimento de pêlos mutantes | 20 e 21 |
| Figura 6. Segregação cromossômica apresentando a possibilidade de aparecimento de pêlo stubble | 23 |
| Figura 7 : Tumores epiteliais da linhagem wts no tórax e asa | 24 |
| Capítulo 2 | |
| Figure 1. Chemical estruturas of LAP (A) and DXR (B) | 48 |
| Figure 2. Tumours <i>wts</i> (arrows) find in severals parts of the body of <i>Drosophila</i> . (A) Tumour in wing. (B) Tumour in body. (C) Tumour in leg. (D) Tumour in head. | 48 |
| Figure 3. Frequency of the tumour after chronic treatment with different concentrations of lapachol associated with DXR (0.125 mg/mL), according by with body region of <i>Drosophila</i> | 49 |
| Capítulo 3 | |
| Figure 1. Chemical structures of LAP and DXR | 73 |
| Capítulo 4 | |
| Figura 1. Estrutura química da β -LAP e DXR | 88 |
| Figura 2. Distribuição do tamanho de manchas nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento padrão (ST) | 89 |

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Table I. Summary of results in warts of progeny *wts* in heterozygote descendents (*wts/+*) of *Drosophila melanogaster*, after treatment with Lapachol (LAP) and co-treatment with Lapachol (LAP) and doxorubicin..... 47

Capítulo 3

Table I - Summary of results in the *Drosophila* SMART assay after treatment with Lapachol (LAP). Larvae from Standard (ST) Cross and High Bioactivation (HB) Cross. 71

Capítulo 4

Tabela I – Resultados do teste SMART empregando como organismo teste *Drosophila melanogaster* depois de tratadas com β -Lapachona (β - LAP). Descendentes trans-heterozigotos (MH) do cruzamento padrão (ST) e cruzamento de alta bioativação metabólica (HB)..... 85

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------|-----------|
| APRESENTAÇÃO | 1 |
| 1 CAPÍTULO 1..... | 5 |
| 1. Fundamentação Teórica | 6 |
| 2. Referências Bibliográficas..... | 26 |
| CAPÍTULO 2..... | 33 |
| Introduction | 36 |
| Materials and Methods..... | 39 |
| Results and Discussion..... | 41 |
| References..... | 50 |
| CAPÍTULO 3..... | 54 |
| Abstract..... | 56 |
| References..... | 66 |
| CAPÍTULO 4..... | 74 |
| Resumo..... | 76 |
| Introdução | 77 |
| Material e Métodos..... | 79 |
| Resultados e Discussões..... | 82 |
| Referencias bibliográficas | 90 |

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

O Brasil é um país que possui dimensões continentais e, devido ao seu tamanho, encontramos vários biomas na sua constituição territorial. Dentre os vários biomas que o país possui o cerrado merece especial atenção, principalmente, pelo fato de ter sido negligenciado e, em conseqüência disso, passou por um expressivo processo de devastação. Porém, atualmente os cientistas têm voltado sua atenção para as grandes quantidades de espécies vegetais que possui e algumas delas têm-se destacado pelo seu potencial no desenvolvimento de quimioterápicos.

Devido à grande quantidade de espécies vegetais, a população humana de uma maneira geral, utiliza-se de algumas delas para a elaboração de infusões e até mesmo em sua alimentação. As infusões, geralmente, são elaboradas através do conhecimento popular e, em sua maioria, sem nenhuma comprovação científica. Através do conhecimento popular, que retira da flora local o seu material de estudo, alguns cientistas voltaram sua atenção para a análise de plantas que potencialmente podem apresentar substâncias com possíveis efeitos benéficos ao tratamento de inúmeras doenças.

Mediante esse quadro, no final do século XIX alguns cientistas voltaram a sua atenção para uma determinada espécie de planta, o ipê. Através dessa planta conseguiu-se isolar uma substância química conhecida pelo nome de lapachol. Como era uma substância nova, vários testes foram realizados no sentido de tentar atribuir alguma função que pudesse auxiliar o ser humano no tratamento de doenças. Com isso, testou a possibilidade dessa substância atuar como antiparasitário, antiinflamatório, antiviral e, até mesmo, no combate ao câncer. Num primeiro momento o lapachol mostrou-se como uma substância com um potencial anticarcinogênico muito interessante. Porém, com o desenrolar dos estudos, especificamente na década de setenta do século XX, o Instituto Nacional do Câncer norte americano (NCI) concluiu que para a sua ação antitumoral seria necessária uma alta dosagem, porém nessa concentração a substância tornava-se muito tóxica.

Felizmente, apesar de o lapachol ter-se demonstrado como uma substância que não valeria investimentos científicos para o desenvolvimento de um agente antitumoral, descobriu-se um isômero do lapachol conhecido com β -

lapachona. Essa última substância tem atraído uma expressiva atenção do mundo científico e com possibilidades de se tornar um agente anticarcinogênico, principalmente pela sua menor toxicidade, quando comparado com o lapachol, assim como pelo seu mecanismo de ação. Um dos mecanismos de ação da β -lapachona que tem sido extensivamente explorado seria a sua atuação na DNA topoisomerase.

Dentro do universo de quimioterápicos atualmente utilizados temos a doxorubicina. Essa substância tem como mecanismo de ação, a geração de peroxidação lipídica e essa geração causa os mais variados graus de danos na célula. Esses danos, em sua maioria irreparáveis, inviabilizam o processo de divisão celular levando à morte celular.

Existem diversos bioensaios que utilizam os mais variados organismos, por exemplo, o teste cometa que utiliza-se de células, o de Ames que utiliza-se de bactérias e SMART que utiliza-se de *Drosophila melanogaster*, etc. A utilização de *Drosophila melanogaster* é bastante interessante, pois além de outros testes já estabelecidos, esse organismo teste possui um ciclo de vida curto, além de ser de fácil manutenção e baixo custo. As possibilidades de análise nas alterações no DNA também são diversas e, com isso, podemos detectar mutações, recombinações e tumores epiteliais presentes pelo corpo do animal.

Diante das vantagens conferidas, utilizou-se, como organismo teste desse trabalho, a *Drosophila melanogaster*. Para a sua realização utilizou-se o teste SMART o qual detecta mutações e recombinações somáticas nos pêlos das asas do animal e outra linhagem a qual detecta tumores epiteliais (*warts*) nas asas, abdome, cabeça, olhos, patas, enfim ao longo do corpo.

O trabalho teve como objetivos a verificação da atividade genotóxica e/ou anticarcinogênica do lapachol, mesmo tendo alguns estudos que mostravam não ser uma substância com interesse farmacológico interessante não havia estudos demonstrando os objetivos acima descritos. Em relação à β -lapachona analisou-se a possível ação mutagênica e/ou antimutagênica quando associado à doxorubicina.

Assim, a tese é composta por quatro capítulos distribuídos da seguinte forma:

Capítulo 1 – Fundamentação teórica - Apresenta uma revisão sobre o lapachol e a β -lapachona, além de uma breve discussão sobre a ação da doxorubicina. Também serão apresentados os princípios básicos do teste SMART e dos tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*.

Capítulo 2 – Artigo sob o título “Lapachol as an epithelial tumor inhibitor agent in *Drosophila melanogaster* heterozygote as a tumor suppressor gene *wts*” a ser submetido para publicação na revista científica Oncology Reports.

Capítulo 3 – Artigo sob o título “Genotoxicity of lapachol evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*” submetido para publicação na revista científica *Genetics and Molecular Biology*.

Capítulo 4 – Artigo sob o título “Efeitos antígenotóxicos da beta-lapachona associado a doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*” a ser submetido para publicação na revista científica Food and Chemical Toxicology.

CAPÍTULO 1

Fundamentação Teórica

1. Fundamentação Teórica

Caracterização da vegetação

Aproximadamente dois terços da diversidade biológica do mundo são encontrados nas regiões intertropicais, principalmente nos países em desenvolvimento. O Brasil é considerado um dos países com a maior biodiversidade do planeta, com aproximadamente 55.000 espécies nativas distribuídas ao longo dos seis maiores biomas: Amazônico, Cerrado, Caatinga, Mata atlântica, Pantanal e Floresta subtropical (Vieira, 1999).

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, onde há um extrato herbáceo convivendo com um extrato arbóreo, com uma grande quantidade e variedade de plantas. O Cerrado cobre uma área de aproximadamente 25% do território brasileiro, e cerca de 220 espécies deste bioma são usadas como fonte na medicina tradicional (Vieira & Martins, 1998). Em 1994, o jardim botânico de Brasília e a Embrapa/Cenargen estabeleceram um convênio para estudar coleções de plantas do Cerrado com potencial farmacológico (Vieira, 1999).

Dentre as várias espécies de plantas do bioma cerrado podem-se encontrar o ipê roxo e/ou ipê amarelo. As várias espécies de “ipês” (cerca de 50 espécies) são bastante exploradas como madeiras, atendendo a interesses comerciais. Porém, as espécies de “ipês” são ricas em naftoquinonas, substâncias que possuem um potencial interessante farmacológico e, com isso, ao longo das últimas décadas, tem suscitado o interesse dos cientistas no sentido de encontrar uma real aplicação terapêutica para o ser humano (Vieira & Martins, 1998). Entre as naftoquinonas que têm despertado interesse farmacológico, podemos citar o lapachol, a beta-lapachona e o alfa-lapachol.

Naftoquinonas

O câncer tem sido a segunda causa de morte no mundo desenvolvido, ficando atrás, apenas, das doenças cardíacas. Alguns programas de produtos naturais, conduzidos pelo Instituto Nacional do Câncer norte americano (NCI) têm identificado as quinonas como um importante elemento farmacológico com atividade citotóxica (Wei *et al.*, 2009).

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural (Thomson, 1997). Nos últimos anos intensificou-se o interesse por essas substâncias, não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em vários estudos farmacológicos. Na natureza, estão envolvidas em etapas importantes do ciclo de vida de seres vivos, principalmente nos níveis da cadeia respiratória e da fotossíntese, como, por exemplo, as ubiquinonas e as plastoquinonas. As naftoquinonas, por exemplo, as vitaminas do tipo K, de irrestrita necessidade para os seres vivos, possuem ação controladora da coagulação sanguínea (Goodwin & Mercer, 1972; Thomson, 1997).

De um modo geral, as quinonas naturais mais representativas são de vital importância para vegetais superiores, artrópodes, fungos, líquens, bactérias, algas e vírus. A distribuição dessas substâncias nos variados organismos implica, possivelmente, em funções biológicas múltiplas, agindo de forma conspícua em seus diversos ciclos bioquímicos (Silva *et al.*, 2003).

Já é conhecido que as quinonas levam à redução dos níveis fisiológicos da NAD(P)H e à despolarização da membrana mitocondrial e reagem com o DNA, levando à depurinação, através da formação de aductos, no DNA. Esta transformação tem comprovado a relevância na toxicidade de alguns hormônios e esteróides que são metabolizados a orto-quinonas. Esta síntese é bastante promissora para o desenvolvimento de para-quinonas e seus derivados que possuem uma baixa toxicidade em organismos biológicos (Silva *et al.*, 2009).

Desde os estudos pioneiros de Wendel em 1946, demonstrou-se que certas naftoquinonas possuíam efeitos biológicos (Hussain *et al.*, 2007). Em estudos farmacológicos, as quinonas mostraram as mais variadas biodinamicidades, destacando-se, dentre muitas, as propriedades microbicidas, triponossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, processos nos quais atuam de diferentes formas. Como exemplo, destaca-se o estresse oxidativo que provocam, ao induzirem a formação deletéria endógena de espécies bioativas derivadas do oxigênio (O_2 , $\cdot OH$, $O_2\cdot$ e H_2O_2), como ocorre no *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas (Matés & Sanchez-Jiménez, 2000). Outra atividade marcante dessas substâncias, descoberta um tanto recentemente, é a inibição do complexo das topoisomerasas,

ação que provoca o desencadeamento da apoptose celular, morte celular programada (Hussain *et al.*, 2007). A interferência das quinonas na apoptose constitui-se, hoje, em pesquisa interdisciplinar de fronteira na química medicinal, havendo grande expectativa quanto à delineação de estratégias racionais visando o combate de neoplasias, principalmente relacionadas ao câncer de próstata (Silva *et al.*, 2003).

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 quinonoídica: benzoquinonas – um anel benzênico; naftoquinonas – um anel naftalênico; antraquinonas – um anel antracênico linear ou angular (Silva *et al.*, 2003).

Numa observação mais apurada sobre a importância das quinonas, especialmente de benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas, pode-se citar o grande número de drogas neste grupo que possuem aplicações práticas reconhecidas. Algumas, inclusive, chegaram à produção industrial, como, por exemplo, as vitaminas K, as mitomicinas e as antraciclina (Ruttimann, 1986). Sob o ponto de vista estrutural, em grande parte destacam-se nestas substâncias anéis redox acoplados a diversos sistemas heterocíclicos, normalmente nas posições 2,3 ou 3,4 do sistema naftalênico. Esses anéis heterocíclicos podem ser dos tipos furânicos, pirânico, pirrólico, etc. indicando sua importância na expressão da bioatividade (Silva *et al.*, 2003).

Atualmente, há um grande interesse pelo conhecimento da farmacologia e do modo de atuação destas substâncias, como pode ser demonstrado pelo número crescente de publicações sobre o mecanismo de atuação da beta-lapachona. O progresso quanto aos conhecimentos da bioquímica das atividades enzimáticas, além dos recentes avanços da química computacional, em muito pode contribuir para o esclarecimento em maior profundidade dos mecanismos de atividade de fármacos e, em consequência, para o planejamento de novas drogas comerciais. O contexto de previsibilidade, que estes estudos trazem, auxilia na busca de agentes antineoplásicos baseados em planejamentos racionais, resultando na obtenção de substâncias com maior seletividade e eficiência antineoplásica (Montanari & Bolzani, 2001).

Lapachol

Dentre as naftoquinonas, tem-se o lapachol que foi isolado primeiramente por Paterno na espécie *Tabebuia avellanedae* em 1882 (Hussain *et al.*, 2007). *Tabebuia avellanedae* é uma árvore da família Bigoniaceae. No Brasil é comumente conhecida como “pau d’arco”. Na medicina popular, a sua casca é utilizada no combate a dores; como anti-inflamatório, antineoplásico, e até mesmo anti-diurético. As atividades anti-inflamatórias, antimicrobiana e antineoplásicas são citadas na literatura, e são reforçadas pela presença de saponinas, flavonóides, cumarinas e outras substâncias naturais, tais como os derivados do lapachol extraídos da planta *in natura* (Miranda *et al.*, 2001).

O lapachol é um produto natural extraído da árvore *Tabebuia avellanedae* e de outras plantas tropicais. Esta substância está presente em árvores tropicais da Argentina, Paraguai, Brasil e outros países da América do Sul. O chá extraído da *Tabebuia sp.*, que contém o lapachol, tem sido usado na medicina popular no combate a várias doenças na América do Sul, desde o período do império Inca (Caruso *et al.*, 2009).

Através de estudos realizados ao longo da década de 1960, demonstrou-se que o lapachol possuía uma atividade altamente significativa em tumores de camundongos. Posteriormente, em 1971, o NCI noticiou que possuía, em estágio de teste clínico, fase – I, pacientes que utilizavam o lapachol terapeuticamente; porém, este apresentou expressivos efeitos colaterais, e a sua pesquisa como um possível quimioterápico no combate ao câncer foi abandonado (Block *et al.*, 1974). Em um pequeno estudo de 1980, com nove pacientes que possuíam vários tipos de tumores (fígado, rim, mama, próstata e colo uterino), com o lapachol puro demonstrou-se uma habilidade para diminuição dos tumores, assim como da dor sentida pelos pacientes, e conseguiu-se a completa destruição dos tumores em três destes (Hussain *et al.*, 2007). Acredita-se que a atividade antitumoral do lapachol pode ser devido à sua interação com os ácidos nucléicos. Também tem sido proposto que a interação desta naftoquinona com a dupla hélice de DNA ocorre de tal maneira impedindo que haja a duplicação do DNA, assim como a transcrição do RNA (Murray & Pizzorno, 1998).

Balassiano *et al.* (2005) analisou os efeitos do lapachol em uma linhagem de células humanas, e avaliou o potencial daquela substância como uma droga

anti-metastática. Os resultados deste estudo indicaram que o lapachol, na concentração não tóxica de células tumorais HeLa de 400 µg/ml (correspondendo a 10^{12} de moléculas de droga/célula), mostrou alterações em um perfil de proteína e inibiu a invasividade celular, e isto representou uma importante atividade anti-metastática.

Um número limitado de derivados sintéticos e semissintéticos de grupos funcionais do lapachol já foram obtidos, porém não há modificações estruturais suficientemente adequadas para o desenvolvimento de fármacos. Os dois primeiros análogos naturais do lapachol (Figura 1a) a serem isolados foram a β-lapachona (Figura 1b) e a α-lapachona (Figura 1c) que estão presentes na *Tabebuia avellanae*, junto com o lapachol. A α e β-lapachona foram sintetizadas do lapachol usando a técnica ácida desenvolvida por Hooker (Hussain *et al.*, 2007).

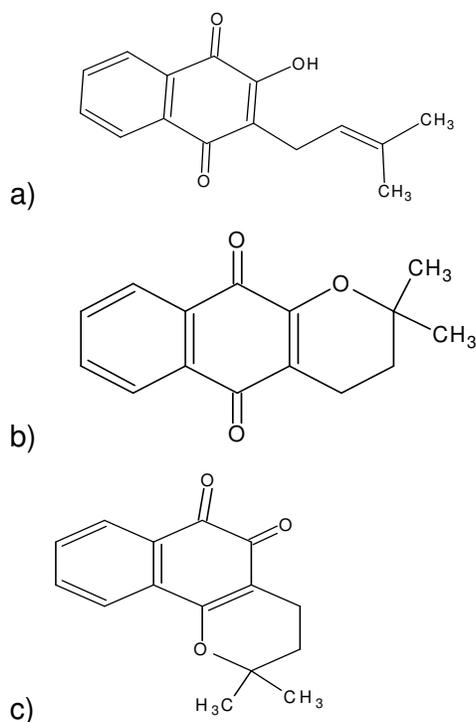


Figura 1: lapachol (a), α-lapachona (b) e β-lapachona (c) (Castellanos *et al.*, 2009).

As lapachonas são componentes minoritários nas plantas; portanto elas não estão prontamente disponíveis em grandes quantidades nos recursos naturais. A necessidade para uma grande quantidade de substâncias com

ocorrência natural e seus análogos demandará novos e convenientes métodos de síntese artificial (Wei *et al.*, 2009).

Os estudos iniciados na década de 1960, com o efeito terapêutico do lapachol, e as conclusões do instituto nacional do câncer dos EUA, em 1974, os quais concluíram que para a efetiva dose terapêutica deveria ser administrada uma alta dosagem da droga, o que a tornava bastante tóxica para o organismo humano. O lapachol, em especial, logo teve abandonada sua potencialidade no desenvolvimento de fármacos com potencial anticarcinogênico. No entanto, nenhuns destes estudos consideraram os efeitos do lapachol a nível molecular. Esta informação forma a base de desenvolvimento da síntese de novos e análogos do lapachol que podem ser usados em futuros desenvolvimentos desta molécula com potente potencial biológico (Hussain *et al.*, 2007).

De acordo com Miyoshi *et al.* (2005), o fator de transcrição ligado ao zinco reprime a ação da caderina-E e induz a expressão das metaloproteínas, que causa a invasão vascular e metástase intra-hepática em carcinomas primário hepatocelular. A ativação da expressão do gene da caderina-E resulta em retardo de crescimento em linhagens de células tumorais. Vários estudos de imunohistoquímica têm demonstrado que há uma forte correlação entre a diminuição de caderina-E e o início da progressão tumoral. A expressão a caderina-E está, muitas vezes, diminuída ou ausente em vários tumores epiteliais, incluindo o câncer gástrico e o de mama (Zhang *et al.*, 2005). Alguns estudos relatam que alça no DNA inibe um gene alvo, como, por exemplo, a caderina-E que forma uma junção rígida pela formação de um looping por meio de feedback negativo (Grotegut *et al.*, 2006). Culturas de células de hepatocarcinoma, quando tratadas com a β -lapachona, interferem na ação da alça de transcrição no DNA e expressão da caderina-E (Kim *et al.*, 2007).

β -lapachona

A β -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona) é uma quinona derivada do lapachol, com ocorrência na América do Sul e Central. A síntese química da β -lapachona e os compostos relacionados foram inicialmente investigados no final do século XIX e início do século XX pelo químico Samuel Hooker. Embora alguns estudos clínicos sobre a bioatividade da naftoquinonas

foram reportados na década de 1940, apenas em 1977, com os trabalhos de Docampo com a β -lapachona, revitalizaram-se os estudos e caracterização apenas deste composto natural (Hussain *et al.*, 2007).

A super helicoidização do DNA é um processo regulado com precisão e influencia a replicação, transcrição, a compactação do DNA, e fisicamente a separação das cromátides irmãs (McClendon & Osheroff, 2007). As topoisomerases são enzimas que modulam a estrutura física da dupla hélice de DNA. O interesse nestas enzimas tem aumentado nos últimos anos, dado o fato de serem alvos efetivos no desenvolvimento de drogas que combatem o câncer (Esteves-Souza *et al.*, 2007). Devido à sua importância, atualmente cerca de 50% dos protocolos terapêuticos utilizam, pelo menos, uma droga que atua diretamente na topoisomerase (Wilstermann & Osheroff, 2003).

Dois tipos de topoisomerases podem ser diferenciados devido às suas ações em nível molecular. A topoisomerase-I catalisa o relaxamento da superelocoidização positiva da fita simples, quebrando uma das fitas, enquanto a outra gira sobre si mesma. A DNA topoisomerase-II faz uma quebra transitória na dupla hélice de DNA, deixando a outra molécula passar através dela. A topoisomerase-I e a topo-II são enzimas que atuam relaxando a superelocoidização do DNA; com isso, elas são enzimas capazes de exercer efeitos na replicação das cromátides irmãs, levando a uma fiel segregação do material genético das células filhas durante o ciclo de divisão celular (Wang, 2009).

Estudos preliminares demonstraram que a β -lapachona pode atuar diretamente na topoisomerase e inibir a sua atividade, da qual resulta a sua citotoxicidade; no entanto, o modo de sua ação inibitória é bastante distinto daqueles outros típicos inibidores de topoisomerases, por exemplo, a camptotecina e seus compostos relacionados. A β -lapachona também exibe um número de ações farmacológicas, incluindo atividades anti-bacterianas, antifúngicas, anti-tripanosômica e citotóxica que estão ligadas à formação de espécies reativas de oxigênio (Lee *et al.*, 2005).

A neovascularização é um processo essencial no desenvolvimento de tumores, e um possível tratamento poderia ser o bloqueio do crescimento tumoral. Na angiogênese, o óxido nítrico (NO) é um importante fator que media o

crescimento endotelial vascular e a sua migração. A β -lapachona tem demonstrado possuir efeitos anti-carcinogênico e antiviral. Se a β -lapachona pode induzir à morte do endotélio ou se tem um efeito anti-angiogênico, isto ainda não está muito claro. Estudos recentes, *in vitro*, têm demonstrado que os efeitos da β -lapachona nas células endoteliais, incluindo a linhagem celular endotelial vascular humana, EAhy926, e células endoteliais vascular do cordão umbilical humano, ainda comportam evidências e, por conseguinte, comprovação. Demonstrou-se que o NO pode atenuar o efeito apoptótico da β -lapachona nas células endoteliais humanas e sugeriu-se que a β -lapachona pode, também, ter um potencial como uma droga anti-angiogênica (Kung *et al.*, 2007).

A β -lapachona é um agente anticâncer que induz seletivamente à morte celular em várias linhagens celulares de câncer humano; no entanto, o mecanismo preciso da citotoxicidade da β -lapachona não está totalmente entendido. O tratamento com a β -lapachona interrompe a progressão do ciclo celular na transição do G₁/S devido ao incremento da fosforilação da Rad53p, que é uma proteína no checkpoint da interfase, e isso diminui a sobrevivência celular (Menacho-Marquez & Murguia, 2006).

Em estudos de cultura de células tem-se demonstrado que há um amplo espectro de células de carcinoma humano que, em um meio de cultura, foram expostas com uma combinação de quimioterápicos que envolviam a β -lapachona e o taxol, ambos compostos com baixa concentração. Eles induziram sinergicamente à morte de células neoplásicas de ovário, mama, próstata, melanoma, pulmão, pâncreas e colo uterino. Esta combinação terapêutica tem uma potente atividade antitumoral contra as patologias de ovário e próstata em camundongos (Li *et al.*, 1999).

A citotoxicidade das quinonas leva à especulação de que há uma propriedade química intrínseca na unidade quinonoídica, associada com outros fatores estruturais, que são responsáveis pela intensidade das atividades antitumorais. Foi observado que muitas quinonas possuem um grupo na sua extremidade que pode ser ativado por redução das carbonilas quinonoídicas, gerando intermediários alquilantes, agentes antineoplásicos biorredutores (Lin *et al.*, 2001). Atualmente, há fortes evidências de que este mecanismo de ação é o

que mais se aproxima das ações farmacológicas das mitomicinas e antraciclina (Silva *et al.*, 2003).

Pelo fato de a β -lapachona apresentar potencial antineoplásico, alguns problemas são levantados, como a sua baixa solubilidade em água, instabilidade em soluções e grandes doses terapêuticas, logo, é necessário haver mudanças na tecnologia de pesquisas farmacêuticas. Diferentes abordagens para a formação de complexas inclusões de β -lapachona com ciclodextrinas tem sido testadas para solucionar o problema associado à baixa solubilidade ($0,003 \text{ mg.mL}^{-1}$) que poderiam, também, afetar a sua biodisponibilidade; no entanto, o uso de ciclodextrinas por administração via oral não tem tido um bom aproveitamento em estudos clínicos. Logo, pesquisas de design de partículas de β -lapachona para melhorar a sua taxa de dissolução têm atraído grande interesse do mundo científico (Cunha-Filho *et al.*, 2008).

A β -lapachona é uma substância para uso como agente antitumor e em vários tipos de câncer, e atua na manutenção de vários tipos de tecidos normais. Por outro lado, a β -lapachona poderia ser utilizada como uma pró-droga que seria convertida a β -lapachona no microambiente do tumor e, com isso, reduziria os seus efeitos nos tecidos normais (Marin *et al.*, 1997). Ademais, a β -lapachona serve como uma droga promissora no combate ao câncer, pelo fato de ter os seguintes efeitos:

- a) é bioativada pela NQO1 (naftoquinona oxidoredutase 1) através de reações de ciclo redox e os níveis de NQO1 estão elevados em numerosos tumores;
- b) morte no ciclo celular independente de caspases, pRb e p53;
- c) mata, sinergicamente, as células em combinação com quimioterápicos, assim como com radiações ionizantes.

Numa situação ideal, as pró-drogas de β -lapachona podem ser ativadas de maneira espontânea ou tumor-dependente de forma similar, ou até mesmo de uma forma mais potente do que a atividade da β -lapachona. A forma ativa de tais pró-drogas poderia matar as células com a NQO1-dependente, além de evitar que tecidos normais sejam acometidos (Reinicke *et al.*, 2005).

Doxorrubicina

A antraciclina doxorrubicina (DOX) é um excepcional agente antineoplásico, mas o seu uso é limitado pela formação de metabólitos que induzem toxicidades cardíacas crônicas e agudas. Essa droga é utilizada desde a década de 1960 no combate a tumores e inicialmente surgiu como uma poderosa e promissora droga na área médica oncológica, mas devido a sua intensa atividade tóxica a sua utilização tem sido empregada com certas ressalvas (Licata *et al.*, 2000).

O anel da antraciclina é lipofílico, mas a extremidade saturada do sistema de anéis contém grande quantidade de grupos hidroxilas, juntamente com aminoácidos associados a carboidratos, formando um centro hidrofílico. Devido a esta propriedade, a molécula é anfótera, apresentando características ácidas no grupo fenólico do anel e características básicas no grupo dos aminoaçúcares. Com isto sua passagem na membrana plasmática é facilitada e sua permanência no corpo é relativamente longa (Singal *et al.*, 2000). Além disso, apresenta um anel de quinona e de hidroquinona em anéis adjacentes, que lhe permite funcionar como aceptor e doador de elétrons. A importância principal é dada ao anel de quinona, porque é um potente gerador de radicais livres. A redução por um elétron deste anel leva a formação de radicais relativamente estáveis, chamados radicais livres de semiquinonas, ativados pela enzima mitocondrial, NADH desidrogenase (Myers, 1998).

Os radicais de quinona e semiquinonas são relativamente estáveis em condições anaeróbicas, mas sobre condições aeróbicas há desemparelhamento de elétrons, doando oxigênio, havendo a formação de radicais superóxidos e radicais hidroxilas. A redução de oxigênio para formação de superóxido é uma reação regenerativa, juntamente com a molécula de doxorrubicina. Isto gera uma seqüência de reações, formando um ciclo redox, que causa muitos danos às células expostas (Singal *et al.*, 2000; Wallace, 2003).

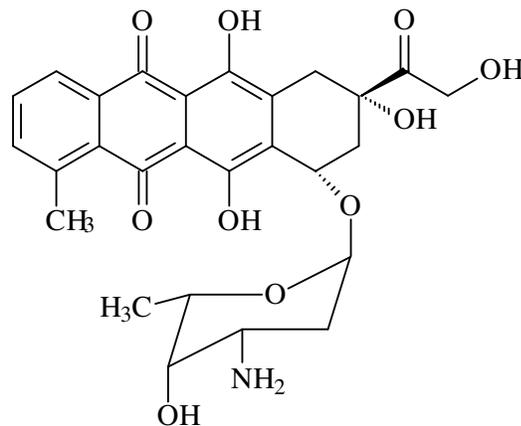
O mecanismo de ação antitumoral da doxorrubicina envolve a inibição da enzima topoisomerase II e RNA polimerases, relacionadas com a síntese de DNA e proliferação celular. A doxorrubicina se liga aos ácidos nucléicos pela intercalação específica do núcleo planar da antraciclina com a dupla hélice do

DNA, ocorrendo quebras uni ou bifilamentares, bem como trocas entre cromátides irmãs (Escudero *et al.*, 2004).

A presença da doxorrubicina e dos radicais livres formados são responsáveis pela quebra do DNA originando distúrbios sérios na estrutura do DNA. Esta droga é ativada durante todo o ciclo celular, incluindo na interfase. Sua toxicidade máxima ocorre durante a fase S do ciclo celular e as células morrem na fase G₂ (Green e Leeuwenburgh, 2002).

O quimioterápico também apresenta atividade sobre a membrana lipídica celular, permitindo à molécula se ligar à membrana celular bem como às proteínas plasmáticas, podendo alterar suas funções. Com isto desempenha um papel importante nas ações tumorais, contudo também é responsável pela cardiotoxicidade da droga (Titton *et al.*, 1998).

Além disso, a intercalação da doxorrubicina na molécula de DNA gera radicais livres. Essa capacidade de gerar uma variedade de espécies de radicais livres nos sistemas subcelulares tem sido considerada essencial para sua ação antitumoral (Keizer *et al.*, 1990).



Fonte: www.s bq.org.br

Figura 2. Fórmula estrutural do quimioterápico Doxorrubicina.

Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster* é o organismo teste do SMART (Somatic Mutation And Recombination Test), também conhecido como o teste da mancha da asa. O teste, desenvolvido por Graf *et al.* (1984), para detecção de agentes genotóxicos, vem sendo usado também para detecção de antigenotóxicos. A *D. melanogaster*, organismo eucariótico, tem se mostrado ideal para estudos de genotoxicidade e antigenotoxicidade *in vivo*, por possuir pequeno número de cromossomos, sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos, tempo curto de geração, grande número de mutantes e linhagens bem caracterizadas (Graf *et al.*, 1984; Vogel e Zilstra, 1987).

O teste de mutação e recombinação somática possui uma alta eficiência para detectar a atividade genotóxica de mutágenos selecionados de várias classes químicas. O espectro de compostos cuja genotoxicidade pode ser detectada com este bioensaio vai desde agentes alquilantes, com forte atuação, a um grande número de promutágenos, ativados por diferentes vias metabólicas de biotransformação enzimática. A versatilidade do procedimento experimental permite testar desde compostos estáveis a compostos instáveis. Também é possível não apenas testar substâncias que são dissolvidas, mas também químicos gasosos (Graf *et al.*, 1984).

Para a realização do teste para detecção de mutação e recombinação somática são utilizadas três linhagens:

1) Linhagem *multiple wing hairs (mwh)*: esta linhagem possui no cromossomo-3, um alelo mutante que altera o fenótipo dos pêlos da asa de *D. melanogaster*. Esse alelo está presente em homozigose na linhagem *mwh*. As células da asa da *D. melanogaster* são caracterizadas por possuir um único pêlo por célula (Figura 3 – A₁), porém, quando esta possui o alelo mutante *mwh*, o fenótipo apresentado será de três ou mais pêlos por células (Figura 3 – A₂).

2) Linhagem *flare-3 (flr³)*: esta linhagem possui também no cromossomo-3, porém, em uma posição mais próxima ao centrômero, um alelo mutante que altera o fenótipo dos pêlos da asa. O fenótipo provocado por este alelo mutante é um pêlo “deformado” que se assemelha a uma chama de fogo. Contudo, a

linhagem não possui este alelo em homozigose nas células do seu corpo, pois seria letal para o indivíduo. Com isso, a linhagem estoque é mantida, portando em um cromossomo o gene *flr³* e no mesmo locus, no outro cromossomo, um balanceador que possui múltiplas inversões, e recebe o nome de *TM3 B^d*. Portanto, a mutação *flr³* será viável, apenas quando algumas células do disco imaginal carregarem a mutação (Figura 3 - B).

3) Linhagem *ORR*: esta linhagem de *D. melanogaster* foi construída com o objetivo de aumentar a capacidade metabólica na ativação de promutágenos. Alguns aspectos do controle genético do metabolismo de xenobióticos em *D. melanogaster* já são conhecidos. Na linhagem resistente ao DDT, Oregon R (R), o gene localiza-se na posição 65,0 do cromossomo-2, é responsável para os altos níveis de expressão da citocromo P-450, típicas para esta linhagem. Por conseguinte, os cromossomos 1 e 2 das linhagens *mwh* e *flr³* foram substituídos pelos cromossomos 1 e 2 da linhagem Oregon R (R) (Frolich & Wurgler, 1989).

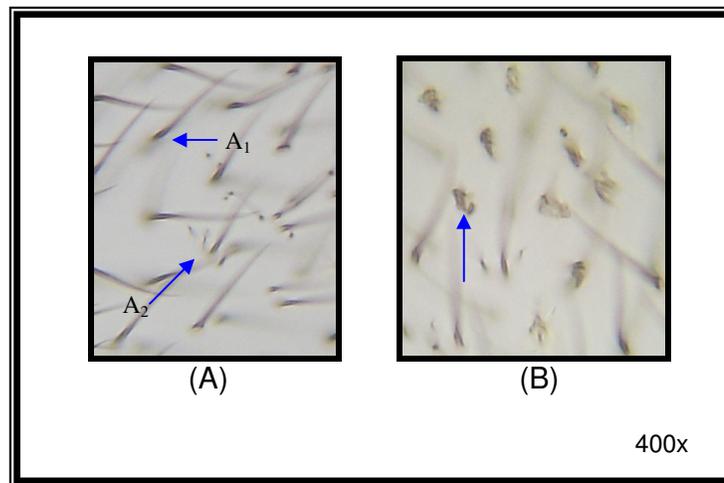


Figura 3. A₁ - Pêlos normais; A₂ - Pêlos múltiplos (*multiple wing hairs*); B - Pêlos flare (*flare³*).

Para a realização dos experimentos são feitos dois tipos de cruzamentos:

- Cruzamento padrão (ST – *Standard Cross*): fêmeas virgens *flr³* cruzadas com machos *mwh* (Graf *et al.*, 1989).

- Cruzamento de alta bioativação (HB - *High Bioactivation Cross*): fêmeas virgens *ORR / ORR; flr³ / TM3 Bd⁶* cruzadas com machos *mwh* (Graf & van Schaik, 1992).

O cruzamento de alta bioativação metabólica (HB) permite a detecção de promutágenos devidos aos altos níveis de citocromo P-450 da linhagem Oregon R (R), enquanto o cruzamento padrão permite a detecção de mutágenos diretos.

Desses cruzamentos foram obtidos dois tipos de descendentes: trans-heterozigotos marcados (MH: *mwh + / + flr³*) que possuem asas fenotipicamente do tipo selvagem; e heterozigotos balanceados (BH: *mwh + / + TM3, Bd⁶*) que possuem asas fenotipicamente serrilhadas (Figura 4).

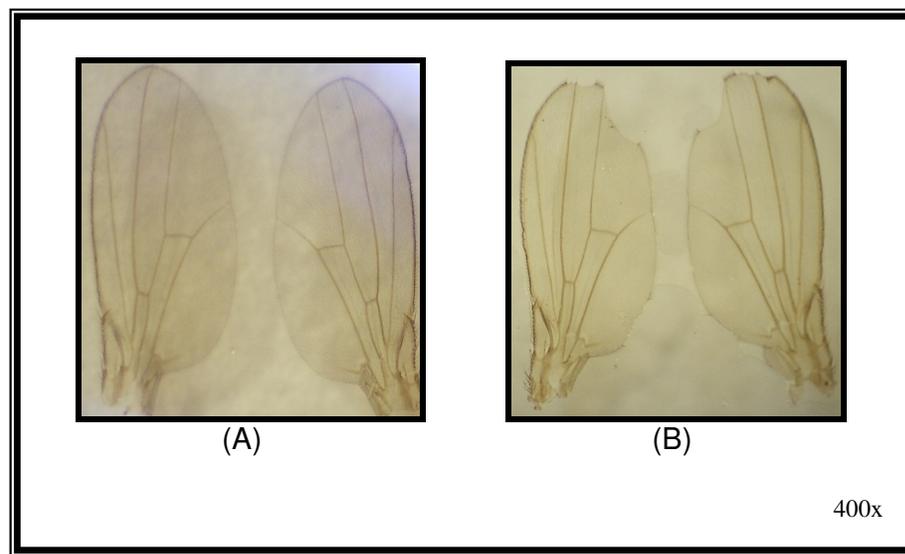
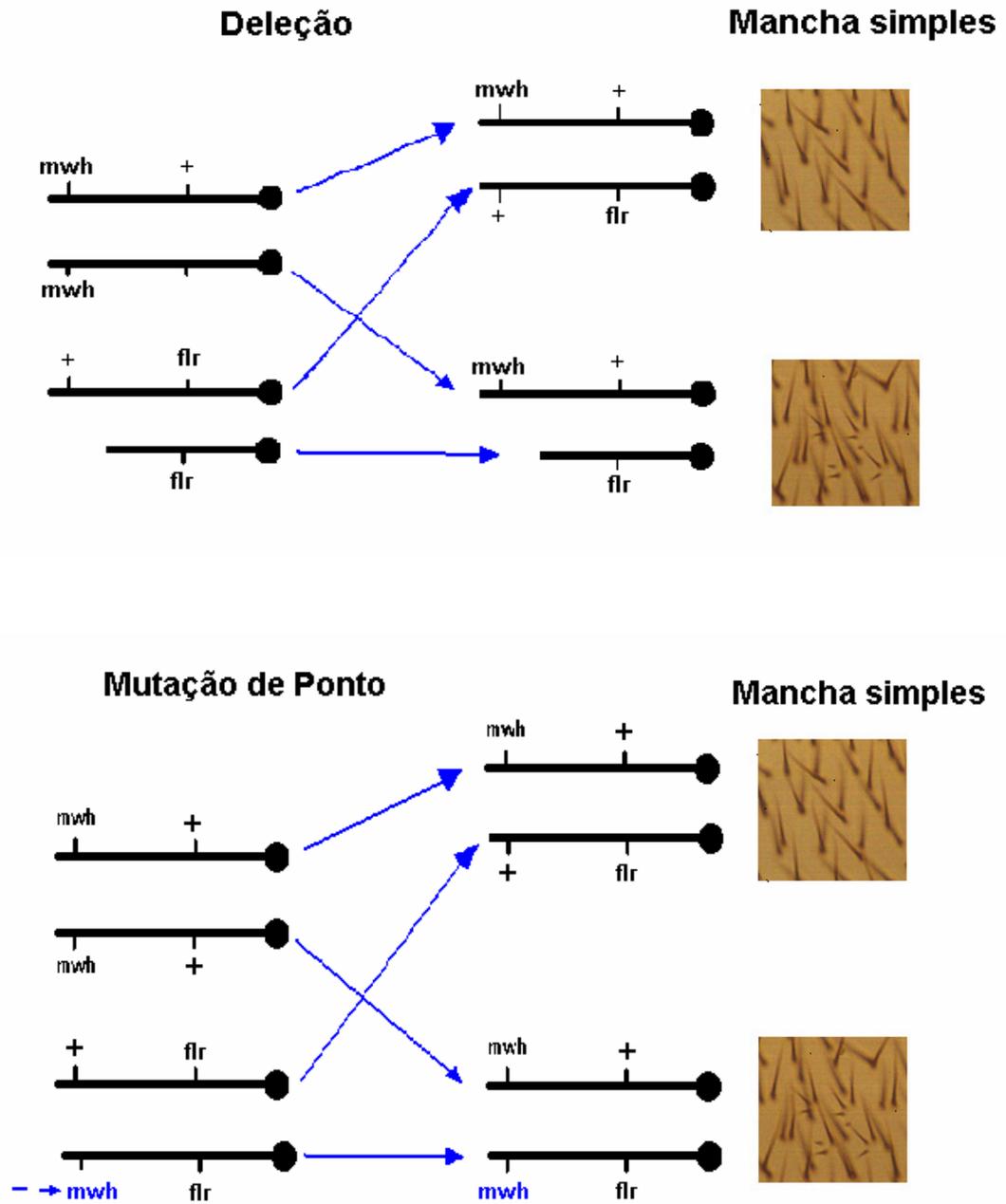


Figura 4. (A) Fenótipo das asas dos descendentes trans-heterozigotos (*mwh + / + flr³*); (B) Fenótipo das asas dos descendentes heterozigotos balanceados (*mwh + / + TM3, Bd⁶*).

Nos descendentes MH é possível detectar a ocorrência de diferentes eventos genéticos, tais como mutação de ponto, aberrações cromossômicas, e recombinação mitótica. No entanto, nos descendentes BH são detectadas apenas mutação e deleção, devido ao fato de o balanceador *TM3* carregar múltiplas inversões, que impedem a recombinação mitótica (Guzmán-Rincón & Graf, 1995).

Para o aparecimento de pêlos mutantes alguns eventos têm que acontecer, dentre eles podemos citar:



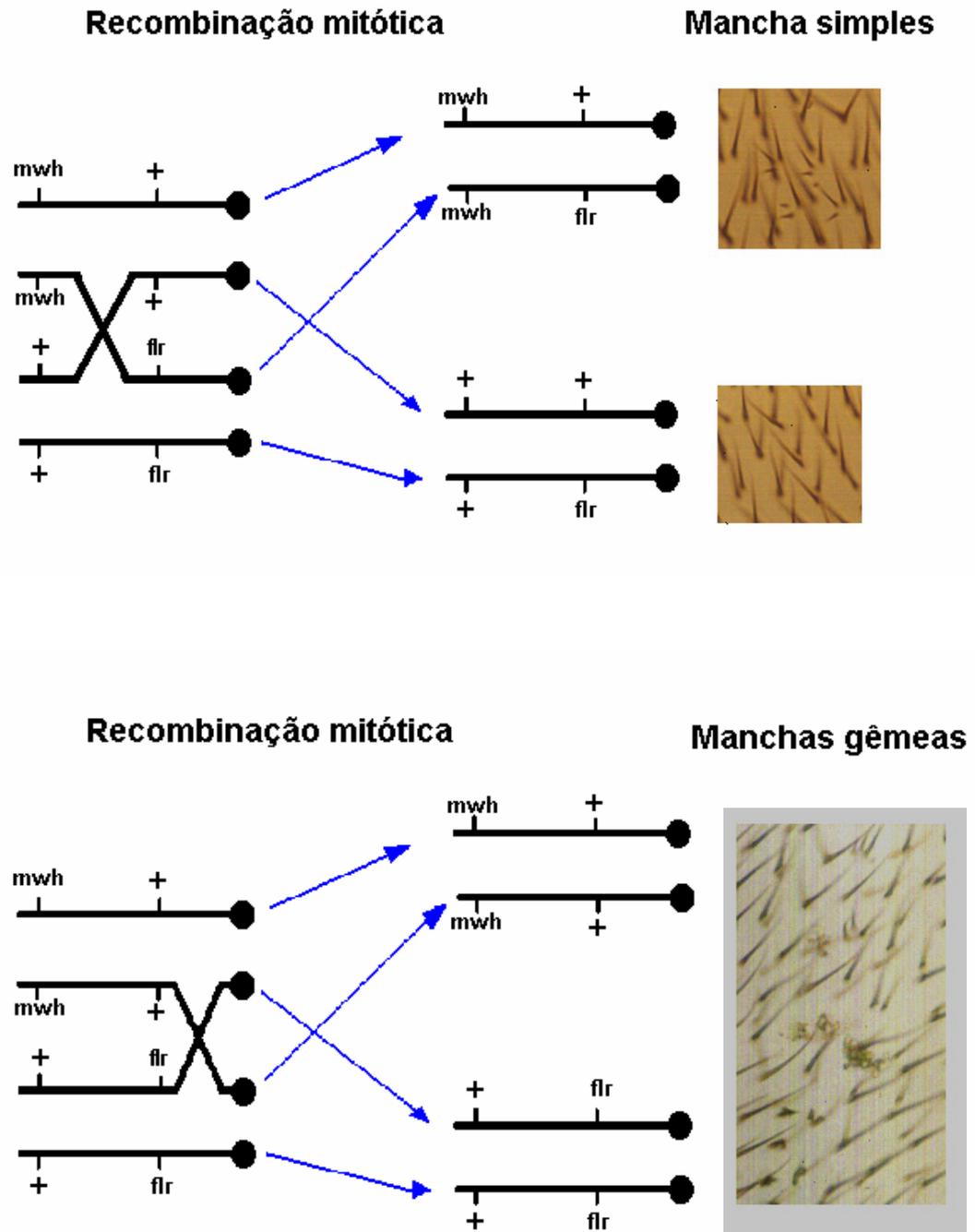


Figura 5. Esquemas genéticos que apresentam as possibilidades de aparecimento de pêlos mutantes.

Teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster* através da supressão do gene *wts*

A conservação evolucionária dos caminhos bioquímicos e o aumento da evidência para a conservação funcional dos genes supressores de tumores entre *Drosophila melanogaster* e mamíferos tem sugerido que estudos usando a indução e desenvolvimento de tumores nas células do disco imaginal de *Drosophila sp* podem contribuir diretamente para o entendimento de câncer em humanos (Potter *et al.*, 2000).

Vários oncogenes de homólogos de mamíferos e supressores de tumores são conhecidos em *D. melanogaster*. Além disso, a *Drosophila sp* possui vários genes que causam a superproliferação celular e que possuem similares conhecidos em mamíferos. Muitos desses mutantes conhecidos de *Drosophila sp* quando os genes são recessivos estes tornam embriologicamente letais e seus efeitos podem ser estudados apenas quando afetam um grupo de células de determinados tecidos. Vários novos genes supressores de tumores tem sido identificados, incluindo o *wts* (conhecido como *warts-verrugas*) (Xu *et al.*, 1995).

Recentemente, foram descritas homologias entre o gene supressor de tumor *warts (wts)* em *Drosophila* com o LATS1 em humanos, que, quando alterado, tem mostrado o desenvolvimento de sarcomas em tecidos moles e tumores ovarianos (Nishiyama *et al.*, 1999).

Segundo Nishiyama *et al.* (1999) o gene *warts (wts)* foi identificado como um supressor de tumor em *Drosophila*. A deleção desse gene leva a formação de clones de células que são consideravelmente invasivas, chamadas, literalmente, de verrugas, que desenvolvem pelo corpo da mosca.

O disco imaginal da *Drosophila sp* é formado por uma única camada de células, na larva, que durante a metamorfose desenvolve nas estruturas da epiderme da mosca adulta. As células desse disco possuem o controle do ciclo celular, similar ao das células somática em mamíferos (Eeken *et al.*, 2002).

O ciclo celular é controlado por uma família de proteínas quinases que reagem às atividades metabólicas da célula para produzir uma divisão ordenada. Essas quinases são heterodímeros, com uma unidade regulatória, as ciclinas, e

uma catalítica, a proteína quinase dependente de ciclina (CDK – cyclin-dependent protein kinase) (Cheng *et al.*, 1999). Nas células existem pelo menos quatro tipos de ciclinas (A, B, C e D) e pelo menos oito tipos de CDK (CDK1 ao CDK8) que agem em várias combinações em pontos específicos no ciclo celular (Nelson & Cox, 2000). O gene *warts* codifica uma proteína denominada serina/treonina quinase importante na progressão do ciclo celular, especialmente na mitose (Nishiyama *et al.*, 1999).

O marcador *wts* é uma mutação recessiva letal em homozigose nos zigotos. O gene localiza-se no cromossomo-3. Devido à letalidade o alelo *wts* é mantido na linhagem estoque com a presença de um balanceador cromossômico (TM3). Por meio do cruzamento entre linhagens *wts/TM3* e do tipo *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*) são obtidas larvas heterozigotas (*wts/+*).

Para a realização dos experimentos é feito o seguinte cruzamento:

- Para obtenção de larvas heterozigotas *wts +/+ mwh* foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb¹* com machos *mwh/mwh*.

Cruzamento entre as linhagens mutantes

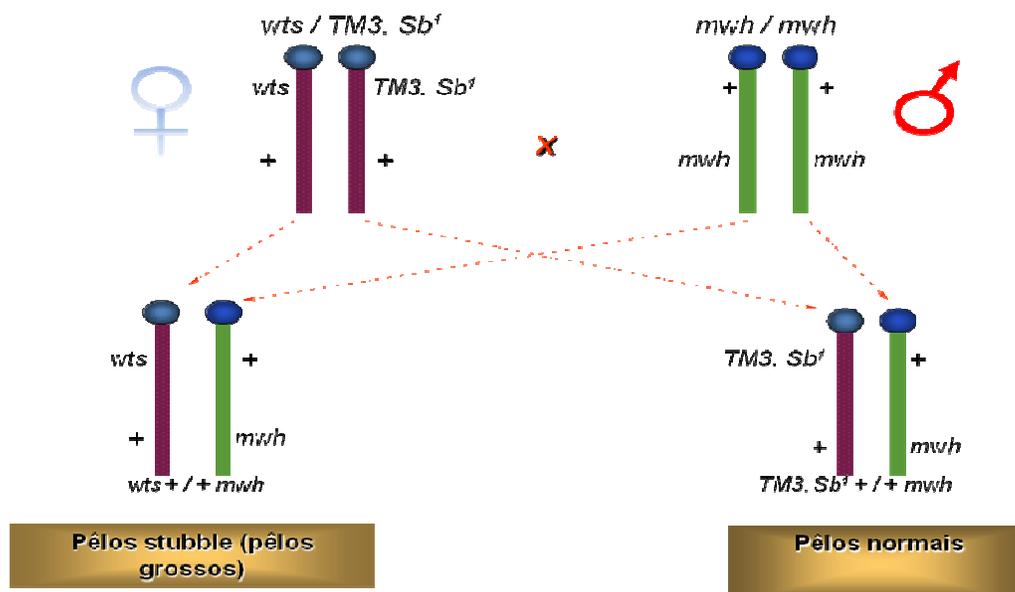
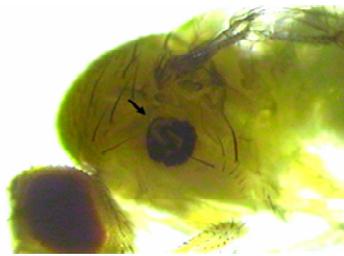
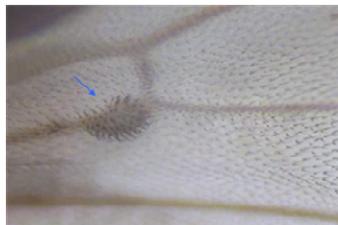


Figura 6. Segregação cromossômica apresentando a possibilidade de aparecimento de pêlo stubble

A perda da heterozigose nas células do disco imaginal ocasiona a formação de clones homozigotos (que é viável em conjuntos de células isoladas) na larva, que manifestam como tumores na mosca adulta (Sidorov *et al.*, 2001). As células do ciclo celular do disco imaginal de *Drosophila sp* são muito semelhantes às células somáticas de mamíferos e muitos dos genes envolvidos na regulação são conservados entre o Homem e *Drosophila sp*. Essa perda da heterozigose é o principal evento envolvido na formação de tumores. O mecanismo envolve mutações além de perda cromossômica e recombinação cromossômica. Os tumores da linhagem wts são detectados na cabeça, olhos, pernas, tórax e asas, praticamente em quase todo o corpo do animal adulto, de acordo com a Figura-5 (Eeken *et al.*, 2002).



Tumor no tórax



Tumor na asa

Figura 7 : Tumores epiteliais da linhagem wts no tórax e asa.

A utilização de substâncias com potencial anticarcinogênico e antimutagênicos tem atraído a atenção de muitos cientistas em todo o mundo. Algumas destas substâncias já têm mostrado as suas potencialidades em experimentos *in vitro*, porém ao testá-las *in vivo* o resultado pode ser muito

distinto do esperado. Os derivados de naftoquinonas, dentre eles o lapachol, alfa-lapachona e beta-lapachona, já tem sua eficácia *in vitro* comprovada. No entanto, estudos *in vivo* são muito raros. O trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos antígenotóxicos e/ou anticarcinogênicos dos derivados de naftoquinonas contra a ação genotóxica da Doxorubicina (0,125mg/mL), geradora de radicais livres.

2. Referências Bibliográficas

BALASSIANO, I. I.; PAULO, S. A.; SILVA, N. H.; CABRAL, M. C.; CARVALHO, M. C.; Demonstration of the lapachol as a potential drug for reducing cancer metastasis. **Oncology Reports** v. 13, p.329-333 , 2005.

BLOCK, J. B.; SERPICK, A. A.; MILLER, W.; WIERNIK, P. H. Early clinical studies with lapachol (NSC-11905). **Cancer Chemoterapy Reports.**, v. 4, n.4, p. 27-28, 1974.

CARUSO, F.; MARTINEZ, M. A.; ROSSI, M.; GOLDBERG, A.; VILLALBA, E. C.; AYMUNINO, P. Crystal and molecular structure of manganese (II) lapacholate, a novel polymeric species undergoing temperature-reversible metal to ligand electron transfer. **Inorganic chemistry**. v. 48, p. 3529-3534, 2009.

CASTELLANOS, J. R. G.; PRIETO, J. M.; HEINRICH, M. Red lapacho (Tabebuia impetiginosa) – A global ethnopharmacological commodity? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 1-13, 2009.

CHENG, A.; ROSS, K. E.; KALDIS, P.; SOLOMON, M. Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. **Research Paper**. v. 13, p. 2946-2657, 1999.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; PACHECO, R. M.; LANDÍN, M. Dissolution rate enhancement of the novel antitumoral β -lapachone by solvent change precipitation of microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 69, p. 871-877, 2008.

EEKEN, J. C. J.; KLINK, I.; VAN VEEN, B. L.; PASTINK, A.; FERRO, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 40, p.277-282, 2002.

ESCUADERO, M. C.; LASSALETTA, A.; SEVILLA, J.; FERNANDEZ-PLAZA, S.; PEREZ, A.; DIAZ, M. A.; MADERO, L. Chemotherapy-related secondary acute myeloid leukemia in patients diagnosed with osteosarcoma. **Journal of Pediatrics and Hematology Oncology**, v. 26, n. 7, p. 454-456, 2004.

ESTEVEZ-SOUZA, A.; FIGUEIREDO, D. V.; ESTEVES, A.; CAMARA, C. A.; VARGAS, M. D.; PINTO, A. C.; ECHEVARRIA, A. Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p. 1399-1402, 2007.

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F. E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. **Mutation Research**, v. 216, n. 3, p.179-87, 1989.

GOODWIN, T. W.; MERCER, E. I. Introduction to Plant Biochemistry. Pergamon Press: New York, 1972.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, p. 153-188, 1984.

GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A. J.; WÜRGLER, F. E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v. 222, p. 359-373, 1989.

GRAF, U.; VAN SCHAİK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 271, p. 59-67, 1992.

GREEN, P. S.; LEEUWENBURGH, C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v.1588, n. 1, p. 94-101, 2002

GROTEGUT, S.; VON SCHWEINITZ, D.; CHRISTOFORI, G.; LEHEMBRE, F. Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1 mediated upregulation of Snail. **EMBO Journal** v. 25, p.3534-3545, 2006.

GUZMÁN-RINCÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In BUTTERWORTH, F. M.; CORKUN, L. D.; GUZMÁN – RINCÓN, J (eds) **Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change**. Phenunm Press, New York, N Y, pp. 169-181, 1995.

HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V. U.; MIANA, G. A.; GREEN, I. R. Lapachol: an overview. **Special Issue Reviews and Accounts – Arkivoc**, p. 145-171, 2007.

JUSTICE, R. W.; ZILIAN, O.; WOODS, D. F.; NOLL, M.; BRYANT, P. The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes & Development**, v. 9, p. 534-546, 1995.

KEIZER, H. G.; PINEDO, H. M.; SCHUURHUIS, G. J.; JOENJE, H. Doxorubicin (adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. **Pharmacology Therapy**, v. 47, n. 2, p. 219-231, 1990.

KIM, S. O. K.; KWON, J. I.; JEONG, Y. K.; KIM, G. Y.; KIM, N. D.; CHOI, Y. H. Intoduction of Egr-1 is associated with anti-metastatic and anti-invasive ability of β -lapachone in human hepatocarcinoma cells. **Bioscience Biotechnology Biochem.** v.71, n. 9, p.2169-2176, 2007.

KUNG, H. N.; CHIEN, C. L.; CHAU, G. Y.; DON, M. J.; LU, K. S.; CHAU, Y.P. Involvement of NO/cGMP signaling in the apoptotic and anti-angiogenic effects of β -lapachone on endothelial cells in vitro. **Journal Cell Physiology.** v. 211, n. 2, p. 522-532, 2007.

LEE, J. H.; CHEONG, J. H.; PARK, Y. M.; CHOI, Y. H. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by β -lapachone in human prostate carcinoma cells. **Pharmacology Research.** v. 51, p.553-560, 2005.

LI, C.J.; LI, Y. Z.; PINTO, A. V.; PARDEE, A. B. Applications of counter-current chromatography in organic synthesis purification of heterocyclic derivatives of lapachol **Procedure Natl. Academy. USA**, v. 96, p. 13369, 1999.

LICATA, S.; SAPONIERO, A.; MORDENTE, A.; MINOTTI, G. Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. **Chemical Research Toxicology**, v. 13, n. 5, p.414-20, 2000.

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

MARIN, A.; CERAIN, A. L.; HAMILTON, E. DT-diaphorase and cytochrome B5 reductase in human lung and breast tumours. **Britain Journal of Cancer**, v. 76, p.923-929, 1997.

MATÉS, J. M.; SANCHEZ-JIMÉNEZ, F. M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **The International Journal Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, n. 2, p.157-170, 2000.

McCLENDON, A. K.; OSHEROFF, N. DNA topoisomerases II, genotoxicity, and cancer. **Mutation Research**, v. 623, p. 83-97, 2007.

MENACHO-MARQUEZ, M.; MURGUIA, J. R. Beta-lapachone activates a Mre11p-Tel1p G1/S checkpoint in budding yeast. **Cell Cycle**, v. 5, p. 2509-2516, 2006.

MIRANDA, F. G. G.; VILAR, J. C.; ALVES, I. A. N.; CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanae* Lor. ex Griseb. inner bark **BMC Pharmacology**, v.1, n. 6 p.1-5, 2001.

MYERS, C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. **Semin. Oncology**, v. 25, n. 4, p. 10-14, 1998.

MIYOSHI, A.; KITAJIMA, Y.; KIDO, S.; SHIMONISHI, T.; MATSUYAMA, S.; KITAHARA, K.; MIYAZAKI, K. Snail accelerates cancer invasion by upregulation MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. **Britain Journal of Cancer**, v. 92, p.252-258, 2005.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n.1 p. 105-111, 2001.

MURAY, M. T.; PIZZORNO, J.E.; Encyclopedia of natural medicine 2^a ed. PA4 Rocklin, CA: Prima Pub. p. 967-972, 1998.

NELSON, D. L.; COX, M.M. Lehninger: Principles of biochemistry. Edit. Worth Publishers. 3^o Ed. 2000.

NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IADA, S.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H. A human homolog of *Drosophila* warts suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. **Febs Letters**, v. 459, p. 159-165, 1999.

POTTER, C. J.; TURENSCHALK, G. S.; XU, T. *Drosophila sp* in cancer research: an expanding role. **Trends Genetic**, v. 16, p. 33-39, 2000.

REINICKE, K. E.; BEY, E. A.; BENTLE, M. S.; PINK, J. J.; INGALLS, S. T.; HOPPEL, C. L.; MISICO, R. I.; ARZAC, G. M.; BURTON, G.; BORNMANN, W. G.; SUTTON, D.; GAO, J.; BOOTHMAN, D. A. Development of β -lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1 levels. **Clinical Cancer Research**, v.11, n. 8, p.3055-3064, 2005.

RUTTIMANN, A. **Chimia**, v. 40, p.290-296, 1986.

SIDOROV, R. A.; UGNIVENKO, E. G.; KHOVANOVA, E. M.; BELITSKY, G. A. Induction of tumor clones in *D. melanogaster wts/+* heterozygotes with chemical carcinogens. **Mutation Research**, v. 498, p. 181-191, 2001.

SILVA, A.J.M.; NETTO, C.D.; LIMA, W. P.; SANTOS, E. C. T.; BERGMANN, B. R.; MAUREL, S.; VALENTIN, A.; COSTA, P. R. R.; Antitumoral, antileishmanial and antimalarial of pentacyclic 1,4-naphthoquinone derivatives. **Journal Brazilian Chemistry Society**. v.20, n. 1, p.176-182, 2009.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia das naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**, v.26, n. 3 p. 407-416, 2003.

SINGAL, P. K.; LI, T.; KUMAR, D.; DANELISEN, I.; LISKOVIC, N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 207, n. 2, p. 77-86, 2000.

THOMSON, R. H. Naturally Occurring Quinones IV; Recent Advances; Chapman & Hall: London, 1997.

TRITTON, T. R.; MURPHREE, S. A.; SARTORELLI, A. C. Adriamycin: a proposal on the specificity of drug action. **Biochemistry Biophysical Research**, v. 84, n. 3, 802-808, 1998.

VOGEL, E. W.; ZILSTRA, J. A. Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ-cell stages. **Mutation Research**, v. 180, p. 189-200, 1987.

VIEIRA, R. F. Conservation of Medicinal and Aromatic Plants in Brazil. **Perspectives on new crops and new uses**, p. 152-159, 1999.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no Cerrado. In: Proc. Int. Savanna Symposium, Brasília, DF, Embrapa/CPAC. p. 169-171, 1998.

WALLACE, K. B. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. **Pharmacology Toxicology**, v. 93, n. 3, p.105-115, 2003.

WANG, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. **National Review Molecular Cell Biology** v. 3 p.430-440, 2002.

WEI, P.; ZHANG, X.; TU, S.; YAN, S.; YING, H.; OUYANG, P. New potential inhibitors of DNA topoisomerases. Part II: design and synthesis of α -lapachona derivatives under microwave irradiation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 828-830, 2009.

WILSTERMANN, A. M.; OSHEROFF, N. Stabilization of eukaryotic topoisomerase II-DNA cleavage complexes. **Current Topics Medical Chemistry** v.3, p. 321-338, 2003.

XU, T.; WANG, W.; ZHANG, S.; STEWART, R. A.; YU, W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. **Development**, v. 121, p. 1053-1063, 1995.

ZHANG, J. F.; ZHANG, Y. P.; HAO, F. Y.; ZHANG, C. X.; LI, Y. J.; JI, X.R. DNA ploidy analysis and expression of MMP-9, TIMP-2, and E-cadherin in gastric carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11 p. 5592-5600, 2005.

CAPÍTULO 2

MANUSCRIPT FOR ONCOLOGY REPORTS

Manuscript for Oncology Reports

Lapachol as an epithelial tumour inhibitor agent in *Drosophila melanogaster*
heterozygote as a tumour suppressor gene *wts*

Wender Ferreira Costa¹, Alaide Braga de Oliveira², and Júlio César Nepomuceno^{1,3}

¹Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

²Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de produtos Farmacêuticos, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

³Centro Universitário de Patos de Minas, Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Patos de Minas, Minas Gerais, Brasil.

Correspondence to: Júlio César Nepomuceno, Universidade Federal de Uberlândia (Federal University of Uberlândia), instituto de Genética e Bioquímica (Genetics and Biochemistry Institute), located at Av. Pará 1720, Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, 38400-902, Brazil. E-mail: nepomuceno@ufu.br

Abstract. The search for new and effective anti tumour agents with fewer cytotoxic side effects on normal tissue is increasingly more important. Lapachol is a natural organic compound (isolated) in plants of the Bignoniaceae family (Ipê, *Tabebuia* genus), generally found in all regions of Brazil. Lapachol (LAP) is chemically identified as belonging to the naphthoquinone group, and is known for its anti inflammatory, analgesic and antibiotic properties, despite its questionable effectiveness in treating neoplastic cells. Thus, the objective of the present study is to evaluate the anti cancer effects of lapachol using tests to detect clones of epithelial tumours (warts) in *Drosophila melanogaster*. To this end, 48 hour larvae bred from *wts*/TM3, *Sb*¹ females and *mwh/mwh* males, were treated with different concentrations of lapachol (20; 40 and 60 µg/ml). The larvae were isolated and linked to the carcinogenic agent doxorubicin (DXR – 0.125 mg/mL). Results indicate that there was not a statistically significant increase in the number of epithelial tumours between the negative control group as compared to those treated only with lapachol ($P > 0,05$). On the other hand, there was a statistically significant reduction ($P < 0,05$) in the number of tumours when lapachol was associated with DXR (0.125 mg/mL). Compare to positive control ($P < 0,05$) therefore, it is possible to conclude that in these experimental conditions lapachol did not present any carcinogenic activities although it revealed anti carcinogenic effects against the induced action of DXR tumours.

Keywords: *Drosophila melanogaster*; naphthoquinone, Brazil, doxorubicin; *wts*.

Introduction

Natural products extracted from plants, given the diversity of their chemical structure, significantly contribute to the development of various medications used clinically in traditional medicine (1). The selection of biological materials in plants, in areas of wide biodiversity in tropical and subtropical regions provides chemical diversity in obtaining products for the development of new drugs (2).

Chemotherapy derived from bacteria (Adriamycin), plants (Lapachol, Taxol), organism and microorganisms based on the work of the previous decade have shown satisfactory results (3). The use of natural products in the treatment of various diseases has been observed for many years in popular medicine. Based on this tradition the use of medication produced from plants for the treatment of cancer has become common place. This was confirmed by the fact that, between 1983 and 1994, approximately 62% of commercial drugs used to treat cancer, were derived from natural sources (4).

Among the various species of plants tested for chemical substances there is *Tabebuia impetiginosa*, also known as "ipe". The chemical compound found in this plant is naphthoquinone also known as lapachol. Quinones are classified by the aromatic moieties present in their structure and naphthoquinones constitute the naphthalenic ring (5).

Naphthoquinones are a class of compounds having cytotoxic properties that can be advantageous in treating cancer. Two essential mechanisms are linked to the effects of naphthoquinones: Oxidative stress and cell nucleophilic alkylation (6). These substances are able to accept electrons and generate oxygen reactive species, that react to $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , H_2O_2 , and the oxidative effects could explain its cytotoxicity (5, 7, 8).

Bolton *et al.*, (6), suggest that quinones are highly reactive molecules and can reduce the redox cycle using semi quinone radicals, generating oxygen reactive species (ROS) that include a reaction to superoxide radicals, peroxide radicals, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. ROS production can cause severe oxidative cell stress forming oxidative macromolecule cells such as lipids, protein and DNA.

Lapachol (4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)naphthalene-1,2-dione) is a natural quinone that can be isolated in many species of Bignoniaceae found in Brazil, commonly known as “ipê amarelo” (9). A number of studies discuss this natural quinone including its anti cancer, anti viral, anti microbial, anti inflammatory, anti malarial effect as well as its significant capacity in *Trypanosoma cruzi* (10, 11).

Chemotherapy is a treatment that uses chemical compounds known as chemotherapeutic agents having mechanisms that act in different ways, inhibiting cell division. Developments in the last decades in chemotherapy have encouraged the use of other types of cancer treatments thus increasing the number of cures (12).

Chemotherapy agents used in treating cancer can be synthetic, semi synthetic or natural. They are divided into five different groups, namely, alkanes, anti metabolic, natural products, hormones and antagonists (13).

The origin and progression of tumours in humans involve a series of genetic changes that include oncogene activation and the loss or deactivation of tumour suppressor genes (14). The importance of tumor suppressor genes has recently been recognized in new molecular techniques of studying various genes and the loss of normal alleles in different types of tumours. The byproduct of tumour suppressor genes includes cellular fixation protein, molecular transduction indicators, and transcription factors, molecules that control cell cycles and programmed cell death by apoptosis (15).

The imaginal discs of *Drosophila* larvae have only one cellular layer that during the metamorphosis stage develops in the epidermic structures in adult flies (16). One of the genes involved in the cellular cycle of the imaginal discs is *wts* (warts). Mutations in the *wts* genes are recessive and lethal. However, homozygotic clones that appear among heterozygotic flies in cells of imaginal discs developed epithelial tumours that are visible in the adult fly cuticles (17). The loss or deactivation of both *wts* gene copies that encode a likely kinase protein depends on serine and threonine, leads to a loss of control and direction, control of cell proliferation in the development of the imaginal discs. Considering that the appearance of tumours is present only in the homozygosis phase due to genetic loss, *wts*, is thought of as being a gene suppressor tumour (18).

Sidorov et al. (19), generated epithelial tumour clones in *Drosophila* using heterozygotic lineage for the tumour suppressor gene *wts*. In this study, the authors verified the efficiency of generating tumours by studying ten compounds of five chemical groups: Polycyclic aromatic hydrocarbonates (PAH), aromatic amina, derivatives of heterocyclic aromatic N-nitrosamines, and Platinum complex.

The present study come to evaluate the carcinogenic potential of Lapachol (20 µg/mL, 40 µg/mL or 60 µg/mL), as well as evaluating its anti carcinogenic action in the same concentration levels when co treated with DXR (0.125 mg/mL) in *Drosophila melanogaster*.

Materials and Methods

Chemical compounds. The DXR (Figure 1) is commercially known as Adriblastina[®] RD (CAS 23214-92-8) (lot n^o G0421), manufactured by Pharmacia & Upjohn S.p.A. – Milan, Italy, imported and distributed by Pharmacia of Brazil, Ltd. Each ampoule of Adriblastina[®] RD contains: chlorohydrate of doxorubicin (10 mg); metilparabeno (1 mg); lactose (50 mg), registry number: 1.2389.0046, in the Ministry of Health of Brazil.

Lapachol (CAS 84-79-7) was provided by Dr. A. B. Oliveira (Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). The molecular structures of the tested drug are described in Figure 1. Solutions of these compounds were made in a five percent solution of ethanol for later use.

Drosophila lineages. The following *Drosophila melanogaster* lineages were used: 1) *wts/TM3, Sb¹*, this lineage presents one lethal alleles *warts (wts)* in chromosome-3, balanced by a TM3 chromosome, having multiple inversions characterized by dominant *stubble (Sb)* mutation, phenotypically identified by the presence in the entire body of the fly, having short and longer bristles. This lineage was provided by Bloomington Drosophila Stock Center of the University of Indiana, USA, and registry number: (Bloomington/7052 2) *multiple wing hairs (mwh/mwh)*. Flies of the *mwh* lineage have a marker gene in chromosome-3 (3-0.3) in a distal position, having three or more hair in each cell. The lineage is kept in homozygosis since it is a viable mutation. This lineage was provided by Dr. Ulrich Graf (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland).

Breeding: To obtain *wts +/+ mwh* heterozygotic larvae, virgin female *wts/TM3, Sb¹* (17) were mated bred to *mwh/mwh* males. The larvae from this breeding cross,

were treated with the tested chemical compound. However, only adult flies, without the chromosome balancer (*TM3, Sb¹*) were analyzed and they did not have truncated bristles.

Experimental Procedure: larvae 3^o instars described above were transferred to a glass tube of (2.5cm in diameter and 8.0 cm in height) containing 1.5 g of instant mashed potato (HIKARI, Lot n^o L3068DD) and 5.0 mL of lapachol (LAP) (20, 40 or 60 µg/mL) associated or not to DXR (0.125mg/mL). DXR was used (0.125mg/mL) as a positive control and ethanol 5% was used for negative control. Since some compounds were photosensitive all tubes were wrapped in aluminum foil.

The agents tested (LAP, DXR and the combination of LAP with DXR) were prepared in ethanol 5% minutes before treatment. All experiments were performed at temperatures of 25 ± 2 °C and 65% humidity.

Analyses of the flies. After metamorphosis, the individual adults were transferred into a vial containing 70% ethanol and males and females with genotype (*wts +/+ mwh*) and normal bristles phenotype were identified. Tumour analysis was conducted using a Coleman stereoscopic microscope with an amplification of 25X. Tumours were only included when large enough to be unequivocally classified.

Statistical Analyses. The frequency of tumours of the concentration tested and the controls groups were compared using the non-parametric, Mann-Whitney test and considered statistically significant when ($P < 0,05$).

Results and Discussion

The *wts* lineage have tumours that can be found in the head, eyes, legs, wings, basically in any part of the adult body of the flies. In flies, not all precursors of different body parts are well known. In specific animal body parts, such as the eyes and legs the cellular precursors are located in well defined areas, during the larvae stage, and are known as the cells of the imaginal disc. The development and proliferation of cells of these discs in particular are not dependent on other areas of the body in the animal. This situation is very intriguing when animals are tested at a specific age, chemical compounds that could harm the DNA causing tumours on the animal's body to appear (17).

The analyses and the location of each tumour were conducted according to each region of the fly's body. These regions were distributed based on Eeken *et al.*, (17) findings: eyes, head, wings, body (abdomen and chest), legs and halter.

Based on Table 1, the results demonstrated that descendants treated with different lapachol concentration levels (20, 40 or 60µg/mL), did not show any statistically significant changes in the frequency of tumours when compared to the negative control (ethanol 5%) ($P>0,05$). Therefore, no statistically significant carcinogenic effect of lapachol was found in the experimental condition shown here. However, DXR, used as a positive control, showed an unequivocal carcinogenic effect compare to negative control ($P<0,05$).

Of the 145 flies analyzed and treated with DXR, 134 tumours were identified. The majority of the tumours (64 or 47.76% of the total number of tumours) were observed on the wings. The remaining tumours were distributed in other areas of the body, eyes: 6 tumours (4.48%); head: 12 (8.95%); body: 30 (22.39%); legs: 20 (14.92%) and halters: 2 (1.50%).

Of the 107 individuals that were analyzed and treated with ethanol 5% (negative control), 17 tumours were found, occurring in a spontaneous frequency. The distribution of these tumours was restricted to the wings (9 tumours, 52.94%), body (5 tumours, 29.41%) and legs (3 tumours, 17.65%). This spontaneous frequency with a distribution of tumours primarily observed on the wings and the body of the fly was also verified by Sidorov *et al.*, (19).

Figure 1 too shows that some tumours appeared throughout the body of the *Drosophila sp*, by the loss of heterozygosis of the mutant tumour suppressor gene (*wts*) in the individuals treated with DXR (0.125 mg/mL).

The DXR carcinogenic effect in animals was already known. IRAC[®] (doxorubicin) was tested for its carcinogenicity in rats with an intravenous injection that produced breast tumours and by one or multiple subcutaneous injections causing breast sarcomas (20). In this study based on its known carcinogenicity doxorubicin was used in this experiment as a positive control in inducing tumours.

Evaluating the anticarcinogenic effect of lapachol (20, 40 or 60 µg/mL), associated, simultaneously (co-treatment), with doxorubicin (0.125 mg/mL), a statistically significant reduction ($P < 0,05$) in the frequency of tumours in all concentrations tested was verified when compared to the carcinogenic agent (doxorubicin/ 0.125 mg/mL) (Table 1).

The frequency of reduction of tumours was directly proportional to the concentration of lapachol. In a concentration of 20 µg/mL there was a reduction of 64% in the total frequency of tumours induced by DXR. In a concentration of 40 µg/mL the reduction was 71% and in a concentration of 60 µg/mL a 76% reduction was noted in the tumours induced by DXR. Based on Figure 3 it is possible to

observe that tumour reduction throughout the body of the animal concentrated primarily on the wings and the body of the fly.

The lapachol mechanisms that reduced tumours were not directly analyzed. However, an understanding of the chemical structure of this compound makes it possible to link the action of lapachol to its entire chemical group. Quinones are organic compounds likely found in various plant species and cells. They are widely used as an anticarcinogenic, antibacterial, antimalarial, and fungicidal agent (21). Based on its molecular structure, quinones are divided into different groups. The criteria used to identify the aromatic system to which the quinonodical rings belong, are: benzoquinones – the benzene ring; naphthoquinone – naphthalene ring; anthraquinones – an antracenic linear or angular ring (5). Lapachol is a quinone that its chemical structure belongs to the naphthoquinone group (22).

Silva *et al.*, (5) reviewed the chemistry and the pharmacology of naphthoquinones. After careful review, the authors affirmed that their main interest in lapachol was its capacity to induce oxidative stress by developing intracellular oxygen species reactive to hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) and the radical hydroxyl (HO^{\cdot}). These species can harm some important cellular components, as well as normal and malignant cells. This xenobiotic interference alters the natural balance of the signals interfering during cellular division at specific points (“checkpoint”). Normal alterations can induce apoptosis as a possible alternative if complete oxidative stress is not eliminated.

Additional studies demonstrated that oxidative stress induced by lapachol and its effect on DNA, occurs in response to the P450 Cytochrome reductase enzyme biotransformation (5).

Studies conducted to analyze antitumoral properties and the action mechanism of naphthoquinones and its derivatives have shown the inhibitory effect of topoisomerase when linked to DNA. These enzymes have been successful in treating cancer (24). Esteves-Souza *et al.*, (25) evaluated the cytotoxicity of lapachol and its derivatives when treating Ehrlich carcinoma and K562 leukemic cells. In this study the authors verified a cytotoxic effect due to the inhibitory action of DNA- topoisomerase II. Krishnan and Bastow (26) verified a direct beta-lapachone interaction (semi- synthetic lapachol derivative) with topoisomerase I. These authors found that the inhibitory mechanisms of topoisomerase of naphthoquinones reveals potential for developing an anticancer drug.

In 1974 the National Institute of Cancer of North America suspended all studies with lapachol, due to the need for high concentrations at a serum level for an effective chemotherapy treatment. However, the elevated amounts needed to make medication effective is extremely toxic, hence it is no longer used. None of these studies considered lapachol molecularly (27). Hussain *et al.* (25) indicate that recent studies form the bases for the synthesis and the development of new drugs derived from lapachol that could be used in the future as a potent biomolecule.

Even though the National Institute of Cancer of North America suspended the use of lapachol as an antineoplastic chemotherapy drug, studies using lapachol to treat cancer continues. In order to analyze molecular and morphological changes caused by lapachol treatment in invasive cells, Balassiano *et al.*, (28) used Hela cells exposed to different lapachol concentrations. In this study the authors concluded that lapachol induces alterations in the protein of cells cicle and

inhibits the invasion of HeLa cells, showing its potential in the fight against metastasis. Similar studies in reducing metastasis were verified by Maeda *et al.*, (29) in mice treated with lapachol in doses between 5 and 20 mg/Kg.

Castellanos *et al.*, (30) after a review regarding lapachol and beta-lapachone found that despite efforts to provide scientific information the lack of material, observational studies and the problems associated with the lack of product quality in processing the drug to the final product minimizes the efficiency of these compounds for therapeutic use. Castellanos *et al.*, (30) also emphasizes the need for new studies not only *in vitro*, but also *in vivo* using quality controlled compounds.

It is also important to emphasize therapeutic studies with lapachol that are not restricted to cancer treatment. Many studies demonstrate the effect of lapachol against leishmaniosis (31), Chagas disease (10, 11, 32, 33), and schistosomiasis (34).

Rabelo *et al.*, (35) suggested that naphthoquinones associated with lapachol have potential in preventing cancer. Our results are in accordance with the authors, that potential carcinogenic effects were not found, in addition to its ability to reduce the frequency of tumours induced by DXR.

Finally, we conclude that lapachol in our experimental conditions did not show any carcinogenic activity, indicating an advantage in evaluating the risks of this compound for therapeutic use. Regarding the unequivocal tumour reduction in epithelial *Drosophila melanogaster* cells, we suggest that further studies should be conducted to evaluate the antitumoral activity of lapachol, and its chemical derivatives as well as its effect in the chemoprevention of cancer.

Acknowledgments

The authors wish to thank CAPES/ CNPq/UFU for their financial support and Dr. Mário Antônio Spanó for his constant support, criticism and suggestions throughout the development of the study.

Table I. Summary of results in warts of progeny *wts* in heterozygote descendents (*wts/+*) of *Drosophila melanogaster*, after treatment with Lapachol (LAP) and co-treatment with Lapachol (LAP) and doxorubicin.

| Treatment | flies | Number of warts | | | | | | Total | (Medium number of warts/fly ± SD) |
|------------------------------------|-------|-----------------|------|-------|------|------|--------|-------|-----------------------------------|
| | | Eyes | Head | Wings | Body | Legs | Halter | | |
| Negative Control (ethanol 5%) | 107 | 0 | 0 | 9 | 5 | 3 | 0 | 17 | 0,16 ± 0,48 |
| Positive Control (DXR 0.125 mg/mL) | 145 | 6 | 12 | 64 | 30 | 20 | 2 | 134 | 0,93 ± 1,27 + |
| Lapachol 20 µg/mL | 119 | 0 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 14 | 0,12 ± 0,23 - |
| Lapachol 40 µg/mL | 81 | 0 | 0 | 4 | 3 | 2 | 0 | 09 | 0,11 ± 0,31 - |
| Lapachol 60 µg/mL | 105 | 0 | 0 | 5 | 3 | 2 | 0 | 10 | 0,10 ± 0,32 - |
| Lapachol 20 µg/mL + DXR | 93 | 2 | 1 | 11 | 11 | 5 | 1 | 31 | 0,33 ± 0,68 * |
| Lapachol 40 µg/mL + DXR | 100 | 0 | 0 | 13 | 11 | 3 | 0 | 27 | 0,27 ± 0,48 * |
| Lapachol 60 µg/mL + DXR | 125 | 0 | 2 | 14 | 9 | 0 | 2 | 27 | 0,22 ± 0,62 * |

Diagnose (+) positive, (-) negative, according to Mann-Whitney test. Probability levels $\alpha = 0,05$, when compared with negative control (ethanol 5%).

*, $P \leq 0.05$ vs DXR alone. DXR, doxorubicin.

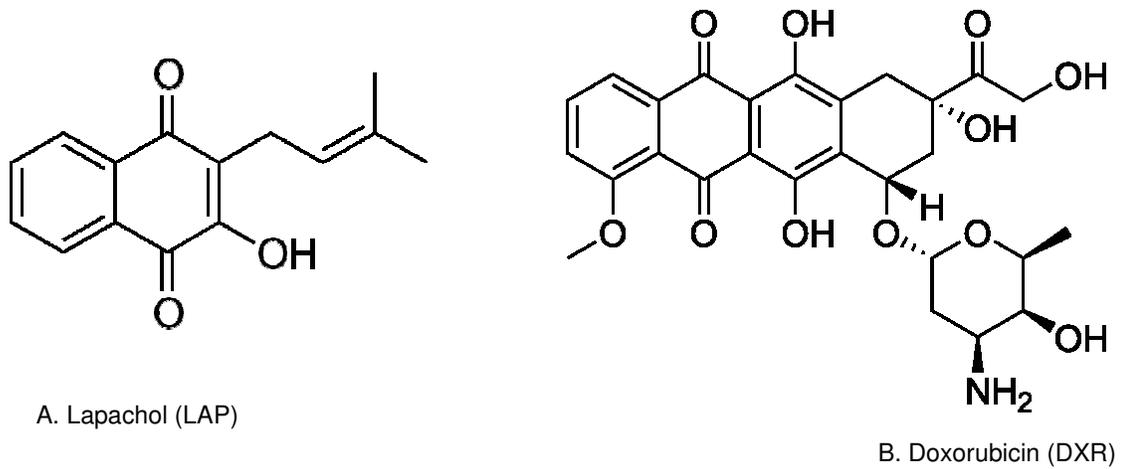


Figure 1. Chemical structures of LAP (A) and DXR (B).

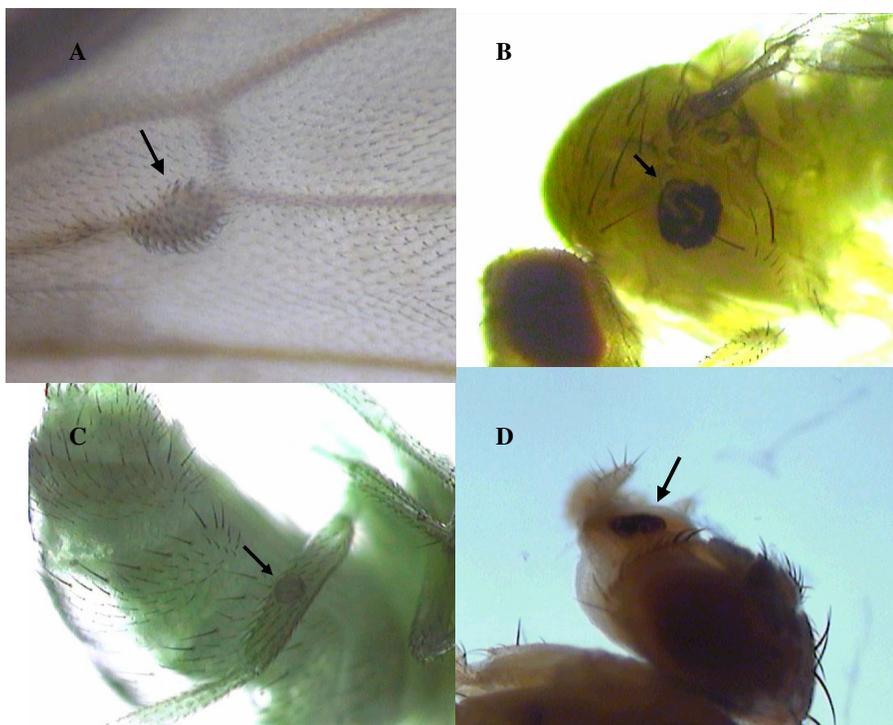


Figure 2. Tumours *wts* (arrows) found in several parts of the body of *Drosophila*. (A) Tumour in wing. (B) Tumour in body. (C) Tumour in leg. (D) Tumour in head.

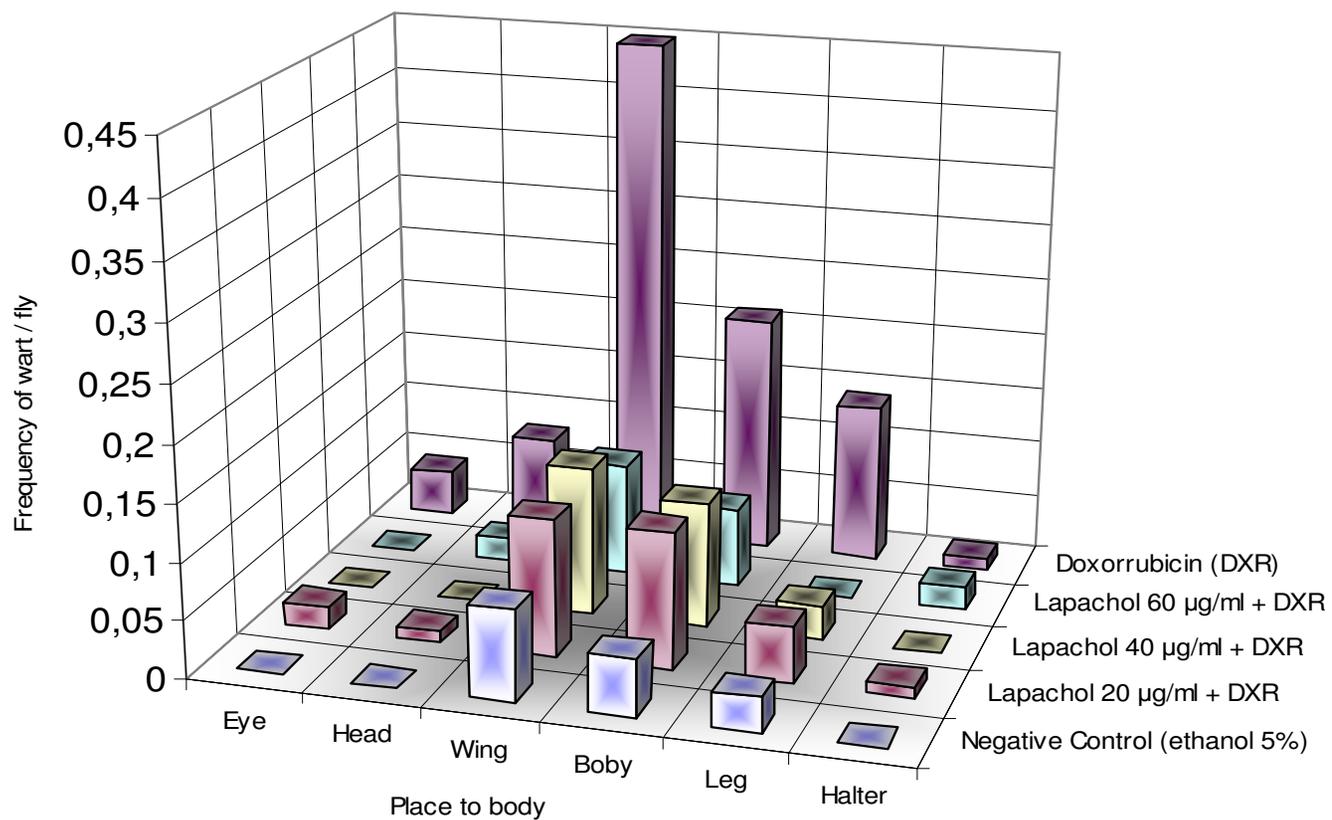


Figure 3. Frequency of the tumour after chronic treatment with different concentrations of lapachol associated with DXR (0.125 mg/mL), according by with body region of *Drosophila*.

References

1. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM: Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66:1022–1037, 2003.
2. Kinghorn AD, Farnsworth NR, Soejarto DD, *et al*: News strategies for to discovery of plants derivatives anticancer agents. *Pharm Biol* 41:53–67, 2003.
3. Subramanian B, Nakeff A, Tenney K, *et al*: Um novo paradigma para o desenvolvimento de agentes anticancer de produtos naturais. *J Exp Ther Oncol* 5:195-204, 2006.
4. Ravelo AG Estévez-Braun A, Chávez-Orellana H, *et al*: Recent studies on natural products as anticancer agents. *Curr Top Med Chem* 4:1-25, 2004.
5. Silva MN; Ferreira VF, Souza MCBV: An overview of the chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on β -lapachone and derivatives. *Quim Nova* 26:407-416, 2003.
6. Bolton JL, Trush MA, Penning TM, *et al*: Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 13:135-160, 2000.
7. Boveris A, Docampo R, Turrens JF, *et al*: Effect of B-Lapachone on Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide Production in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 175:431-439, 1978.
8. Witte NV, Stoppani AO, Dubin M: 2-Phenyl-betalapachone can affect mitochondrial function by redox cycling mediated oxidation. *Arch Biochem Biophys* 432:129-135, 2004.
9. Oliveira MF: Contribuição ao conhecimento químico das espécies *Tabebuia serratifolia* Nichols e *Tabebuia rosa* Bertol. Tese de Doutorado, Curso de Pós-graduação em química orgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2000.

10. Carvalho LH, Rocha EMM, Raslan DS, *et al*: In vitro activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Braz J Med Biol Res* 21:485-487, 1998.
11. Grazziotin JD, Schapoval EE, Chaves CG, *et al*: Investigation phytochemistry and analgesic of *Tabebuia chrysotricha*. *J Ethnopharmacol* 36, p. 249-251, 1992.
12. Bonassa EMA. Enfermagem em quimioterapia. São Paulo, Ed. Atheneu; 1992
13. Hardman JG, Limbird L. As bases farmacológicas da terapêutica. 2005.
14. Schmandt R, Mills GB: Genomic components of carcinogenesis. *Clin Chem* 39:2375-2385, 1993.
15. Knudson AG: Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Science* 90: 10914-10921, 1993.
16. Edgar BA, Lehner CF: Developmental controls of cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science* 274:1646–1652, 1996.
17. Eeken JCJ, Klink I, van Veen BL, *et al*: Induction of Epithelial Tumours in *Drosophila melanogaster* Heterozygous for the Tumour Suppressor Gene *wts*. *Environ Mol Mutagen* 40:277–282, 2002.
18. Justice RW, Zilian O, Woods DF, *et al*: The *Drosophila* tumour suppressor gene *warts* encodes a homolog o-f human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev* 9:534-546, 1995.
19. Sidorov RA, Ugnivenko EG, Khovanova EM, *et al*: Induction of tumour clones in *D. melanogaste wts/ +* heterozygotes with chemical carcinogens. *Mutat Res* 498:181-191, 2001.
20. IARC. Overall Evaluations of Carcinogenicity. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Supplement 7. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 440 pp. 1987

21. O'Brien PJ, Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 80:1–41, 1991
22. Falkenberg MB: Quinonas. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª edição. Florianópolis: UFRGS editora, 2003. cap. 25, p. 657-683.
23. Kumagai Y, Tsurutani Y, Shinyashiki M, *et al*: Bioactivation of lapachol responsible for DNA scission by NADPH-cytochrome P450 reductase. *Environ Toxicol Pharmacol* 3:245-250, 1997.
24. Wang JC: DNA topoisomerase. *Annu Rev Biochem* 65:635-692, 1996.
25. Esteves-Souza, A, Figueiredo DV, Esteves A, *et al*: Echevarria, A. Cytotoxic and DNA- topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. *Braz J Med Biol Res* 40:1399-1402, 2007.
26. Krishnan P and Bastow KF: Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives – eleutherin, α lapachone, and β lapachone. *Biochem Pharmacol* 60:1367-1379, 2000.
27. Hussain H, Krohn K, Ahmad VU, *et al*: Lapachol: na overview. *Arkivoc* ii:145-171, 2007.
28. Balassiano IT, Paulo SH, Silva NH, *et al*: Demonstration of the lapachol as a potential drug for reducing cancer metastasis. *Oncol Rep* 13, 329-333, 2005.
29. Maeda M, Murakami M, Takegami T, Ota T: Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol. *Toxicol Appl Pharmacol* 229:232-238, 2008.
30. Castellanos JRG, Prieto JM, Heinrich M: Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) – A global ethnopharmacological commodity? *J Ethnopharmacol* 121: 1-13, 2009.

31. Lima NMF, Correia CS, Leon LL, *et al*: Antileishmanial Activity of Lapachol Analogues. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:757-761, 2004.
32. Santos AF, Ferraz PAL, Abreu FC, *et al*: Molluscicidal and trypanocidal activities of lapachol derivatives. *Planta Med* 67:92-93, 2001.
33. SILVA AJM, NETTO CD, LIMA WP, *et al*: Antitumoral, Antileishmanial and Antimalarial Activity of Pentacyclic 1,4-Naphthoquinone Derivatives . *J Braz Chem Soc* 20:176-182, 2009.
34. Lima NMF, Santos AF, Porfírio Z, *et al*: Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. *Acta Trop* 83:43-47, 2002.
35. Ravelo AG, Estevez-Braun A, Chavez-Orellana H, *et al*: Recent studies on natural products as anticancer agents. *Curr Top Med Chem* 4: 241-265, 2004.

CAPÍTULO 3

MANUSCRIPT FOR GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

Genotoxicity of lapachol evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*

Wender Ferreira Costa¹, Alaide Braga de Oliveira², and Júlio César Nepomuceno^{1,3*}

¹ Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia,
Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

² Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos
Farmacêuticos, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

³ Centro Universitário de Patos de Minas, Laboratório de Citogenética e Mutagenese, Patos de
Minas, Minas Gerais, Brasil.

Runnig title: Genotoxic effect of lapachol

*Send correspondence to Júlio César Nepomuceno. Instituto de Genética e Bioquímica,
Universidade Federal de Uberlândia, Av. Para 1720, Uberlândia, Minas Gerais, 38400-902,
Brasil. *E-mail address:* nepomuceno@ufu.br.

Abstract

This study investigated the genotoxicity of Lapachol (LAP) evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster* in the descendants from standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses. This assay detects the loss of heterozygosity of marker genes expressed phenotypically on the fly's wings. *Drosophila* has extensive genetic homology to mammals, which makes it a suitable model organism for genotoxic investigations. Larvae of three days were used, resulting from ST cross (females *flr³/TM3, Bd^s* x males *mwh/mwh*), with basal levels of the cytochrome P450 and larvae of high metabolic bioactivity capacity (HB cross) (females *ORR; flr³/TM3, Bd^s* x males *mwh/mwh*). The results showed that LAP is a promutagen, exhibiting genotoxic activity in larvae from the HB cross, in other words, there is an increase in the frequency of spots occurring only in individuals with a high level of the cytochrome P450. Results also indicate that recombinogenicity is the main genotoxic event induced by LAP.

Keywords: Drosophila melanogaster, SMART, Lapachol, Doxorubicin, Cytochrome P450

Approximately two-thirds of the biological diversity of the world is found in tropical zones, mainly in developing countries. Brazil is considered the country with the greatest biodiversity on the planet, forming several biomes (Vieira, 1999).

The *Cerrado* is the second largest ecological dominion of Brazil, where a continuous herbaceous stratum is joined to an arboreal stratum, with variable density of woody species. The *Cerrado* covers a surface area of approximately 25% of Brazilian territory, and around 220 species found in the *Cerrado* are reportedly used in traditional medicine (Vieira and Martins, 1998).

Lapachol (LAP), 4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)naphthalene-1,2-dione, is a naphthoquinone found in many vegetable species related to the *Bignoniaceae* family, specifically those belonging to the plant genus *Tabebuia* (*Tabebuia aurea*, *Tabebuia impetiginosa*, *Tabebuia ochracea*) found in the *Cerrado*. It is endowed with antimicrobial qualities that allow it to combat bacteria, fungi, viruses, inflammations, and most importantly it is a cancer-fighting agent (Fonseca *et al.*, 2004; Castellanos *et al.*, 2009).

This quinone showed significant in vivo antitumor activity in some early mouse models Rao *et al.*(1968), and was advanced to clinical trials by the National Cancer Institute (NCI) in the 1970s. However, in 1974, the NCI concluded that the high concentrations necessary for this drug to act as an effective chemotherapeutic agent in human cancer unfortunately also resulted in very toxic side effects, and LAP was discarded as an effective anticancer chemotherapeutic (Suffness and Douros, 1980; Castellanos *et al.*,2009). Recent results showed that lapachol, isolapachol, and its acetyl derivative possess significant activity against *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni* (Santos *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2002). Antileishmanial activity Lima *et al.* (2004) was found to be working against certain viral strains including herpes virus Types I and II (Silva *et al.*, 2002). The LAP was shown to be a vitamin K-antagonist antigen, and, thus, might target vitamin K-dependent

reactions (Dinnen and Ebisuzaki, 1997) and is also to be bioactivated by P450 reductase to reactive species, which promote DNA scission through redox cycling with generation of free radicals (Kumagai *et al.*, 1997).

The enzyme responsible for bioactivation of lapachol, leading to generation of ROS that can cause DNA damage was unknown. An immunoinhibition study with antibody against cytochrome P450 reductase (P450R) revealed that P450R was a predominant enzyme catalyzing one-electron reduction of lapachol (Kumagai *et al.*, 1997).

Generation of reactive oxygen species, superoxide anion radical and hydroxyl radical during metabolism of LAP by P450 reductase was confirmed by acetylated cytochrome reduction assay in the absence and presence of Cu, Zn-SOD (Superoxide Dismutase), and electron spin resonance (ESR) studies (Kumagai *et al.*, 1997).

A number of synthetic derivatives of lapachol, such as mono-(arylimines)-o quinones derived from β -lapachone, also inhibit the activity of the enzyme topoisomerases (Esteves-Souza *et al.*, 2007). The DNA supercoiling is a precisely regulated process that influences DNA replication, transcription, and packaging. The DNA topoisomerases are enzymes that modulate the topological state of DNA.

The wing somatic mutation and recombination test (SMART) using *Drosophila melanogaster*, is capable of detecting a vast range of genetic abnormalities, such as, mutation, deletion, and somatic recombination (Graf *et al.*, 1984; Wurgler *et al.*, 1984). During the embryonic development of *D. melanogaster*, imaginal disc-cell groups proliferate mitotically during the larvae growth, until they differentiate during metamorphosis of body structures of the adult insect. If genetic alteration occurs in one of the imaginal disc cell, these changes will be present in all the following cells, and will form a mutant cell clone. That being the case, the mutant cells will be detected as a spot of mutant trichome on the adult insect's wings (Guzmán-Rincón and Graf, 1995).

The doxorubicin (DXR) drug is capable of creating a variety of free radicals in cells, and its capability has been considered critical in its antitumoral effect (Keizer *et al.*, 1990). Production of free radicals acts directly on the nucleus, thus creating unfavorable conditions for cell division. This cytotoxic mechanism appears to be the principal antitumoral effect of DXR (Keizer *et al.*, 1990). Doxorubicin is also a genotoxic agent that inhibits the activity of the enzyme topoisomerase II, resulting in the accumulation of DNA strand breaks that, if not repaired by the cell, can provoke mutations and chromosomal aberrations (Islaih *et al.*, 2005). In *D. melanogaster*, DXR was analyzed using SMART test that was classified as a strong mutagen inducing all types of spots (Frei *et al.*, 1985).

Hence, the objective of the present study was to evaluate the genotoxic effects of LAP, using the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. We have evaluated the influence of differences in the level of cytochrome P450s on the genotoxic activity of the LAP. For this purpose, the standard (ST) and high-bioactivation (HB) crosses of *Drosophila* were used. The HB cross is characterized by an increased cytochrome P450-dependent bioactivation capacity for promutagens when compared with that of the ST.

The DXR commercially known as Adriblastina[®] RD (CAS 23214-92-8) (lot n° G0421), manufactured by Pharmacia & Upjohn S.p.A.—Milan, Italy, imported and distributed by Pharmacia of Brazil, Ltd. Each ampoule of Adriblastina[®] RD contains: chlorohydrate of doxorubicin (10 mg); methylparabene (1 mg); lactose (50 mg), Registry Number 1.2389.0046, in the Ministry of Health.

Lapachol (CAS 84-79-7) was provided by Dr. A. B. Oliveira (Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). Molecular structures of the test drugs are depicted in Figure 1. Solutions of these compounds were made with ethanol 5% just before use.

Three mutant strains of *Drosophila melanogaster* (*ORR*, *flr*³ and *mwh*), were used having the genetic markers of *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0.3) and *flare-3* (*flr*³, 3-38.8).

To produce the ST cross, the stock strains were crossed in the following way: female virgins *flr*³/*In*(3 LR)*TM3*, *ri pp sep I(3)89Aa bx*^{34e} and *Bd*^s crossed with males *mwh/mwh* (Graf *et al.*, 1989).

The high metabolic bioactivation cross, which had high and constitutive levels of cytochrome P450 was achieved by crossing the following genetic strains: female virgins *ORR/ ORR*; *flr*³/*In*(3 LR)*TM3*, *ri p^p sep I(3)89Aa bx*^{34e} and *Bd*^s crossed with males *mwh/mwh* (Graf and Schaik 1992).

The larvae of both genotypes, resulting from these crosses, were treated simultaneously with LAP, so that later they could come in contact with the chemical agents that were tested.

Larvae descendants from the ST cross and HB cross were collected over an 8-h period in culture jars containing a solid agar base (3% of agar in water) with a layer of live baker's yeast (*Sachcaromyces cerevisiae*) and sugar added. After three days, the larvae (72 ± 8h) were washed out with tap water with the help of a fine meshed stainless steel strainer.

Larvae from both crossings were transferred to glass tubes of (2.5 cm diameter and 8.0 cm height), containing 1.5 g of instant mashed potatoes (HIKARI, Lot n° L3068DD, São Paulo, Brazil) and 5.0 mL of LAP (20, 40 and 60 µg/mL). The concentrations used in this experiment were based on studies of Rodrigues (2005) on the lethal dose of lapachol in *Aedes aegypti* larvae. The DXR (0.125 mg/mL) constituted positive control, whereas ethanol 5% was used for negative control. Because some compounds are photosensitive, all the tubes were wrapped in aluminum foil. Both control and treated larvae were allowed to feed on the mashed potatoes, until pupation (48 h).

Each cross produce two types of progeny, that is, marker-heterozygous (MH) (*mwh flr⁺ /mwh⁺ flr³*) and balancer-heterozygous (BH) (*mwh flr⁺ /mwh⁺ TM3, Bd^s*) flies, The dominant *Bd^s* marker allows the wings of these two genotypes to be distinguished.

The agents tested (LAP and DXR) were prepared in ethanol 5% when the larvae were treated. All experiments were performed at a temperature of (25 ± 2 °C) and at a humidity of 65%.

After hatching, the individual adults that emerged were transferred into a recipient containing 70% ethanol, and the wings were mounted on slides with Faure's solution, and analyzed under a compound microscope at 400x magnification (Graf *et al.*, 1984).

Frequency and the size of single and twin spots were recorded.

The statistical analysis of the experiment to verify possible genotoxic action of LAP was carried out using a test described by Frei and Würgler (1988), which makes four different diagnoses: positive, weakly positive, negative, or inconclusive. The frequency of each type of mutant clone per fly of a treated series was compared pairwise (i.e., control vs. LAP) using the conditional binomial test of Kastenbaum and Bowman (24). For the final statistical analysis of all positive outcomes, the nonparametric Mann-Whitney *U*-test with significance levels $\alpha = \beta = 0.05$ was used to exclude false positives (Frei and Wurgler 1995).

All compounds were tested in two different experiments. The data were pooled after verifying that the two independent experiments were in agreement with good reproducibility. Table 1 shows the frequency of mutant spots observed in the marker-heterozygous and balancer-heterozygous descendants of ST cross and HB cross. Statistically, significant elevation was not observed ($P > 0.05$) on the frequencies of the spots induced by Lapachol (LAP) in the ST cross, in the three treated doses, when compared to the negative control group, in all the category of spots. Differently, the descendants of HB cross produced a positive response, in the elevation on the frequencies of small single spots and on the total

spots (for 20, 40 and 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LAP). The DXR produced a positive response in both descendants ST and HB, and our data confirm that DXR is genotoxic in the assay.

Sousa *et al.* (2009) showed that a commercial preparation of powdered bark and stem of *Tabebuia impetiginosa* was toxic but did not induce somatic mutation and recombination in *D. melanogaster* from ST and HB crossbreeding. This absence of the genotoxicity attributed to powdered bark and stem of *Tabebuia impetiginosa* could be due to the low concentration of the lapachol on the exposed larvae. However, these authors indicated that powdered bark and stem of *T. impetiginosa* possess a considerable potentiating effect on DXR genotoxicity.

The analysis of flies with genotype *mwh/TM3* was carried out for the purpose of calculating the portion of recombinogenic and mutagenic events. It is possible to separate mutational events from recombinational events, because the recombinational events are eliminated in flies with this genotype. Comparison of the clone-induction frequencies obtained for DXR in both genotypes indicates that in ST flies; 12% of mutant clones produced by DXR were due to mutation and 88% due to recombination. Also, this same analysis showed that in HB flies, 21% of spots induced by DXR were due to mutation, and 79% due to recombination. The strong recombinagenic activity of DXR in somatic cells of *D. melanogaster* was earlier reported by Lehmann *et al.* (2003) and Costa and Nepomuceno (2006) and Fragiorge *et al.* (2007). Our results indicate that recombinogenicity is the major genotoxic effect of LAP 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (approximately, 67% recombination), LAP 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (approximately, 65.5% recombination), and LAP 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (approximately, 70% recombination). The literature showed that there are no articles under LAP genotoxicity, and the mutagenicity of this chemical was only studied on the Ames test (Krishnan and Bastow, 2000). However, the mitotic recombinagenic activity had not been demonstrated and did not quantify. This recombinagenic activity is demonstrated in this study and also found in DXR (another quinone), which again shows similarities in the effects of these drugs.

Numerous quinones play vital roles in the biochemistry of living cells, and exert relevant biological activities. The cytostatic and antimicrobial activities of these quinones emerge by virtue of their ability to act as potent inhibitors of electron transport, as uncouplers of oxidative phosphorylation, as DNA intercalating agents, as bioreductive alkylating agents, and as producers of reactive oxygen radicals by redox cycling under aerobic conditions (Lima *et al.*, 2002).

The main mechanism used by LAP to induce toxicity is its capacity to induce oxidative stress (Silva *et al.*, 2003). Studies conducted by Kumagai *et al.* (1997) and Kumagai and Shimojo (2002) demonstrated that oxidative stress induced by LAP occurs in response to the **P450 reductase enzyme**, causing changes in the DNA. The LAP itself does not have a direct effect on DNA, however, when it interacts with the Cytochrome **P450**, the effect on DNA can be observed. Similar results were obtained in our study that showed an increase in the frequencies of the mutant spots induced by LAP in descendants from HB cross. The DNA changes require the bioactivation processed by the cytochrome P450 reductase (CPR), a diflavin enzyme (Kumagai *et al.*, 1997). Shiah *et al.* (1999) were able to demonstrate that the beta-lapachone (semi- synthetic derivate of LAP) is able to increase the levels of H₂O₂ and O₂^{•-} (oxidative stress) in leukemia cells of HL-60 inducing therefore apoptosis in later stages. The same authors showed that the induced apoptosis can be related or linked to increased cell levels of H₂O₂ activated by NAD (P)H/ quinone oxidoreductase.

Quinones are used as a chemotherapy agent since they act much like LAP. Doxorubicin (DXR) is capable of producing a series of free radicals in the cell (Keizer *et al.*, 1990). These free radicals produced by DXR act directly on the nucleus, generating unfavorable conditions for cell division (multiplication). This cytotoxic mechanism is one of the agents responsible for the anticancer effects of DXR (Keizer *et al.*, 1990). The DXR requires a metabolic

reduction of the quinone ring for the semiquinone radical to produce a toxic effect (Ramji *et al.*, 2003).

On the other hand, Krishnan and Bastow (2000) also indicated that LAP was involved in interference with the normal function of topoisomerase II (topo II) enzyme. Esteves-Souza *et al.* (2007) showed the inhibitory effects of human DNA-topoisomerase II- α by LAP amine derivatives. According to Esteves-Souza *et al.* (2007) the inhibitory action on DNA-topoisomerase II- α was also evaluated by a relaxation assay of supercoiled DNA plasmid, and the etoposide (200 μ M) was used as positive control. A significant inhibitory action of the enzyme was observed, and all amine derivatives of LAP were more active than the corresponding lawsone derivatives. Cunha *et al.* (2006) showed that derivatives of lapachol presented significant inhibition of topo II- α catalytic activity at the 2 μ M dose. This interference in the DNA-Topo II-drug complex may produce a DNA topology that favors the occurrence of recombinational events (Baguley and Ferguson, 1998). Lehmann *et al.* (2003) invoked a similar mechanism to account the homologous recombination induced by DXR.

Although homologous recombination is an important pathway of DNA repair, there is growing evidence that deleterious genomic rearrangements may result from homologous recombination, which means that homologous recombination events may play a causative role in carcinogenesis (Arossi *et al.*, 2009). The transformation of normal cells into cancer cells is a multistep process, while mitotic recombination is a mechanism involved in bringing about such transformation (Nowell, 1976; Barrett, 1993). In heterozygous cells, bearing a mutant and normal alleles for a tumor suppressor gene, the somatic recombination may turn up to be a promoter of neoplasms by inducing homozygosis of the mutant tumor suppressor, allele (Maher *et al.*, 1993; Sengstag, 1994).

It can be said that LAP, a quinone belonging to the naphthoquinone group in experimental conditions mentioned in this study has a genotoxic activity through

recombination verified by using the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. This genotoxicity was only observed in the descendants of the crossing of high metabolic bioactivation (HB). These results demonstrate that LAP, in the analyzed concentration, is an indirect genotoxic agent, and therefore indicates the need for metabolic bioactivation by the P450 cytochrome enzyme.

Acknowledgements

This study was funded by the Brazilian agencies CNPq, CAPES, and FAPEMIG under the auspices of the Universidade Federal de Uberlândia and Centro Universitário de Patos de Minas.

References

- Arossi GA, Dih RR, Lehmann M, Cunha KS, Reguly ML and Andrade HHR (2009) In vivo genotoxicity of dental bonding agents. *Mutagenesis* 24:169-172.
- Baguley BC and Ferguson LR (1998) Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* 1400:213–222.
- Barrett JC (1993) Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect* 100:9-12.
- Castellanos JRG, Prieto JM and Heinrich M (2009) Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) – A global ethnopharmacological commodity? *J Ethnopharmacol* 121:1-13.
- Costa WF and Nepomuceno JC (2006) Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 47:18-24.
- Cunha AS, Lima ELS, Pinto AC, Esteves-Souza, A, Echevarria A, Camara CA, Vargas MD and Torres JC (2006) Synthesis of Novel Naphthoquinone-Spermidine Conjugates and their Effects on DNA-Topoisomerases I and II- α . *J Braz Chem Soc* 17:439-442.
- Dinnen RD and Ebisuzaki K (1997) The search for novel anticancer agents: a differentiation-based assay and analysis of a folklore product. *Anticancer Res* 17:1027-1033.
- Esteves-Souza A, Figueiredo DV, Esteves A, Câmara CA, Vargas MD, Pinto AC and Echevarria A (2007) Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. *Braz J Med Biol Res* 40:1399-1402.
- Fonseca SGC, Silva LBL, Castro RF and Santana DP (2004) Validação de metodologia analítica para doseamento de soluções de lapachol por clae. *Quim Nova* 27:157-159.
- Fragiorge EJ, Spanó MA and Antunes LMG (2007) Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Biol* 30:449-455.

- Frei H, Würgler FE, Juon H, Hall CB and Graf U (1985) Aristolochic acid is mutagenic and recombinogenic in *Drosophila* genotoxicity tests. *Arch Toxicol* 56:158-166.
- Frei H and Würgler FE (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat Res* 203:297-308.
- Frei H and Würgler FE (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res* 334:247-258.
- Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB and Kale PG (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6:153-188.
- Graf U, Frei H, Kägi A, Katz AJ and Würgler FE (1989) Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 222:359-373.
- Graf U and van Schaik N (1992) Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 271:59-67.
- Guzmán-Rincón J and Graf U (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor, In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, New York, Plenum Press, pp 169-181.
- Islaih M, Halstead BW, Kadura IA, Li B, Reid-Hubbard JL, Flick L and Altizer JL (2005) Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. *Mutat Res* 578:100-116.
- Kastenbaum MA and Bowman KO (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 9:527-549.
- Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ and Joenje H (1990) Doxorubicin (adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther* 47:219-231.

- Krishnan P and Bastow KF (2000) Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives-eleutherin, alpha lapachone, and beta lapachone. *Biochem Pharmacol* 60:1367-1379.
- Kumagai Y, Tsurutani Y, Shinyashiki M, Takeda,SH, Nakai Y, Yoskikawa T and Shimojo N (1997) Bioactivation of lapachol responsible for DNA scission by NADPHcytochrome P450 reductase. [Environ Toxicol Pharmacol](#) 3:245-250.
- Kumagai Y and Shimojo N (2002) Possible mechanisms for induction of oxidative stress and suppression of systemic nitric oxide production caused by exposure to environmental chemicals. *Environ Health Prev Med* 7:141-150.
- Lehmann M, Franco A, Souza Prudente Vilar K, Luíza-Reguly M and Andrade HHR (2003) Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 539:167-175.
- Lima NMF, Santos AF, Porfírio Z, Goulart MOF and Sant'ana AEG (2002) Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. *Acta Trop* 83:43-47.
- Lima NMF, Correia CS, Leon LL, Machado GMC, Madeira MF, Santana AEG and Goulart MOF (2004) Antileishmanial Activity of Lapachol Analogues. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:757-761.
- Maher VM, Bhattacharyya NP, Mah MC, Boldt J, Yang JL and McCormick JJ (1993) Mutations induced by 1-nitrosopyrene and related compounds during DNA replication in human cells and induction of homologous recombination by these compounds. *Res Rep Health Eff Inst* 40:41-51.
- Nowell P (1976) The clonal evaluation of tumour cell populations. *Science* 194:23-28.

- Ramji S, Lee C, Inaba T, Patterson AV and Riddick DS (2003) Human NADPH-cytochrome P-450 reductase overexpression does not enhance the aerobic cytotoxicity of doxorubicin in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 63:6914-6919.
- Rao KV, McBride TJ and Oleson JJ (1968) Recognition and Evaluation of Lapachol as an Antitumor Agent. *Cancer Res* 28:1952-1954.
- Rodrigues AMS, de Paula JE, Roblot F, Fournet A and Espíndola LS (2005) Larvicidal activity of *Cybistax antisyphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. *Fitoterapia* 76:755-757.
- Santos AF, Ferraz PAL, Pinto AV, Pinto MCRF, Goulart MOF and Sant'Ana AEG (2000) Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. *Int J Parasitol* 30:1199-1202.
- Sengstag C (1994) The role of mitotic recombination in carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol* 24:323-353.
- Shiah SG, Chuang SE, Chau YP, Shen SC and Kuo ML (1999) Activation of c-Jun NH2-terminal Kinase and Subsequent CPP32/Yama during Topoisomerase Inhibitor β -Lapachone-induced Apoptosis through an Oxidation-dependent Pathway. *Cancer Res* 59:391-398.
- Silva AJM, Buarque CD, Brito FV, Aurelian L, Macedo LF, Malkas LH, Hickey RJ, Lopes DVS, Noel F, Murakami YLB, Silva NMV, Melo PA, Caruso RRB, Castro NG and Costa PRR (2002) Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of new (\pm) 1,4-naphthoquinones structurally related to lapachol. *Bioorg Med Chem* 10:2731-2738.
- Silva MN, Ferreira VF and Souza CBV (2003) Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. *Quim Nova* 26:407-416.
- Sousa NC, Rezende AAA, Silva RMG, Guterres ZR, Graf U, Kerr WE and Spanó MA (2009) Modulatory effects of *Tabebuia impetiginosa* (Lamiales, Bignoniaceae) on doxorubicin-

induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. Genet Mol Biol 32:382-388.

Suffness M and Douros J (1980) Miscellaneous natural products with antitumor activity. In: JM Cassady and JD Douros (Eds) Anticancer Agents Based on Natural Product Models, Academic Press, New York, pp 474 .

Vieira RF and Martins MVM (1998) Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no Cerrado, In: Proc Int Savanna Simposium, Brasilia, DF, Embrapa/CPAC, pp 169–171.

Würgler FE, Sobels FH and Vogel E (1984) *Drosophila* as an assay system for detecting genetic changes. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedure, Amsterdam, Elsevier, pp 555-601.

Internet Resources

Vieira RF (1999) Conservation of Medicinal and Aromatic Plants in Brazil, <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1999/v4-152.html> (August 2, 2008).

Table 1 - Summary of results in the *Drosophila* SMART assay after treatment with Lapachol (LAP). Larvae from Standard (ST)

Cross and High Bioactivation (HB) Cross.

| Series | | Spots per fly (N° of spots); stat. diagnoses ^a | | | | | Spots with <i>mwh</i> clone ^c | Mean clone size class | Frequency of clone formation per 10 ⁵ cells ^d | |
|----------------------------|-------------|---|---|---|-------------|-------------|--|-----------------------|---|-------------------|
| DXR (mg/mL) | LAP (µg/mL) | N° of flies | Small single spots (1-2 cells) ^b | Large single spots (> 2 cells) ^b | Twin | Total spots | | | Observed | Control corrected |
| ST cross | | | | | | | | | | |
| <i>mwh/flr³</i> | | | | | | | | | | |
| 0 | 0 | 50 | 0.44 (22) | 0.08 (04) | 0.00 (00) | 0.52 (26) | 26 | 1.88 | 1.07 | |
| 0.125 | 0 | 50 | 0.84 (42) + | 0.52 (26) + | 0.52 (26) + | 1.88 (94) + | 68 | 2.49 | 2.79 | 2.86 |
| 0 | 20 | 60 | 0.52 (31) - | 0.08 (05) i | 0.00 (00) i | 0.60 (36) - | 36 | 1.83 | 1.23 | 0.16 |
| 0 | 40 | 60 | 0.32 (19) - | 0.07 (04) i | 0.02 (01) i | 0.40 (24) - | 23 | 2.04 | 0.79 | - 0.28 |
| 0 | 60 | 60 | 0.35 (21) - | 0.10 (06) i | 0.03 (02) i | 0.48 (29) - | 27 | 2.11 | 0.92 | - 0.14 |
| <i>mwh/TM3</i> | | | | | | | | | | |
| 0 | 0 | 50 | 0.04 (02) | 0.04 (02) | | 0.08 (04) | 4 | 2.00 | 0.16 | |
| 0.125 | 0 | 50 | 0.10 (05) i | 0.06 (03) i | | 0.16 (08) i | 8 | 2.50 | 0.33 | 0.16 |

HB cross

mwh/flr³

| | | | | | | | | | | |
|-------|----|----|--------------|-------------|-------------|--------------|-----|------|------|------|
| 0 | 0 | 50 | 0.62 (31) | 0.04 (02) | 0.04 (02) | 0.70 (35) | 33 | 1.64 | 1.35 | |
| 0.125 | 0 | 50 | 2.04 (102) + | 0.22 (11) + | 0.32 (16) + | 2.58 (129) + | 113 | 1.64 | 4.63 | 3.28 |
| 0 | 20 | 60 | 0.93 (56) + | 0.10 (06) i | 0.02 (01) i | 1.05 (63) + | 62 | 1.55 | 2.12 | 0.77 |
| 0 | 40 | 60 | 1.08 (65) + | 0.13 (08) i | 0.07 (04) i | 1.28 (77) + | 73 | 1.70 | 2.49 | 1.14 |
| 0 | 60 | 60 | 1.25 (75) + | 0.10 (06) i | 0.05 (03) i | 1.40 (84) + | 81 | 1.54 | 2.77 | 1.41 |

mwh/TM3

| | | | | | | | | | | |
|-------|----|----|-------------|-------------|--|-------------|----|------|------|--------|
| 0 | 0 | 50 | 0.44 (22) | 0.08 (04) | | 0.52 (26) | 26 | 1.58 | 1.07 | |
| 0.125 | 0 | 50 | 0.44 (22) - | 0.04 (02) i | | 0.48 (24) - | 24 | 1.46 | 0.98 | - 0.08 |
| 0 | 20 | 50 | 0.30 (15) - | 0.04 (02) i | | 0.34 (17) - | 17 | 1.29 | 0.70 | - 0.37 |
| 0 | 40 | 50 | 0.40 (20) - | 0.02 (01) - | | 0.42 (21) - | 21 | 1.48 | 0.86 | - 0.20 |
| 0 | 60 | 50 | 0.40 (20) - | 0.00 (00) - | | 0.40 (20) - | 20 | 1.20 | 0.82 | - 0.25 |

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler (1988): +, positive; -, negative; i, inconclusive; m, multiplication factor. Kastenbaum-Bowman tests, one sided. Probability levels $\alpha = \beta = 0.05$.

^bIncluding rare *flr³* single spots.

^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^dFrequency of clone formation: clones/flies/48,800 cells (without size correction).

DXR, doxorubicin; LAP, lapachol.

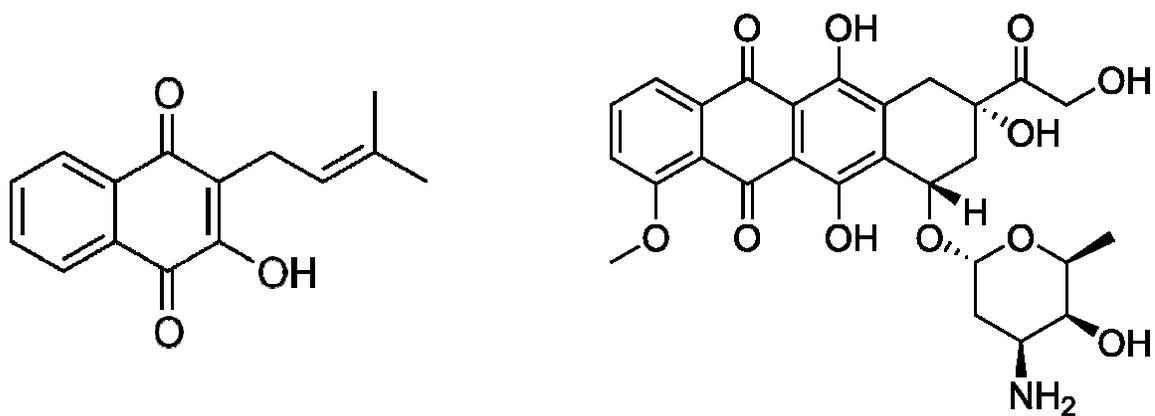


Fig. 1. Chemical structures of LAP and DXR.

CAPÍTULO 4

MANUSCRIPT FOR FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY

Avaliação dos efeitos antigenotóxicos da beta-lapachona associada à doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Wender Ferreira Costa¹, Alaide Braga de Oliveira², e Júlio César Nepomuceno^{1,3*}

¹ Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

² Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

³ Centro Universitário de Patos de Minas, Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Patos de Minas, Minas Gerais, Brasil.

Correspondência para: Júlio César Nepomuceno, Universidade Federal de Uberlândia, Laboratório de Mutagênese. Av. Pará 1720, Umuarama, Uberlândia, MG, 38400-902, Brasil. E-mail: nepomuceno@ufu.br .

Resumo

As naftoquinonas possuem um grande histórico de investigação no desenvolvimento de possíveis drogas, com um amplo espectro de aplicações em diversas patologias humanas. Dentre as naftoquinonas, temos a β -lapachona que atualmente tem chamado bastante atenção dos cientistas para a possível aplicação deste fármaco no combate ao câncer. Atualmente, existem quimioterápicos, utilizados no tratamento de pacientes com câncer, que trazem como efeitos colaterais a geração de radicais livres. Exemplo disso é o cloridrato de doxorrubicina (DXR). Em função do possível uso associado de agentes quimioterápicos e β -lapachona, utilizou-se o teste da mancha da asa em *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) para avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e/ou antigenotóxicos da β -lapachona nas concentrações (20, 40 e 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) isoladamente ou associada a DXR (0,125mg/mL). Foram utilizadas larvas de três dias de idade, resultantes dos cruzamentos padrão (ST) (fêmeas *flr³ / TM3, Bd^s* x machos *mwh/mwh*) e de alta capacidade de bioativação metabólica (HB) (fêmeas *ORR; flr³ / TM3, Bd^s* x machos *mwh/mwh*). Os resultados obtidos demonstraram que não houve aumento, estatisticamente significativo, nas freqüências de manchas mutantes, em ambos os descendentes do cruzamento ST e HB, quando se compara o controle negativo com a β -lapachona ($P > 0,05$). Por outro lado, quando a β -lapachona foi associada com a DXR houve uma significativa redução nas freqüências de manchas, nos descendentes do cruzamento padrão, em todas as concentrações testadas. Nos descendentes do cruzamento de alta bioativação tratados com a associação com DXR, esta redução das manchas mutantes ocorreu somente na maior concentração da β -lapachona (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($P < 0,05$).

Palavras chave: Naftoquinonas, topoisomerase, SMART, doxorrubicina, wing spot test.

Introdução

Apesar de todo o avanço tecnológico no tratamento do câncer, essa doença ainda é um desafio e os casos de cura ainda são raros. Os produtos naturais e a modificação química de substâncias antitumorais estão entre as mais importantes estratégias utilizadas na pesquisa de novas drogas antineoplásicas (Esteves-Souza *et al.*, 2008).

A β -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona) é uma quinona de ocorrência natural, extraída da *Tabebuia avellanedae*, que é encontrada na América do Sul e Central. A síntese e a química da β -lapachona têm sido investigadas desde o final do século XVIII (Hussain *et al.*, 2007).

Esta orto-naftoquinona tem sido amplamente estudada, principalmente por apresentar efeitos seletivos em linhagens tumorais quando comparados a linhagens normais. Vários mecanismos de ação das naftoquinonas se apresentam de forma dose e tempo-dependente. A inibição do crescimento celular observada pode ocorrer em função da indução da apoptose, inibição da topoisomerase II ou estresse oxidativo (Li *et al.*, 2003; Kongkathip *et al.*, 2004; Woo & Choi, 2005; Reinicke *et al.*, 2005).

Atualmente, existem vários tipos de inibidores da DNA topoisomerase e a camptotecina é um exemplo clássico de inibidor de topoisomerase I pela sua formação de um complexo estável na DNA topoisomerase e isso evita o relaxamento da fita de DNA. Por outro lado, temos a β -lapachona, que é um inibidor atípico pelo fato desta substância interagir diretamente com a DNA topoisomerase I, de uma forma muito intensa superior a estabilização pela formação de um complexo clivado promovido pela camptotecina (ERO) (Li *et al.*, 1993; Docampo *et al.*, 1979).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas durante a fosforilação oxidativa na mitocôndria sob condições normais. Através da cadeia transportadora de elétrons há um “vazamento” e forma radical livre, mais especificamente no complexo I e III, onde o oxigênio é transformado em O_2^- . Acredita-se que de 0,4-4% do oxigênio obtido pela célula, forma o O_2^- altamente reativo. Os baixos níveis de O_2^- na célula é sustentado pela presença de determinadas enzimas, dentre elas podemos destacar a superóxido dismutase e

os antioxidantes. A superóxido também é gerada pelo citocromo P450 no retículo endoplasmático, lipoxigenase, cicloxigenase, xantina oxidase e NADPH no citosol (Chen *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2007).

A sugestão de que a β -lapachona pode levar à formação de radicais livres de oxigênio pode ser a sua principal estratégia na toxicidade contra tumores humanos, porém, esse efeito geralmente leva à formação de intermediários que são altamente tóxicos para os sistemas biológicos (Asche, 2005).

De acordo com Cunha-Filho *et al.* (2006) há um forte interesse nos estudos da naftoquinona β -lapachona, pois nos últimos quinze anos existem pelo menos trezentos artigos sobre essa substância, além de quarenta pedidos de patentes. Isto sugere que estamos diante de um excelente potencial farmacológico e esta droga pode, em um curto intervalo de tempo, ser incluída no arsenal terapêutico. Mais recentemente, estudos têm sugerido que a β -lapachona apresenta, inclusive, potencial como droga antiangiogênica. Estudos feitos por Kung *et al.* (2007) demonstraram esta atividade antiangiogênica da β -lapachona, utilizando linhagem celular humana para endotélio vascular (EAhy926).

O uso da β -lapachona, em associação ou como adjuvante de terapias convencionais na luta contra o câncer, tem, também, despertado interesse de pesquisadores. De acordo com Park *et al.* (2005) existe um efeito sinérgico entre a radiação ionizante e a β -lapachona. No estudo, observou-se que as células neoplásicas irradiadas promoviam a ação da β -lapachona por meio da elevação dos níveis de NQO1 (Naftoquinona oxidoredutase-1), que é uma enzima transformadora desta naftoquinona de pró-droga em uma substância com efetiva ação.

O câncer de colon, fígado, mama, ovário, tireóide, adrenais e córneas possuem altas expressões de NQO1, quando comparado com tecidos normais. Apesar da maioria dos tumores apresentam uma super expressão desta enzima existe certos tipos de cânceres que apresentam em níveis normais. Por exemplo, o câncer de estômago e o de rim apresenta baixas concentrações de NQO1, quando comparados aos tecidos normais (Belinsky & Jaiswal, 1993; Siegel *et al.*, 2004). Devido ao fato da β -lapachona estar relacionada em vários trabalhos como sendo uma pró-droga, a presença dessa enzima torna-se muito interessante no combate às neoplasias.

O teste de mutação e recombinação somática (SMART) utilizando as asas de *Drosophila melanogaster*, é capaz de detectar um vasto espectro de anormalidades genéticas tais como, mutação, deleção e recombinação mitótica (Graf *et al.*, 1984; Würigler *et al.*, 1984). Durante a evolução embrionária da *D. melanogaster*, o grupo de células do disco imaginal, prolifera mitoticamente durante o crescimento da larva e eles diferenciam durante a metamorfose em estruturas do corpo do inseto adulto (olhos e asas). Se a alteração ocorrer em uma das células do disco imaginal, estas mudanças estarão presentes nas células que seguirão e formarão um clone de células mutantes. Neste caso, as células mutantes serão detectadas como uma mancha de pêlo mutante nas asas do inseto adulto (Guzmán-Rincon & Graf, 1995).

A droga antineoplásica doxorrubicina é capaz de gerar uma ampla variedade de radicais livres no sistema celular e com isso tem sido extensamente empregada (Keizer *et al.*, 1990). Existem alguns artigos que procuram associar a Doxorrubicina com a β -lapachona, dentre eles, podemos destacar o trabalho de Sutton *et al.* (2007) que associou essas duas substâncias. O trabalho visou demonstrar novas estratégias de biodisponibilizar esses quimioterápicos para a célula, quando encapsulados por micelas.

O objetivo do presente estudo são avaliações dos possíveis efeitos genotóxicos e/ou antigenotóxicos da β -lapachona. Este estudo também avaliou a influência de diferentes níveis de citocromo P450 na atividade genotóxica e/ou antigenotóxica da β -lapachona. Para este propósito, os cruzamentos padrão (ST) e alta bioativação metabólica de *Drosophila* foram usados. O cruzamento HB é caracterizado por um aumento da citocromo P450 dependente da capacidade de bioativação de prómutagêno quando comparado com o cruzamento ST.

Material e Métodos

Compostos químicos

A DXR (Figura-1) comercialmente conhecida como Doxolem[®] (CAS 23214-92-8) (lote nº 80344), fabricado pela Eurofarma Laboratório Ltda., São Paulo, SP, Brasil.

A β -lapachona (Figura 1) foi cedida pela Dr^a. A. B. Oliveira (Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). A estrutura molecular da droga testada está descrita na Figura-1. As soluções destes compostos foram feitas em etanol 5% momentos antes do tratamento.

Linhagens e cruzamentos de *Drosophila melanogaster*

Foram realizados dois tipos de cruzamentos: Cruzamento padrão (ST – “Standard Cross”) no qual fêmeas virgens da linhagem *flare³ (flr³/ln(3LR)TM3, ri pp sep l(3)89Aa bx34e e Bds*) foram cruzadas com machos *multiple wing hairs (mwh/mwh)* (Graf *et al.*, 1989); Cruzamento de alta bioativação (HB – “High Bioactivation Cross”), no qual fêmeas virgens de linhagem *ORR – flare³ (ORR/ORR, flr³/ln(3 LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^f)*, foram cruzados com machos *multiple wing hairs (mwh/mwh)* (Graf e Singer, 1992). Destes cruzamentos nasceram dois tipos de descendentes: trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH), que foram produzidos ao mesmo tempo. Esses descendentes são distintos fenotipicamente, devido ao marcador *TM3, Bd^f*. Os indivíduos MH (*mwh +/+ flr³*) apresentam os cromossomos estruturalmente normais, enquanto que os BH (*mwh +/+ TM3, Bd^f*) apresentam um cromossomo com múltiplas inversões (*TM3, Bd^f*).

Procedimentos para coletas de larvas

Larvas descendentes dos cruzamentos padrão e alta bioativação metabólica foram coletadas por um período de oito horas em frascos de cultura que continham uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) com uma camada de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) e açúcar. Após 72 horas, as larvas foram removidas e lavadas com auxílio de água, osmose reversa, e uma peneira de metal.

Procedimento experimental

As larvas de ambos os cruzamentos foram transferidas para um frasco de vidro de (2,5 cm diâmetro e 8,0 cm altura) contendo 1,5 g de purê de batatas (Yoki, Lote nº T1LH9J6, São Bernardo do Campos, SP, Brasil) e 5,0 mL de β -lapachona (20, 40 ou 60 μ g/mL) isoladamente ou associado com a

DXR (0,125mg/mL). Etanol 5% e DXR (0,125mg/mL) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Devido alguns dos componentes serem fotossensíveis, todos os tubos foram recobertos por uma folha de papel alumínio.

Os agentes testados (β -LAP, DXR e combinação de β -LAP com DXR) foram preparados em etanol 5% momentos antes de cada tratamento. Todos os experimentos foram mantidos a temperatura de $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$ e umidade relativa de 65%.

Preparação e análise microscópica das asas

Após a eclosão, os indivíduos adultos foram transferidos para um recipiente contendo etanol 70%. Para destacar as asas do corpo da *D. melanogaster*, utilizou-se um microscópio estereoscópico e pinças entomológicas. As asas foram embebidas em solução de Faure (30 g goma arábica; 20 mL glicerol; 50 g hidrato de cloral e 50 mL água) e estendidas sobre uma lâmina seca. Para a confecção final da lâmina permanente, sobre as asas foi adicionada uma lamínula, com uma gota de solução de Faure e, sobre estas, foram adicionados pesos de aproximadamente 400 g, para a eliminação de possíveis espaços preenchidos pelo ar. Esses pesos ficaram, aproximadamente, por um período de 2 horas.

As asas da *D. melanogaster* foram analisadas em microscópio de luz (objetiva 40x). Foram registrados o número e os tipos de manchas encontradas (simples ou gêmeas), assim como o tamanho das mesmas, e a posição em que se encontravam na asa. Ao final da análise, foram comparadas as frequências de mutações encontradas nas moscas tratadas com β -lapachona e as encontradas nos controles positivo e negativo, assim como, a comparação entre o controle positivo e a associação da doxorubicina com a β -lapachona.

Análise estatística

A análise estatística do experimento, para a verificação da possível ação genotóxica da β -LAP foi realizada por meio do teste descrito por Frei & Würigler (1988). Para a análise estatística de antigenotoxicidade, as frequências de

cada tipo de mancha por mosca, foram comparadas aos pares (ex. controle negativo versus β -LAP; agente genotóxico isoladamente versus β -LAP + agente genotóxico), usando o teste *U* de Mann, Whitney e Wilcoxon (FREI & WÜRGLER, 1995). As porcentagens de inibição da β -LAP foram calculadas, utilizando-se as freqüências de clones 10^5 células, corrigidas pelo controle, como se segue: $[(DXR - DXR \text{ associada a } \beta\text{-LAP}) / DXR] \times 100$ (Abraham, 1994).

Resultados e Discussões

A Tabela I mostra os tamanhos das manchas em asas de *Drosophila melanogaster*, classificadas como: manchas pequenas simples, manchas simples grandes, manchas gêmeas e o número total de manchas, assim como, o número de clones *mwh*, em cada tratamento. Os descendentes de constituição genética *flr³/In(3 LR)TM3*, *ri pp sep I(3)89Aa bx^{34e}* e *Bd^f* são chamados de balanceador heterozigoto, que possui múltiplas inversões o que impossibilita os eventos recombinacionais. Em cada asa são analisadas aproximadamente 24.400 células (Graf *et al.*, 1984).

A Tabela I mostra a freqüência de manchas pequenas simples, grandes, gêmeas e totais de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento padrão (ST) e cruzamento de alta bioativação metabólica (HB). Não foi observado um aumento significativo nas freqüências de manchas induzidas pela β -LAP, nas três doses testadas, quando comparado com o grupo de controle negativo ($P < 0,05$) em todos os tipos de manchas. A DXR (0,125 mg/ml) apresentou aumento significativo do número de manchas mutantes em relação ao controle negativo ($P < 0,05$). Quando a β -lapachona associada à DXR, mostrou redução quando comparado ao controle positivo e essa diferença foi estatisticamente significativa, nos descendentes do cruzamento padrão ($P < 0,05$). Na associação (DXR + β -lapachona) dos descendentes de alta bioativação metabólica houve redução significativa de manchas apenas na maior concentração da β -lapachona.

Pelo fato de não ter sido observado aumento das manchas mutantes em todos as doses de manchas, em ambos os cruzamentos, a β -lapachona não apresentou efeito genotóxico em *Drosophila melanogaster*. Esses resultados estão de acordo com Sousa *et al.* (2009) que ao utilizar o mesmo teste, SMART, não verificou efeito genotóxico de uma mistura complexa de *Tabebuia impetiginosa* que possuía na sua composição a substância β -lapachona.

Outro aspecto a ser considerado seria ao associar a β -lapachona com o quimioterápico doxorrubicina, nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento padrão, houve uma redução estatisticamente significativa no total de mancha ($P < 0,05$) evidenciando uma possível ação protetora direta da substância β -lapachona. Por outro lado, na associação dos descendentes de alta bioativação metabólica tiveram uma redução de manchas na maior concentração. Essa redução pode ter ocorrido devido a um possível efeito citotóxico da β -lapachona, em ambos os descendentes (ST e HB). Nossos resultados estão de acordo com Lee *et al.* (2005) que demonstrou uma forte ação citotóxica da β -lapachona na proliferação celular de uma linhagem humana de carcinoma prostático. De acordo com análises microscópicas mostraram uma clara distinção em termos de mudança morfológica das células.

Há indícios de que os efeitos citotóxicos da β -lapachona possam ser observados quando é administrada na forma de pró-droga sendo convertida em β -lapachona no microambiente ácido tumoral e posteriormente bioativada pela NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1 (NQO1), enzima produzida em grande quantidade em vários tipos de câncer humano. Dentre seus mecanismos de ação estão à indução de apoptose, inibição da topoisomerase II, inibição da telomerase e estresse oxidativo (Krishnan & Bastow, 2000; Lee *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003; Woo & Choi, 2005).

De acordo com Dong *et al.* (2009) a β -lapachona pode ser uma promissora droga terapêutica no combate ao câncer pois esta substância tem a capacidade de atuar com elevada histo-especificidade em locais que possuem uma elevada concentração de NQO1. Nossos resultados também sugerem possível capacidade protetora ao combate de tumores, potencializando o efeito genotóxico da doxorrubicina. Bey *et al.* (2007) acredita que a letalidade da β -lapachona pode ser melhorada com a combinação de novas estratégias de administração (devido

à insolubilidade com a água) assim com a sua administração combinada com drogas que já possuem o seu mecanismo de ação conhecido.

A Figura 2 mostra a distribuição de manchas dos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento padrão. De acordo com a figura, evidencia-se que o tamanho de manchas concentra-se nas primeiras classes de tamanho, ou seja, são manchas pequenas. A β -lapachona não apresentou aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas em nenhuma das classes. Quando associado à DXR houve redução do número das manchas em todas as classes de tamanho, principalmente nos descendentes de alta bioativação metabólica. Esses resultados estão de acordo com a hipótese de que uma vez biometabolizada a β -lapachona torna-se uma efetiva substância com potencial citotóxico. A biometabolização pode ser favorecida pela presença da NQO1, enzima responsável por transformar a pró-droga β -lapachona em uma substância com potencial antitumoral, enzima esta bastante abundante em uma grande variedade de tumores (Marin *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2005).

Finalmente, podemos concluir que, baseados nos resultados e nas condições experimentais mencionadas, que a β -LAP não é mutagênica e recombinogênica. Entretanto, a substância exerceu efeito protetor ou citotóxico, antes de ser biometabolizada em associação com o quimioterápico DXR (0.125mg/mL). Por outro lado, ao ser biometabolizada esta substância, pode potencializar o efeito da doxorrubicina e com isso apresentar um melhor resultado num possível tratamento quimioterápico. Logo, faz-se necessário a realização de novos ensaios que comprovem a ação carcinogênica ou antígenotóxica da β -lapachona.

Agradecimentos:

Os autores agradecem ao suporte financeiro da CAPES/ CNPq/UFU. Dr. Mário Antônio Spanó (Universidade Federal de Uberlândia) pelo constante incentivo, críticas e sugestões ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

Tabela I – Resultados do teste SMART em *Drosophila melanogaster* tratadas com β -Lapachona (β - LAP). Descendentes trans-heterozigotos (MH) do cruzamento padrão (ST) e cruzamento de alta bioativação metabólica (HB).

| Genótipos e concentrações | | | Manchas por indivíduo (Nº de manchas); diag. estatístico ^a | | | | |
|-----------------------------|---------------------|--------------|---|-----------------------------------|--------------|------------------|---|
| | | | Simples pequenas | Simples grandes | Gemeas | Total de manchas | Manchas <i>mwh</i> ^c clone (n) |
| DXR (mg/mL) | B-LAP (μ g/mL) | Nº de moscas | (1-2 cells) ^b m = 2 | (> 2 cells) ^b m = 5 | m = 5 | m = 2 | |
| <i>mwh/ftr</i> ³ | | | | | | | |
| Cruzamento ST | | | | | | | |
| 0 | 0 | 30 | 0,40 (12) | 0,07 (02) | 0,03 (01) | 0,50 (15) | 14 |
| 0,125 | 0 | 30 | 1,97 (59) + | 0,37 (11) + | 0,20 (06) ns | 2,53 (76) + | 69 |
| 0 | 20 | 40 | 0,40 (16) ns | 0,05 (02) ns | 0,00 (00) ns | 0,45 (18) ns | 18 |
| 0 | 40 | 40 | 0,25 (10) ns | 0,03 (01) ns | 0,03 (01) ns | 0,30 (12) ns | 12 |
| 0 | 60 | 40 | 0,23 (09) ns | 0,05 (02) ns | 0,00 (00) ns | 0,28 (11) ns | 11 |
| 0,125 | 20 | 40 | 0,48 (19) * | 0,20 (08) ns | 0,18 (07) ns | 0,85 (34) * | 27 |
| 0,125 | 40 | 40 | 0,35 (14) * | 0,15 (06) ns | 0,10 (04) ns | 0,60 (24) * | 20 |
| 0,125 | 60 | 40 | 0,30 (12) * | 0,13 (05) * | 0,23 (09) ns | 0,65 (26) * | 15 |

mwh/TM3

| | | | | | | | |
|-------|----|----|--------------|--------------|--|--------------|----|
| 0 | 0 | 30 | 0,07 (02) | | | 0,07(02) | 02 |
| 0,125 | 0 | 30 | 0,37 (11) + | 0,03 (01) + | | 0,40 (12) + | 12 |
| 0,125 | 20 | 30 | 0,20 (06) ns | 0,00 (00) ns | | 0,20 (06) ns | 06 |
| 0,125 | 40 | 30 | 0,23 (07) ns | 0,00 (00) ns | | 0,23 (07) ns | 07 |
| 0,125 | 60 | 30 | 0,27 (08) ns | 0,00 (00) ns | | 0,27 (08) ns | 08 |

Cruzamento HB***mwh/flr³***

| | | | | | | | |
|-------|----|----|--------------|--------------|--------------|---------------|-----|
| 0 | 0 | 60 | 0,90 (54) | 0,12 (07) | 0,00 (00) | 1,02 (61) | 60 |
| 0,125 | 0 | 60 | 0,93 (56) ns | 0,35 (21) + | 0,22 (13) + | 1,50 (90) + | 90 |
| 0 | 20 | 50 | 0,76 (38) ns | 0,04 (02) ns | 0,08 (04) + | 0,88 (44) ns | 44 |
| 0 | 40 | 50 | 0,82 (41) ns | 0,12 (06) ns | 0,02 (01) ns | 0,96 (48) ns | 48 |
| 0 | 60 | 50 | 0,66 (33) ns | 0,04 (02) ns | 0,04 (01) ns | 0,72 (36) ns | 36 |
| 0,125 | 20 | 80 | 1,01 (81) ns | 0,14 (11) + | 0,10 (08) ns | 1,25 (100) ns | 100 |
| 0,125 | 40 | 80 | 0,79 (63) ns | 0,23 (18) ns | 0,18 (14) ns | 1,19 (95) ns | 95 |
| 0,125 | 60 | 80 | 0,61 (49) + | 0,18 (14) + | 0,19 (15) ns | 0,98 (78) + | 78 |

mwh/TM3

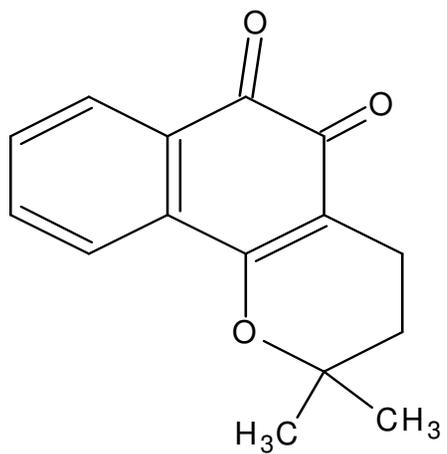
| | | | | | | |
|-------|----|----|--------------|--------------|--------------|----|
| 0 | 0 | 30 | 0,23 (07) | 0,03 (01) | 0,27(08) | 08 |
| 0,125 | 0 | 30 | 0,30 (09) ns | 0,00 (00) ns | 0,30 (09) ns | 09 |
| 0,125 | 20 | 30 | 0,30 (09) ns | 0,07 (02) ns | 0,37 (11) ns | 11 |
| 0,125 | 40 | 30 | 0,23 (07) ns | 0,00 (00) ns | 0,23 (07) ns | 07 |
| 0,125 | 60 | 30 | 0,27 (08) ns | 0,03 (01) ns | 0,27 (08) ns | 09 |

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1995); nível de significância: +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; ns, não significativo; m, fator de multiplicação; $p \leq 0,05$ vs. controle negativo; *, $p \leq 0,05$ vs. DXR.

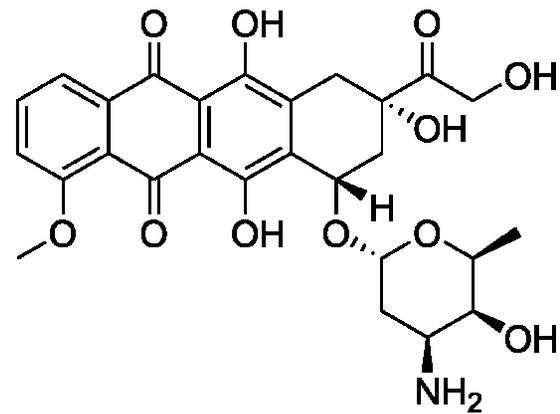
^bIncluindo manchas simples raras *flr*³.

^cConsiderando clones *mwh* de manchas simples *mwh* e manchas gêmeas.

DXR, doxorubicina; LAP, lapachol.



B-lapachona (β -LAP)



Doxorubicina (DXR)

Figura 1. Estrutura química da β -LAP e DXR.

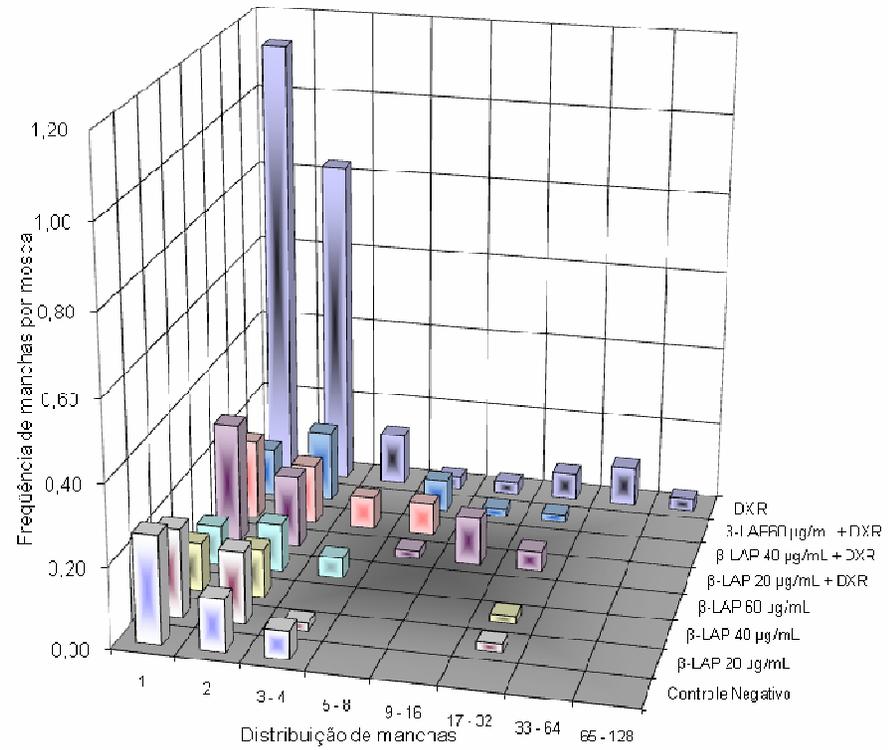


Figura 2 - Distribuição do tamanho de manchas nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento padrão (ST)

Referencias bibliográficas

Abraham, S. K. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. **Mutagenesis**, v. 9, . 4, p. 383-386, 1994.

Asche, C. Antitumour quinines. **Mini-Review: Med. Chem.** v. 5, p. 449–467, 2005.

Belinsky, M.; Jaiswal, A. K. NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 12, p.103-117, 1993.

Bey, E. A.; Bentle, M. S.; Reinicke, K. E.; Dong, Y.; Yang, C. R.; Girard, L.; Minna, J. D.; Bornmann, W. G.; Gao, J.; Boothman, D. A. An NQO1 and PARP-1 mediated cell death pathway induced in non-small lung cancer cells by β -lapachone. **PNAS**. v. 104, n. 28, p.11832-11837, 2007.

Chen, Q.; Crosby, M.; Almasan, A. Redox Regulation of Apoptosis before and after Cytochrome C Release. **Korean J Biol Sci.**, v. 7, p.1-9, 2003.

Cunha-Filho, M. S. S.; Landin, M.; Pacheco, R. M.; Marinho, B. D. β -lapachone. **Acta Crystallographica**, section C. p. 473-475, 2006.

Docampo R.; Cruz F. S.; Boveris A.; Muniz R. P.; Esquivel D. M. β -Lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by sarcoma 180 ascites tumor cells. **Biochem Pharmacol** v. 28, p. 723–728, 1979.

Dong, Y.; Chin, S. F.; Blanco, E.; Bey, E. A.; Kabbani, W.; Xie, X. J.; Bonmann, W. G.; Boothman, D. A.; Gao, J. Intratumoral delivery of β -lapachone via polymer implants for prostate cancer therapy. **Clin Cancer Res.** v. 15 n. 1, p. 131-139, 2009.

Esteves-Souza, A.; Lucio, K. A.; Cunha, A. S.; Pinto, A. C.; Lima, E. L. S.; Camara, C. A.; Vargas, M.D.; Gattass, C.R. Atividade antitumoral de novos conjugados e poliamino-naftoquinonas. **Oncology Reports**. v. 20, p. 225-231, 2008.

Ferreira, C. G.; Rocha, J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

Frei, H.; Würgler, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutat Res.**, v. 203, p.297-308, 1988.

Frei, H.; Würgler, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. **Mutat Res.**, v. 334, p.247-258, 1995.

Graf U.; Würgler, F. E.; Katz, A. J.; Frei, H.; Juon, H.; Hall, C. B.; Kale, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environ Mutagen** v. 6, p.153-188, 1984.

Graf, U.; Frei, H.; Kägi, A.; Katz, A. J.; Würgler, F. E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutat Res.**, v. 222, p.359-373, 1989.

Graf, U.; van Schaik, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res.**, v. 271, p. 59-67, 1992.

Guzmán–Rincón, J.; Graf, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor, In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, New York, Phenunm Press, pp. 169-181, 1995.

Hussain, H.; Krohn, K.; Ahmad, V. U.; Miana, G. A.; Green, I. R. Lapachol: an overview. **Arkivoc** . ii, p. 145-171, 2007.

Keizer, H. G.; Pinedo, H. M.; Schuurhuis, G.J.; Joenje, H. Doxorubicin (adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 47, N. 2, p. 219-231,1990.

Kongkathip N, Luangkamin S, Kongkathip B, Sangma C, Grigg R, Kongsaree P, Prappai S, Pradidphol N, Piyaviriyagul S, Siripong P. Synthesis of novel rhinacanthins and related anticancer naphthoquinone esters. **J Med Chem**. v. 47, p. 4427-4438, 2004.

Krishnan P, Bastow K F. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives-eleutherin, alpha lapachone, and beta lapachone. **Biochem Pharmacol**. v. 60, p. 1367-1379, 2000.

Kung, H. N.; Chien, C. L.; Chau, G. Y.; Don, M. J.; Lu, K. S.; Chau, Y. P. Involvement of NO/cGMP signaling in the apoptotic and anti-angiogenic effects of beta-lapachone on endothelial cells in vitro. **Journal Cell Physiol**. v. 211, p. 522-532, 2007.

Lee J H, Cheong J, Park Y M, Choi Y H. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by beta-lapachone in human prostate carcinoma cells. **Pharmacol Res**. v. 51, p. 553-560, 2005.

Li C.J.; Averboukh L; Pardee A. B. β -Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. **J Biol Chem**, v. 268, p. 22463–22468, 1993.

Li Y, Sun X, LaMont J T, Pardee A B, Li C J. Selective killing of cancer cells by beta -lapachone: direct checkpoint activation as a strategy against cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 100, p. 2674-2678, 2003.

Marin, A.; Lopes, A. C.; Hamilton, E. DT-diaphorase and cythrome B5 reductase in human lung and breast tumours. **Br J. Cancer**, v. 76, p. 923-929, 1997.

Park, H.J.; Ahn, K.I.; Ahn, S.D.; Choi, E.; Lee, S.W.; Williams, B.; Kim, E.J.; Griffin, R.; Bey, E.A.; Bornmann, W.G.; Gao, J.; Park, H.J.; Boothman, D.A.; Song, C.W. Susceptibility of cancer cells to β -lapachone is enhanced by ionizing radiation. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* v. 61, p. 212–219, 2005.

Reinicke K E, Bey E A, Bentle M S, Pink J J, Ingalls S T, Hoppel C L, Misico R I, Arzac G M, Burton G, Bornmann W G, Sutton D, Gao J, Boothman D A. Development of beta-lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 levels. *Clin Cancer Res.* v. 11, p. 3055-3064, 2005.

Siegel, D.D.L.; Gustafson, D.L.; Dehn, J.Y.; Han, P.; Boonchoong, L.J.; Ross, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol.*, v. 65, p.1238-1247, 2004.

Silva M N, Ferreira V F, Souza M C B V. An overview of the chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on β -lapachone and derivatives. *Química Nova.* v. 26, p. 407-416, 2003.

Sousa, N. C.; Rezende, A. A. A.; Silva, R. M. G.; Guterres, Z. R.; Graff, U.; Kerr, W. E.; Spano, M. A. Modulatory effects of *Tabebuia impetiginosa* (Lamiales, Bignoniaceae) on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Biology.* v. 32, n. 2, p. 382-388, 2009.

Sutton, D.; Wang, S.; Nasongkla, N.; Gao, J.; Dormidontova, E. E. Doxorubicin and β -lapachone release and interaction with micellar core materials: experiment and modeling. *Society for Experimental Biology and Medicine.* p. 1090-1099, 2007.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 39, p.44-84, 2007.

Woo H J, Choi Y H. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by beta-lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity. **Int J Oncol.**, v. 26, p. 1017-1023, 2005.

Würgler, F. E.; Sobels, F.H.; Vogel, E. *Drosophila* as an assay system for detecting genetic changes. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedure, Amsterdam, Elsevier, p. 555-601, 1984.

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](#)