

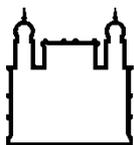
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE PIRANONAFTOQUINONAS
INIBIDORAS DE DNA TOPOISOMERASES SOBRE CÉLULAS DE
LEUCEMIA

MARIA EDUARDA ISMERIO MOREIRA DE OLIVEIRA

Rio de Janeiro
Agosto de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARIA EDUARDA ISMERIO MOREIRA DE OLIVEIRA

Avaliação do Efeito Citotóxico de Piranonaftoquinonas Inibidoras de DNA Topoisomerasas Sobre Células de Leucemia

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadores: Prof. Dr. Floriano Paes Silva Junior
Prof. Dr. Rafael Ferreira Dantas

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

O48 Oliveira, Maria Eduarda Ismerio Moreira de

Avaliação do efeito citotóxico de piranonaftoquinonas inibidoras de DNA topoisomerasas sobre células de leucemia / Maria Eduarda Ismerio Moreira de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2015.

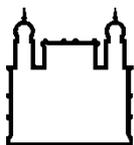
xv,85 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 69-85

1. Câncer. 2. Leucemia. 3. Naftoquinonas. 4. Topoisomerases. I. Título.

CDD 616.99419



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: MARIA EDUARDA ISMERIO MOREIRA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE PIRANONAFTOQUINONAS INIBIDORAS
DE DNA TOPOISOMERASES SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA**

**ORIENTADORES: Prof. Dr. Floriano Paes Silva Junior
Prof. Dr. Rafael Ferreira Dantas**

Aprovada em: 28/08/2015.

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza - Presidente
Prof. Dr. Débora Levy
Prof. Dr. François Noel
Prof. Dr. Fabio Passetti
Prof. Dr. Gabriel Limaverde Soares Costa Sousa

Rio de Janeiro, 28 de agosto de 2015

Dedicatória
À minha família, por acreditar sempre em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abrir tantas portas em minha vida e guiar-me sempre.

Aos meus pais, por tanto amor que me foi dado; pelo apoio e incentivo de cada dia; pelo colo nos momentos mais difíceis; pela vibração a cada conquista; pelo exemplo que sempre deram a mim e ao meu irmão.

Ao meu irmão, por fazer a minha vida mais alegre e me apoiar desde sempre.

Aos meus avós, que nunca mediram esforços para trazer felicidade, por me apoiarem incondicionalmente.

Aos meus tios Ronaldo e Luciane, por todo o carinho e acolhimento; pelos conselhos, oportunidades e disponibilidade em tempo integral.

À minha tia Maria Thereza, pela força nos momentos mais difíceis e comemorações a cada conquista.

Aos meus tios e primos, por todo carinho e apoio.

Aos que hoje, no céu, intercedem por mim, o meu agradecimento por serem eternos exemplos de vida.

Aos meus amigos, por compartilharem comigo as alegrias e também as angústias.

Aos meus orientadores, por todo o ensino, confiança e apoio.

A todos do LaBECFar, por dividirem comigo o conhecimento e a experiência; pelo apoio e convivência.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e atenção.

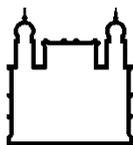
Ao Externato Santa Ignez, por desde cedo me dar base, não apenas educacional, mas para a vida.

À Unirio, por me apresentar e preparar para novas áreas de conhecimento.

À FIOCRUZ e ao IOC, pelo suporte, estrutura e apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente me apoiaram e me ajudaram a chegar até aqui.

“Combati o bom combate, completei a
corrida, guardei a fé” (2Tm 4, 7)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

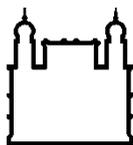
Avaliação do efeito citotóxico de pirano-naftoquinonas inibidoras de DNA topoisomerasas sobre células de leucemia

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Maria Eduarda Ismerio Moreira de Oliveira

Embora existam diversos tratamentos disponíveis atualmente, o câncer ainda é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo e a leucemia é responsável por muitas delas. Além dos fármacos atuais apresentarem diversos efeitos adversos, já foram relatadas diversas ocorrências de resistência celular a eles. Dessa forma, é imprescindível a busca por novos compostos com atividade anticancerígena eficaz, mas que detenham melhor perfil toxicológico. Nesse âmbito, destacam-se os inibidores projetados contra alvos com mutação ou superexpressos em células cancerosas, devido ao fato de permitirem maior seletividade. As topoisomerasas são enzimas essenciais para o desenvolvimento celular e estão superexpressas em células de câncer. Portanto, elas são alvos importantes na quimioterapia antitumoral. O lapachol, uma naftoquinona natural, e seus derivados parecem ser promissores para a oncoterapia e têm sido bastante investigados nos últimos tempos. Novos compostos derivados de α e β -lapachona inibidores de topoisomerasas (PNQs) foram avaliados quanto ao seu potencial efeito citotóxico em células de leucemia através de ensaios de viabilidade, apoptose e ciclo celular. As linhagens utilizadas apresentam mutações que permitem investigar a participação da via de morte mediada pelo Fas: a A3 é a linhagem selvagem, sensível à apoptose via Fas; a I2.1 é derivada da A3, sendo deficiente em FADD; e a I9.2, também derivada da A3, é deficiente em caspase-8. Tanto o FADD quanto a caspase-8 estão diretamente envolvidos com a via clássica de ativação do Fas. Também foi utilizada uma linhagem celular normal (WSS-1) para que fosse analisada a seletividade das PNQs. A maioria dos compostos mostrou-se eficaz contra as células leucêmicas e a comparação dos resultados obtidos entre elas indicou uma dependência parcial da ativação da via Fas para a atuação dessas PNQs. De acordo com os dados obtidos para a linhagem I9.2 no ensaio de apoptose, essa ativação do Fas não é necessariamente dependente de caspase-8. Além disso, a partir da administração dos compostos, foram observadas alterações no ciclo celular com predomínio de células na fase G2/M em relação ao controle. Esse efeito foi mais acentuado na linhagem A3, sugerindo que a presença da via completa do Fas possa estar relacionada a regulações do ciclo celular após o tratamento com os compostos. Embora menos seletivas que seus precursores, algumas PNQs foram mais potentes. Esse achado favorece o estudo futuro de modificações estruturais alternativas para essas moléculas, a fim de manter sua potência anticancerígena, mas que contribuam para aumentar sua seletividade. Juntos, os resultados encontrados permitem iniciar a elucidação da atuação intracelular desses novos derivados do lapachol.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Evaluation of the cytotoxic effect of pyranonaphthoquinones inhibitors of DNA topoisomerases over leukemia cells

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Maria Eduarda Ismerio Moreira de Oliveira

Even though there are diverse types of treatment currently available, cancer still is one of the main causes of morbidity and mortality in the world, and leukemia is responsible for many of them. In addition to presenting various side effects, it has been already reported many occurrences of cellular resistance to them. Therefore, the search for new compounds that present effective anticancer activity with a better toxicological profile is indispensable. In this context, stand out the inhibitors designed against mutated or overexpressed targets in cancer cells because they allow for more selectivity. Topoisomerases are essential enzymes to the cellular development and are overexpressed in cancer cells. Therefore, they are important targets on antitumor chemotherapy. Lapachol, a natural naphthoquinone, and its derivatives seem to be promising to oncotherapy, and have been widely investigated recently. New topoisomerase inhibitors derived from α and β -lapachone (PNQs) were evaluated as to their potential cytotoxic effect on leukemia cells through viability, apoptosis and cellular cycle assays. The cell lines that were used present mutations that allow investigating the participation of the Fas death pathway: A3 is a wild-type cell line, sensible to apoptosis by Fas; I2.1 is derived from A3, being deficient in FADD; and I9.2, also derived from A3, is deficient in caspase-8. Both FADD and caspase-8 are directly involved with the classical Fas activation pathway. A normal cell line (WSS-1) was also used in order to analyse the selectivity of the PNQs. The majority of the compounds have been shown to be effective against leukemia cells and the comparison of the results obtained among them indicated a partial dependency of the Fas pathway activation for the action of these PNQs. According to the data obtained from the I9.2 cell line on the apoptosis test, this Fas activation is not necessarily dependent on caspase-8. Besides, from the administration of the compounds, alterations in the cell cycle were observed, triggering a G2/M phase arrest. That effect was more marked on the A3 cell line, suggesting that the presence of the complete Fas pathway may be related to the regulations of the cell cycle after the treatment with the compounds. Although they were less selective than their predecessors, some PNQs were more potent. That finding stimulates future structural modification studies for these molecules, in order to keep their anticancer potency while increasing selectivity. Together, the results contribute to start elucidating the intercellular action of these lapachol derivatives.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xiv
1 Introdução	1
1.1 Câncer.....	1
1.1.1 Aspectos gerais.....	1
1.1.2 Tratamento.....	5
1.1.3 Topoisomerases.....	7
1.2 Leucemia.....	9
1.2.1 Aspectos gerais.....	9
1.2.2 Leucemia linfoblástica aguda	10
1.3 Morte celular.....	12
1.3.1 Apoptose	14
1.4 Métodos de estudo de citotoxicidade	17
1.4.1 Ensaio bioquímico	17
1.4.2 Ensaio baseado em imagem	18
1.4.3 Linhagens celulares	20
1.5 Quinonas e quimioterapia.....	21
1.5.1 Lapachonas.....	25
1.6 Justificativa.....	28
2 Objetivos	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29

3	Materiais e Métodos	30
3.1	Compostos avaliados	30
3.2	Cultura celular	31
3.3	Citotoxicidade dos derivados de piranonaftoquinonas sobre as células leucêmicas e normal.....	31
3.3.1	Análise da viabilidade celular	32
3.4	Análises de alto conteúdo (HCA, do inglês <i>High Content Analysis</i>) ...	32
3.4.1	Análise de apoptose.....	33
3.4.2	Efeitos sobre o ciclo celular.....	34
4	Resultados e Discussão	35
4.1	Viabilidade celular	35
4.2	Apoptose	46
4.3	Ciclo celular.....	59
5	Conclusões.....	66
6	Perspectivas	68
7	Referências Bibliográficas	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer no Brasil estimadas para o ano de 2014, segundo a Unidade da Federação.....	2
Figura 2: As seis características marcantes do câncer.	4
Figura 3: As duas novas características emergentes e seus mecanismos.	5
Figura 4: Resumo dos mecanismos de ação de alguns agentes da quimioterapia do câncer	7
Figura 5: Classificação geral das leucemias	9
Figura 6: Esquema da etiologia da LLA	11
Figura 7: Tipos de morte celular.....	13
Figura 8: Esquema com as duas principais vias apoptóticas	17
Figura 9: Esquema da origem das linhagens leucêmicas A3, I2.1 e I9.2.	21
Figura 10: Ciclo redox induzido por quinonas.	23
Figura 11: Estrutura básica de <i>p</i> -quinonas.....	24
Figura 12: Estrutura de naftoquinonas naturais e seus derivados.....	25
Figura 13: Estrutura geral das piranonaftoquinonas derivadas de α - e β -lapachona.....	30
Figura 14: Fluxo de trabalho em HCA.....	33
Figura 15: Curvas representativas de IC ₅₀	37
Figura 16: Mapa de relação estrutura-atividade (SAR) para a ação citotóxica das PNQs contra as linhagens de leucemia A3 (A), I2.1 (B) e I9.2 (C).....	44
Figura 17: Estrutura e IC ₅₀ dos compostos selecionados.....	46
Figura 18: Esquema representativo da classificação de morte celular.....	47
Figura 19: Representação dos percentuais de morte celular nas diferentes concentrações testadas em HCA.	48
Figura 20: Ensaio de apoptose por HCA.....	50
Figura 21: Ensaio de apoptose por HCA na linhagem A3.	52
Figura 22: Ensaio de apoptose por HCA na linhagem I2.1.	53
Figura 23: Ensaio de apoptose por HCA na linhagem I9.2	54
Figura 24: Comparação do efeito dos compostos sobre as diferentes linhagens testadas.....	56
Figura 25: Ensaio de ciclo celular por HCA.....	60
Figura 26: Ensaio de ciclo celular por HCA na linhagem A3.	62
Figura 27: Ensaio de ciclo celular por HCA na linhagem I2.1..	63
Figura 28: Ensaio de ciclo celular por HCA na linhagem I9.2	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade inibitória das PNQs contra topoisomerases	27
Tabela 2: Atividade citotóxica de PNQs durante 24 e 48h de incubação em células leucêmicas.	36
Tabela 3: Atividade citotóxica de PNQs durante 24 e 48h de incubação em células normais (WSS-1).....	39
Tabela 4: Índice de seletividade (IS) dos compostos em 48h de tratamento	41
Tabela 5: Relação entre efeito citotóxico das PNQs e respectivas atividades inibitórias contra topoisomerases	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIF – Fator indutor de apoptose

ATP – Adenosina trifosfato

DISC – Complexo de sinalização de indução de morte

DMSO - Dimetilsulfóxido

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidermal

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos

FLIP – Proteína inibidora da enzima conversora de interleucina1- β tipo FADD

HCA – Análise de alto conteúdo

HCI – Imageamento de alto conteúdo

HCS – Triagem de alto conteúdo

Her-2 – Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

HtrA2/Omi – Proteína A2 dependente de alta temperatura/endoprotease regulada por estresse Omi

HTS – Triagem de alta vazão

IAP – Proteína inibidora de apoptose

IC₂₀ – Concentração inibitória 20%

IC₅₀ – Concentração inibitória 50%

INCA – Instituto Nacional de Câncer

IP – Iodeto de propídeo

LLA – Leucemia linfoblástica aguda

LMA – Leucemia mielóide aguda

LLC – Leucemia linfoblástica crônica

LMC – Leucemia mielóide crônica

MCP – Morte celular programada

NCCD – Comissão de Nomenclatura em Morte Celular

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação de polimerase em cadeia

PNQ – Piranoftoquinona

RIPK1 – Receptor de interação proteína-cinase 1

RIPK3 – Receptor de interação proteína-cinase 3

Smac/DIABLO – Segundo ativador mitocondrial de caspases/Proteína inibidora direta de IAP de baixo ponto isoelétrico

T-LLA – Leucemia linfoblástica aguda de célula T

TNFR – Receptor do fator de necrose tumoral

Topo - Topoisomerase

TRAF2 – Receptor associado ao fator-2

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

1.1.1 Aspectos gerais

O termo câncer refere-se a um conjunto de mais de cem doenças que apresentam em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, através de um processo conhecido como metástase (1). Do ponto de vista bioquímico, o câncer é caracterizado pelo descontrole do ciclo celular, o que resulta em uma perda progressiva dos processos de diferenciação celular e um crescimento não-regulado (2). A homeostasia de células normais é resultado de um equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular, enquanto que nos processos malignos ocorre a falha de uma ou mais dessas condições (3).

O câncer representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, tendo sido registradas, em 2012, 8,2 milhões de mortes relacionadas à patologia (4). Com aproximadamente 14 milhões de novos casos confirmados, estima-se que esse número aumente em cerca de 70% dentro das próximas duas décadas (5). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 60% do total anual de novos casos de câncer no mundo ocorrem na África, Ásia e Américas Central e do Sul e essas regiões são responsáveis por 70% das mortes por câncer no mundo. No Brasil, a estimativa do INCA para o ano de 2014 aponta a ocorrência de aproximadamente 576.580 novos casos de câncer no país, sendo 302.350 referentes ao sexo masculino e 274.230 ao feminino (Figura 1). As maiores taxas de incidência de câncer estão concentradas principalmente nas regiões sul e sudeste (6).

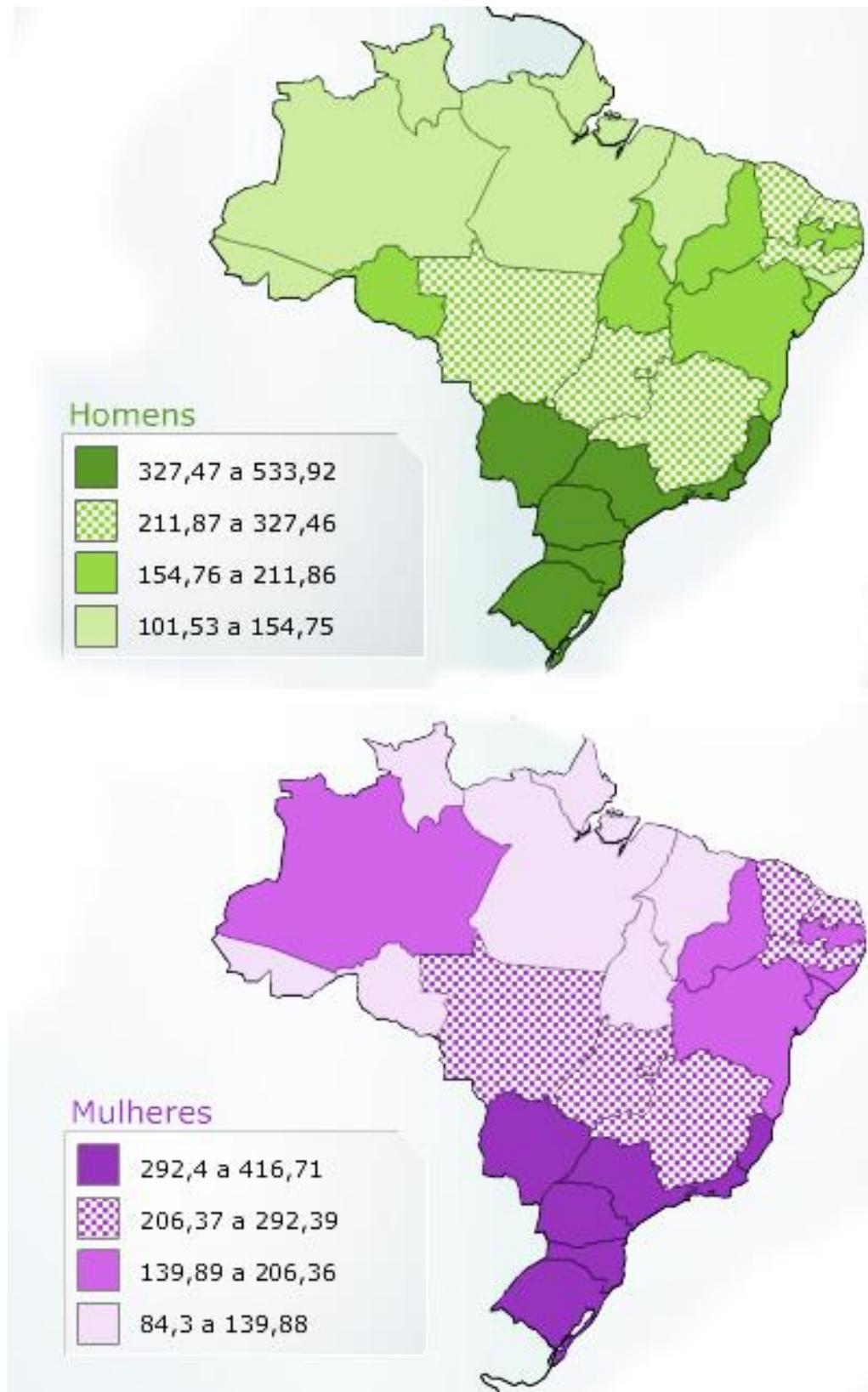


Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer no Brasil estimadas para o ano de 2014, segundo a Unidade da Federação. Os dados referem-se à incidência de todas as neoplasias malignas por 100 mil homens ou mulheres. Adaptado de (7).

As alterações celulares que dão origem ao câncer são o resultado da interação entre fatores genéticos de uma pessoa e agentes externos físicos (radiação ionizante e ultravioleta, por exemplo), químicos (amianto e aflotoxina, por exemplo) e/ou biológicos (infecção por Papiloma Vírus Humano, por exemplo). Além disso, hábitos sociais ou culturais do indivíduo, como tabagismo, alcoolismo, sedentarismo e má-alimentação também representam fatores de risco para o desenvolvimento do câncer (5,8).

A transformação progressiva de células normais em cancerosas é proveniente de uma sucessão de mudanças genéticas - cada qual conferindo um tipo de vantagem sobre o crescimento e proliferação celular - através de um processo formalmente análogo à evolução Darwiniana (9–11). Em geral, as células apresentam circuitos regulatórios que controlam a proliferação celular e a homeostase. No entanto, esses sistemas parecem ser defeituosos em células cancerosas (11).

Hanahan e Weinberg (2000) apontaram seis características marcantes que uma célula normal deve adquirir para tornar-se uma célula cancerosa: manutenção da sinalização de proliferação celular, fuga dos supressores de proliferação, resistência à morte celular, manutenção da imortalidade replicativa, indução da angiogênese e ativação da invasão de tecidos e metástase (Figura 2). Essas características são complementares e podem ser adquiridas por diferentes tipos de tumor através de mecanismos distintos e em vários momentos da tumorigênese (12).

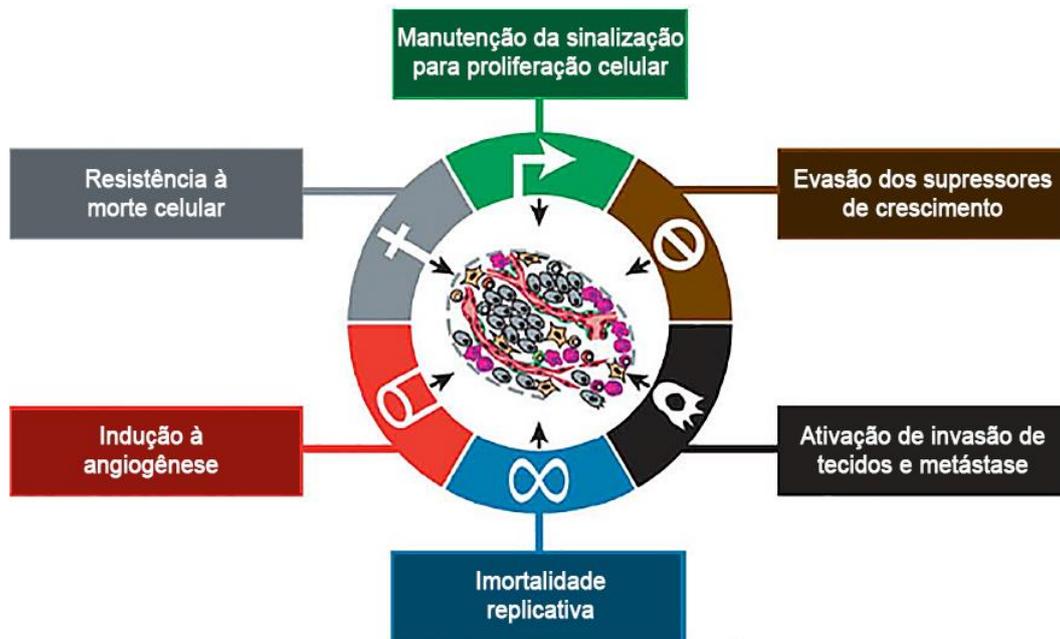


Figura 2: As seis características marcantes do câncer. Essas características seriam compartilhadas pela maioria, se não por todos, os tipos de câncer. Adaptado de (11).

Atualmente tem sido proposto que duas outras características sejam incluídas nessa lista, por serem igualmente importantes para o desenvolvimento do câncer (13–15). A primeira está relacionada à reprogramação do metabolismo energético para manter contínua a proliferação celular. Já a segunda envolve a evasão ativa do ataque e eliminação promovidos pelo sistema imune. A aquisição dessas características é dada por dois mecanismos (Figura 3). Um deles envolve o desenvolvimento da instabilidade genômica em células cancerosas, que gera mutações aleatórias incluindo rearranjos cromossômicos. O outro está relacionado ao estado inflamatório das lesões pré-malignas e malignas que é acionado por células do sistema imune. Sendo assim, pode haver diferentes formas de progressão tumoral em consequência das respostas inflamatórias geradas (12).

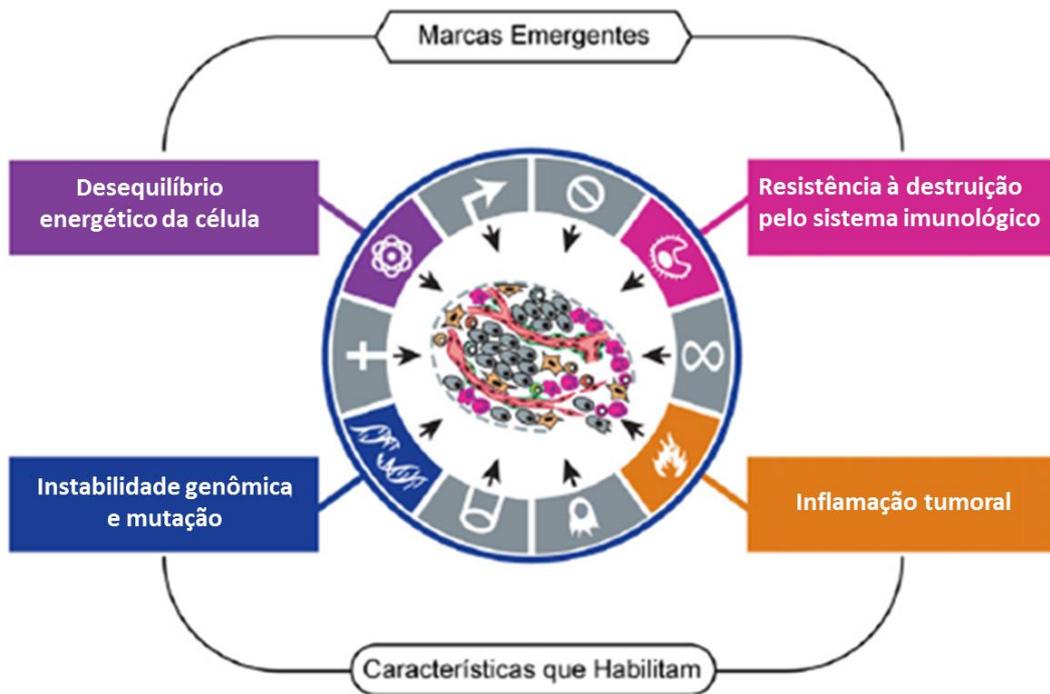


Figura 3: As duas novas características emergentes e seus mecanismos. Novos estudos sugerem que duas características adicionais do câncer estão envolvidas na patogênese de alguns - ou talvez todos - tipos de câncer. Adaptado de (12).

Mutações no DNA, tais como deleções, duplicações, amplificações, translocações e/ou mutações pontuais em efetores de vias que regulam proliferação, sobrevivência e apoptose favorecem o desenvolvimento de tumores sólidos e de leucemias (16–18). Dependendo do tipo de câncer, o número de tais mutações pode variar de poucas para centenas ou milhares (19). Atualmente, mais de 100 mil tipos diferentes de mutações somáticas foram encontradas em células malignas (12). A ocorrência dessas mutações pode acarretar na superexpressão de diversas proteínas, fatores de crescimento e receptores responsáveis pela proliferação celular; pela inativação dos genes envolvidos na parada do ciclo celular e no reparo do DNA; bem como pela falha da ativação de mecanismos de morte celular programada, favorecendo o processo carcinogênico (21–23).

1.1.2 Tratamento

Cada tipo de câncer requer um regime de tratamento específico, que envolve uma ou mais abordagens como excisão cirúrgica, radioterapia e/ou

quimioterapia (5,8). A quimioterapia visa destruir a células neoplásicas, preservando as normais. Porém, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma inespecífica e acaba por lesionar as células sadias. É por esse motivo que a quimioterapia do câncer apresenta diversos efeitos adversos (24).

Os fármacos utilizados na quimioterapia do câncer podem ser divididos em diferentes grupos, com base no seu mecanismo de ação (Figura 4), estrutura química e sua relação com outro fármaco. Alguns deles, porém, agem por mais de uma via, podendo, portanto, pertencer a mais de um grupo. Dentre as principais classes de quimioterápicos estão os agentes alquilantes, que exercem efeito direto no DNA (ex: nitrosureias); antimetabólitos, que interferem na biossíntese dos componentes essenciais do DNA e do RNA (ex: 6-mercaptopurina); antibióticos, que interagem com o DNA inibindo sua síntese ou a de determinadas proteínas (ex: mitomicina C); inibidores mitóticos, que interrompem a mitose (ou fase M do ciclo celular; p. ex: vincristina) e inibidores de topoisomerase (ex: doxorubicina) (24,25). Dentro das terapias direcionadas para alvos moleculares específicos destacam-se os fármacos trastuzumab, imatinib, rituximabe e gefitinib, cujos alvos são, respectivamente, Her-2/NEU, Bcr:abl, CD20, EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) (26,27).

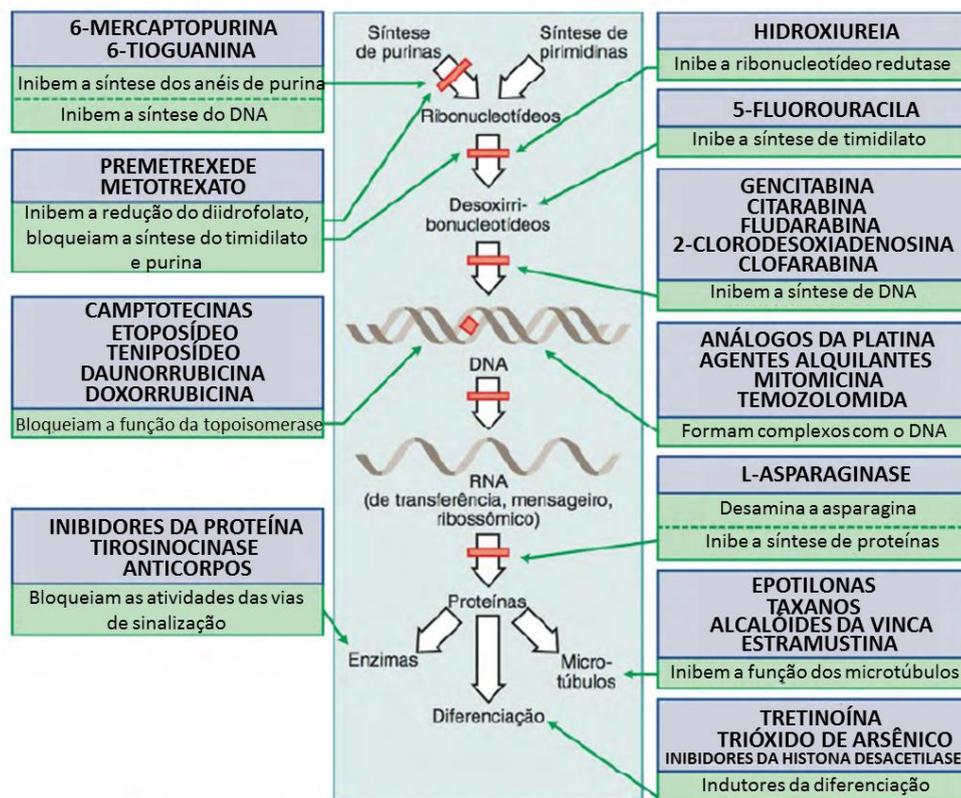


Figura 4: Resumo dos mecanismos de ação de alguns agentes da quimioterapia do câncer. Adaptado de (28).

1.1.3 Topoisomerases

As topoisomerases (Topo) são enzimas celulares chave na prevenção do emaranhamento do DNA (29), pois regulam seu superenovelamento ao gerarem uma quebra transitória no material genético (30–33). Essa quebra – simples ou dupla – é feita por um ataque nucleofílico à ligação fosfodiéster do DNA por um resíduo catalítico das topoisomerases, resultando na fixação covalente da tirosina ao fosfato do DNA (P-Y) na porção final da fita de DNA clivada (34,35).

A classificação dessas enzimas geralmente é feita com base em sua função catalítica, mecanismo de ação, sequência de aminoácidos e estrutura (36). Em células de mamíferos, as topoisomerases são classificadas em dois tipos: I e II. A Topo I cliva uma única fita do DNA, enquanto a Topo II cliva as duas fitas da dupla hélice do DNA para exercer suas funções catalíticas e esse mecanismo é dependente de ATP (29,33,34,37).

A replicação, transcrição e recombinação do DNA são processos dependentes das topoisomerases (37,38), uma vez que elas permitem relaxar o DNA positivamente e negativamente superenovelado possibilitando a separação das fitas duplas de DNA (33). Sendo assim, as topoisomerases estão diretamente envolvidas em processos onde há rápida divisão celular. Além disso, já foi observado o aumento dos níveis dessas enzimas em células cancerosas em relação a células normais. As topoisomerases representam, portanto, importantes alvos moleculares para a terapia tumoral e a sua inibição parece ser um mecanismo eficaz para o tratamento de diversos tipos de câncer (36,39).

Os inibidores de topoisomerases podem atuar estabilizando o complexo Topo – DNA ou promovendo a inibição catalítica da enzima, sendo então classificados como *poisons* ou catalíticos (40,41). Estes não resultam na clivagem do DNA, mas diminuem a velocidade de reação catalisada pelas enzimas. Os *poisons*, por sua vez, recebem esse nome por atuarem transformando as topoisomerases em toxinas letais para a célula. Eles atuam estabilizando o complexo Topo-DNA, impedindo que as quebras na fita do DNA sejam reparadas. Isso gera um aumento dos níveis de DNA clivado nas células, ativando processos de morte celular (40,42–44). A inibição completa de apenas um tipo de DNA topoisomerase já é suficiente para levar à morte celular por apoptose (29).

Dessa forma, essas enzimas são essenciais para a manutenção da vida e importantes alvos na quimioterapia do câncer (29,33). No entanto, as substâncias atualmente utilizadas na oncoterapia - incluindo os inibidores de topoisomerases topotecano, etoposídeo e doxorubicina - apresentam diversos efeitos adversos, podendo até mesmo desencadear o surgimento de neoplasias secundárias (38). Somando-se a isso o fato de que pode haver resistência celular a esses compostos, a descoberta de efetivos agentes anticancerígenos é fundamental para a terapia do câncer (38).

1.2 Leucemia

1.2.1 Aspectos gerais

A leucemia é uma das doenças hematopoiéticas malignas mais agressivas e resulta da proliferação anormal de células hematopoiéticas com diferenciação, regulação e morte programada prejudicadas (45–48). Dentre os tipos de câncer com maiores taxas de incidência e mortalidade registradas em 2012, a leucemia está entre os 15 primeiros no *ranking* mundial e entre os 10 primeiros na América do Sul (49). No ano de 2014, foram estimados 52.380 novos casos de leucemia e 24.090 mortes pela doença nos Estados Unidos (50). No Brasil, as estimativas do último ano mostram que, embora haja uma incidência da doença em todo o território nacional, ela é maior nas regiões sul e sudeste (51).

A leucemia é um tipo de câncer bastante heterogêneo em termos biológicos e morfológicos, podendo ser classificada de duas formas (Figura 5): de acordo com a origem da célula precursora – mielóide ou linfóide – e pelo comportamento crônico ou agudo (52–54).

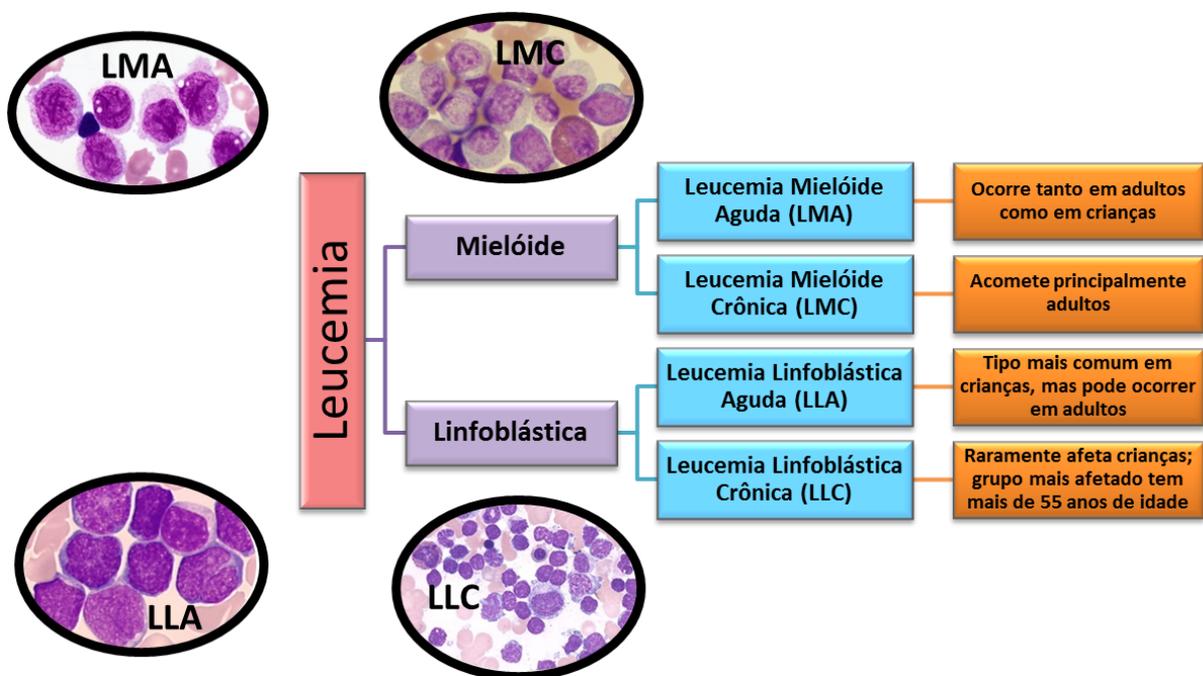


Figura 5: Classificação geral das leucemias. Adaptado de (55) e (56).

A manifestação crônica consiste em um longo período de incubação, enquanto a aguda é associada a um acúmulo abrupto de células sanguíneas imaturas no sangue periférico, medula óssea e órgãos linfoides secundários (46,54). Com isso, a leucemia aguda geralmente apresenta insuficiência da medula óssea com anemia associada, infecção e hemorragia. Apesar do desenvolvimento de regimes quimioterápicos mais modernos, a leucemia aguda permanece incurável na maioria dos pacientes adultos e a potencial cura está associada a importantes efeitos adversos (57). Os sintomas costumam ser semelhantes aos de um resfriado, além de haver presença de dor nos ossos e/ou articulações. Se não for tratada, a leucemia aguda apresenta curso agressivo podendo levar o paciente a óbito dentro de 6 meses ou menos. O diagnóstico é feito a partir da identificação de células hematopoiéticas anormais no sangue periférico e medula óssea (46).

1.2.2 Leucemia linfoblástica aguda

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma doença heterogênea, na qual alterações genéticas resultam no desenvolvimento de múltiplos subtipos biológicos. A etiologia da LLA (Figura 6) está relacionada à aquisição de múltiplas alterações genéticas consecutivas em células pré-leucêmicas (58). A LLA é o tipo de câncer mais comum na infância, respondendo por 75% dos casos de leucemia aguda em crianças. Dentre os adultos, ela representa de 10 a 15% dos casos, sendo uma das principais causas de morte pela doença em crianças e jovens adultos (46,59,60).

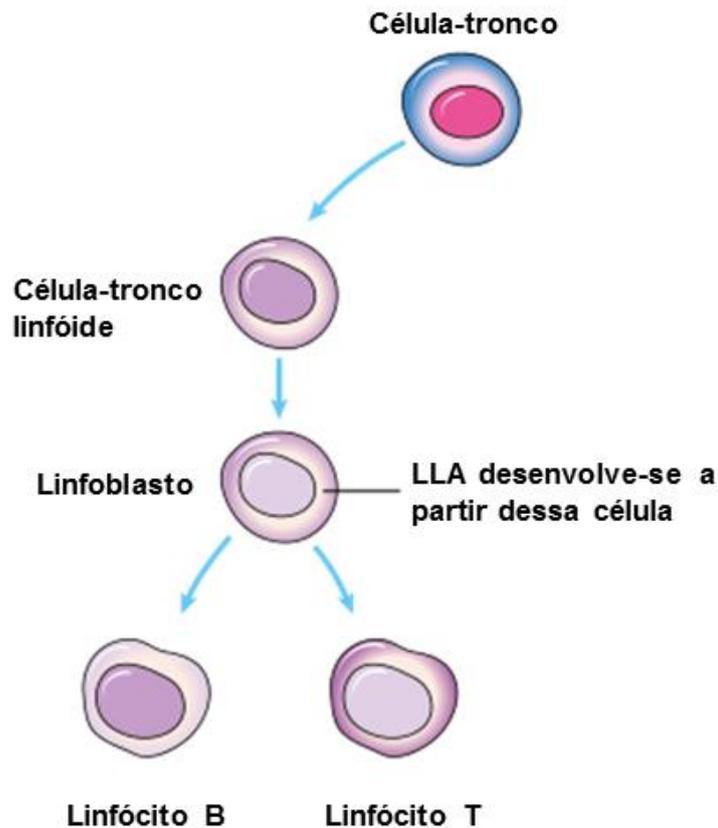


Figura 6: Esquema da etiologia da LLA. Adaptado de (61)

O principal tratamento para LLA em adultos é a quimioterapia a longo-prazo, que dura cerca de 2 anos (62,63). O tratamento típico é feito em 3 etapas: indução, consolidação (intensificação) e manutenção. O objetivo da indução é a remissão, na qual células leucêmicas não são encontradas em amostras de medula óssea, as células normais da medula retornam e as contagens sanguíneas tornam-se normais. No entanto, a remissão não é necessariamente sinônimo de cura, pois células leucêmicas ainda podem permanecer em algumas partes do corpo. Uma vez a leucemia tendo entrado em remissão, a fase seguinte consiste na intensificação da quimioterapia. É a fase de consolidação. Alguns pacientes em remissão apresentam alto risco de recaída (retorno da leucemia). Dessa forma, muitas vezes é recomendável um transplante de células-tronco nesse momento da terapia. Por último, após a etapa de consolidação, é indicado um programa de manutenção quimioterápico (64). Durante o tratamento, é comum a presença de inúmeros efeitos adversos,

como náusea, perda de cabelo, fadiga, disfunção sexual, neuropatias, cardiotoxicidade e feridas bucais, por exemplo (62).

Dentre os fármacos mais utilizados no tratamento da LLA estão o etoposídeo e a doxorrubicina, ambos inibidores de topoisomerase (63,65). A morte das células cancerosas por essas terapias é primariamente mediada pela indução de apoptose, termo que foi introduzido em 1972 para se referir a um tipo de morte celular altamente regulada e com morfologia característica (66,67).

Dos novos casos diagnosticados de LLA, aproximadamente 15% e 25% são de LLA de células T (T-LLA) em crianças e adultos, respectivamente, e estão associados a um mau prognóstico. Com isso, e tendo em vista que a quimioterapia intensiva atual está associada a efeitos adversos significativos a curto e longo prazo, a busca por fármacos com alvos moleculares dirigidos para uma terapia tumor-específica é um dos principais objetivos das pesquisas atuais (68). Portanto, novas estratégias de tratamento são necessárias, não só para aumentar a taxa de cura da doença, mas também para melhorar a qualidade de vida dos pacientes (57).

1.3 Morte celular

A definição de vida e morte de um organismo é complexa, mesmo quando se trata de uma célula. O desenvolvimento e a homeostasia de um organismo dependem do balanço entre a sobrevivência e a morte celular, de modo que qualquer alteração nesse equilíbrio contribui para o desenvolvimento de patologias, em especial o câncer (69).

Sob uma visão conceitual, a morte celular pode ser definida como a degeneração permanente de funções celulares vitais. De acordo com a Comissão de Nomenclatura em Morte Celular (NCCD), são consideradas mortas somente as células que exibem uma permeabilização irreversível da membrana plasmática ou que foram sujeitas à fragmentação completa. Sendo assim, a morte celular pode ser classificada em “acidental” ou “regulada” (70).

A morte celular programada (MCP) é uma morte regulada fundamental para o desenvolvimento de um organismo, homeostasia tecidual e também para a patogênese de inúmeras doenças (71). Dentre as principais formas de MCP encontram-se a apoptose, que será discutida posteriormente, a necrose e a autofagia (72) (Figura 7).

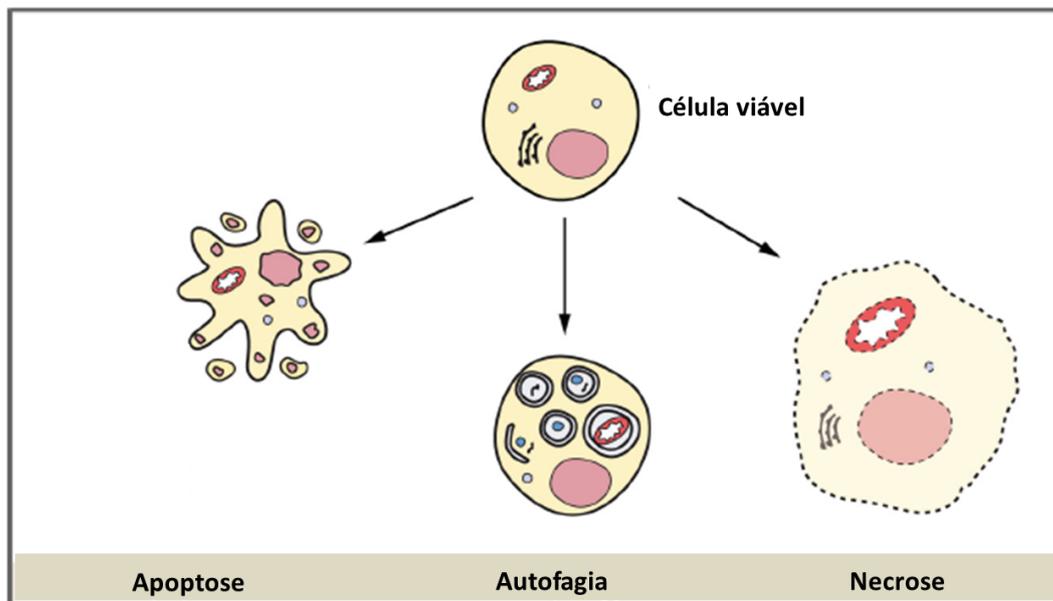


Figura 7: Tipos de morte celular. Apoptose é um mecanismo estritamente regulado caracterizado por redução do volume celular, destruição do citoesqueleto, condensação e fragmentação do conteúdo nuclear e formação de corpos apoptóticos; na autofagia há aumento dos vacúolos autofágicos de dupla membrana que degradam proteínas e organelas e posterior fusão com derivados lisossomais; a necrose ocorre após grandes mudanças na concentração iônica citoplasmática, osmolaridade ou pH, as organelas ficam inchadas e a membrana celular perde a sua integridade. Adaptado de (73).

Por muito tempo, a necrose foi considerada como sendo apenas uma morte acidental em resposta a agressões físico-químicas. No entanto, essa visão tem sido alterada ao ser revelada a existência de múltiplas vias de necrose regulada - processo geneticamente controlado que é caracterizado morfológicamente por granulação citoplasmática e inchaço de celular e/ou de organelas (74). Estudos identificaram que o receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), os receptores de interação proteína-quinase 1 e 3 (RIPK1 e RIPK3) e o receptor associado ao fator-2 (TRAF2) são reguladores essenciais da morte celular necrótica induzida pela ativação de receptores de morte (75,76). A ligação do fator de necrose tumoral ao seu receptor é capaz de

promover a ativação do complexo RIPK1/RIPK3, levando à necrose (76,77). Embora os mecanismos moleculares envolvidos com esse complexo ainda não estejam completamente elucidados, acredita-se que RIPK3 possa elevar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio da indução da atividade da NADPH oxidase, além de desencadear uma catástrofe bioenergética ao hiperativar várias enzimas envolvidas com a glicogenólise e glutaminólise (76,78). Tem sido sugerido que a necrose possa desempenhar um papel fundamental no que diz respeito à morte celular em diversas infecções e doenças, incluindo as neoplásicas (79).

A autofagia é dividida em três classes: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. Por ser o principal tipo de autofagia, a macroautofagia é rotineiramente chamada apenas de “autofagia” (80). Podendo levar tanto à morte celular, quanto favorecer a sobrevivência celular, ela ocorre através de um processo catabólico que envolve a degradação de componentes citoplasmáticos, agregados proteicos e organelas através da formação de autofagossomos – governada por proteínas Atg – e posterior fusão com lisossomos (75,80,81). Diversas alterações são responsáveis pela indução da autofagia, tais como interrupção das vias de sinalização de fator de crescimento (82), ativação da sinalização de proteína cinase ativada por mitógeno (83), inibição da degradação proteosomal (84), acúmulo intracelular de cálcio (85) e estresse do retículo endoplasmático (86). Tem sido proposto que a autofagia esteja associada ao câncer de diferentes maneiras. Acredita-se que em um primeiro momento ela exerça um efeito preventivo contra o câncer, mas, uma vez que o tumor se desenvolve, a autofagia seria utilizada como mecanismo de citoproteção pelas células cancerosas (87).

1.3.1 Apoptose

Apoptose é um termo de origem grega usado para descrever o processo da queda das folhas de uma árvore e, na década de 70, foi adotado por Kerr e colaboradores para se referir a um tipo de morte celular (88). Esse tipo de morte celular programada é caracterizado por diversas alterações morfológicas que incluem a condensação da cromatina, a ausência de rompimento da membrana plasmática, a fragmentação do DNA e a formação de corpos

apoptóticos (89,90). Uma das principais características que marca estágios finais da apoptose é a clivagem do DNA mediada por endonucleases, processo pode ser visualizado por meio da formação de um padrão *laddering* através de uma corrida eletroforética desse ácido nucleico (91).

A apoptose é um processo pelo qual as células são “silenciosamente” removidas quando chegam ao final da sua vida útil, são danificadas ou se tornam supérfluas. Portanto, esse fenômeno atua como um mecanismo de homeostasia para manter as populações celulares e a renovação tecidual (90,92). Além desse papel fisiológico, o processo apoptótico está envolvido também em situações patológicas, onde há mutação, superexpressão, supressão/subexpressão de genes que o regulam. Portanto, a participação da apoptose em uma doença pode ser proveniente do aumento da sobrevivência celular (inibição da apoptose) ou excesso de morte celular (hiperativação apoptótica) (93).

As características morfológicas da apoptose resultam da ativação de cisteíno-proteases denominadas caspases. As caspases são altamente conservadas pela evolução, podendo ser encontradas em diversos organismos além dos humanos (94). Tradicionalmente, as caspases podem ser divididas em iniciadoras e efetoras. Em mamíferos as iniciadoras são as 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 e 12, e as efetoras as 3, 6, 7 e 14 (71). A ativação dessas proteases pode ser decorrente de duas vias: a extrínseca (ou citoplasmática) e a intrínseca (ou mitocondrial) (22,95).

A via intrínseca está relacionada à alteração da permeabilidade mitocondrial, levando à liberação do citocromo-c, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF, endonuclease G e CAD (96). Ao interagir com o fator apoptótico de ativação de protease 1 (Apaf-1), o citocromo-c leva à ativação de pró-caspase 9. A associação desses componentes forma o apoptossoma, que ativa caspases efetoras e leva à morte celular (22,97,98).

Essa via é controlada por membros pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim) e antiapoptóticos da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1), que atuam favorecendo ou impedindo a liberação do citocromo-c para o citosol ao promoverem ou inibirem a formação de poros na membrana mitocondrial (94,99,100). Embora ainda não completamente elucidado, é descrito que a proteína supressora tumoral p53 tenha um papel na regulação da família Bcl-2

(96,101). Além disso, as chamadas proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) como a XIAP ou a survivina inibem as caspases 9 e 3, prevenindo a execução da apoptose (102). Contudo, já foi relatado que as IAPs podem ser inibidas por Smac/DIABLO e HtrA2/Omi (103,104).

A via extrínseca, por sua vez, inicia-se com a ativação dos chamados receptores de morte por meio da interação com os ligantes de morte (105). Esses receptores são membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), que consiste em mais de 20 proteínas com várias funções biológicas, incluindo a regulação da morte celular e sobrevivência, diferenciação ou regulação imune (106). A maioria dos receptores TNF (TNFRs) é composta por proteínas transmembrana do tipo 1, mas alguns estão ancorados à membrana plasmática por porções glicofosfolipídicas ou são secretados como moléculas solúveis (107). Esses receptores possuem um domínio citoplasmático de aproximadamente 80 aminoácidos chamado “domínio de morte”, que desempenha um papel crucial para a transmissão do sinal de morte da superfície celular às vias de sinalização intracelulares (106). Dentre alguns desses receptores e seus ligantes podemos destacar Fas/FasL e TNFR1/TNF α , por exemplo (96).

Uma vez ativados, esses receptores recrutam proteínas adaptadoras citoplasmáticas. Portanto, a interação Fas-FasL resulta na ligação da proteína adaptadora FADD, que ao se associar com a pró-caspase-8, forma o complexo de sinalização de indução de morte (DISC). DISC leva à ativação de caspase-8, que ativa caspases efetoras (22,96,108). Essa via pode ser regulada pela proteína FLIP (proteína inibidora da enzima conversora de interleucina 1- β associada ao FADD). Ao se ligar a proteínas adaptadoras associadas aos receptores de morte ativados, FLIP atua impedindo a formação do DISC e a ativação da pró-caspase-8 (109,110).

Contudo, as vias intrínseca e extrínseca não são completamente independentes, pois a ativação de caspase-8 pela via extrínseca pode disparar a ativação da via mitocondrial (Figura 8). Isso porque a caspase-8 pode clivar a proteína Bid, gerando um fragmento (tBid) capaz de permeabilizar a mitocôndria e levar à ativação da via intrínseca (110).

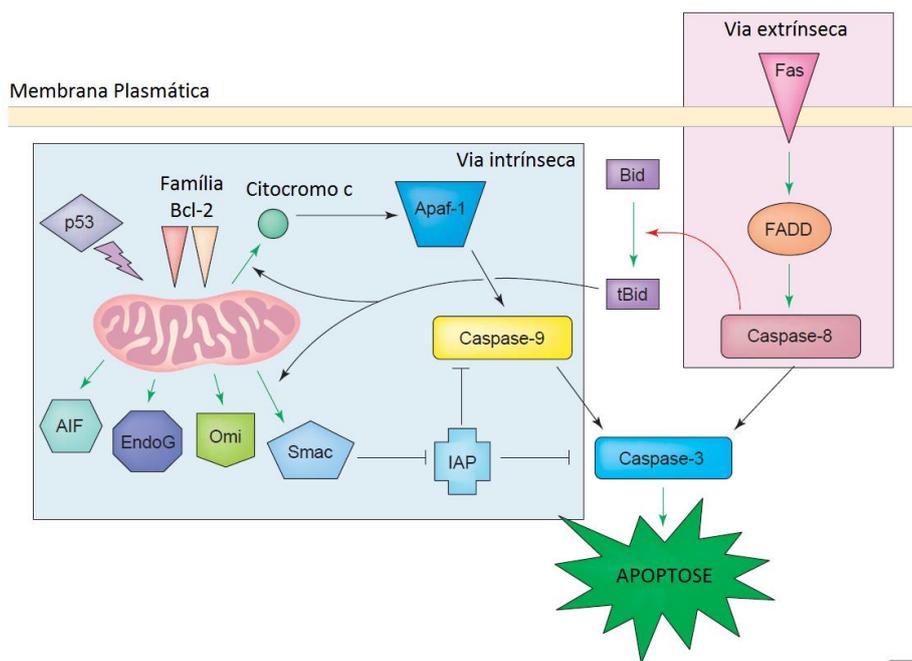


Figura 8: Esquema com as duas principais vias apoptóticas. Adaptado de (105).

1.4 Métodos de estudo de citotoxicidade

1.4.1 Ensaios bioquímicos

Ensaios de viabilidade e proliferação celular são rotineiramente usados durante o processo de descobrimento de fármacos a fim de avaliar em células propagadas *in vitro* os efeitos dos compostos estudados (111). Dentre eles, podemos destacar os ensaios de redução de tetrazol e de resazurina e o ensaio de ATP.

O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazol) é um dos compostos tetrazol mais utilizados. Nesse ensaio o sal amarelo MTT é reduzido a cristais azuis de formazana, que deve ser solubilizado por um solvente como o isopropanol (112). Primeiramente foi descrito que o sal seria reduzido em processos mitocondriais em dois sítios da cadeia respiratória, mas, posteriormente, um estudo mostrou que frações microssomais e citossólicas estão envolvidas na formação da formazana (113–115). Presume-se que a quantidade de formazana seja diretamente proporcional ao número de células viáveis e essa medição é feita via espectrofotometria por meio de um registro das alterações de absorvância (116).

Embora o princípio da técnica seja similar ao MTT, o ensaio de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) é mais sensível do que aqueles realizados com tetrazóis (116). Esse indicador é azul e permeável às células, onde pode ser convertido a um composto rosa fluorescente – a resorufina – proporcionalmente ao número de células viáveis (115–117). O corante age como um receptor de elétrons intermediário na cadeia de transporte de elétrons, sem interferir com a sua transferência normal (111). Uma vez que em baixas concentrações a resazurina não é tóxica para as células (118) e é estável em meio de cultura, é possível realizar ensaios cinéticos ou *end-point* (119). Além de ser relativamente barato, esse teste é um dos mais simples e rápidos, podendo ser mensurado tanto por colorimetria quanto por fluorimetria (116,117).

Outra forma de avaliar a viabilidade celular se dá por meio do ensaio de ATP. O ATP é a principal fonte de energia para todos os organismos, de modo que a sua ocorrência nas células faz com que sua detecção seja sintomática da presença de organismos vivos (120). Quando as células perdem a integridade da membrana, elas deixam de ser capazes de sintetizar ATP e ATPases endógenas rapidamente depletam qualquer resquício de ATP do citoplasma (116). Um método que permite essa análise de viabilidade baseada em ATP é o de bioluminescência fundamentado na reação da enzima luciferase. De modo geral, os kits de detecção atualmente disponíveis promovem lise das células e inibição das ATPases, fazendo com que o ATP liberado possa interagir com a luciferina através de uma reação catalisada pela luciferase. Esse processo gera sinais luminescentes proporcionais à quantidade de ATP presente na amostra e a concentração de ATP está diretamente relacionada à viabilidade celular (116,121).

1.4.2 Ensaios baseados em imagem

O imageamento celular vem sendo considerado um instrumento de suma importância na descoberta de fármacos ao permitir a integração da complexidade biológica. Ele pode ser definido como o uso de uma tecnologia capaz de visualizar uma população celular, células individuais ou estruturas sub-celulares, aplicada em conjunto com ferramentas de análise de imagem. Esse sistema de detecção inclui microscópios, detectores macroconfocais de

fluorescência e leitores fluorimétricos de placas baseados em imagem (122,123).

Uma das mais novas abordagens para o descobrimento de fármacos foi introduzida no final da década de 90 com o lançamento do HCS (triagem de alto conteúdo, do inglês *High-Content Screening*), uma plataforma automatizada de microscopia de fluorescência e análise quantitativa de imagens (124). Com o aumento dramático do tamanho das bibliotecas de compostos geradas para a triagem de fármacos, crescia a necessidade de se implementar cada vez mais sistemas de triagem de alta vazão (HTS, do inglês *high throughput screening*). Porém, até então, os métodos baseados em fluorescência não acompanhavam as exigências do HTS. Existindo então a necessidade emergente de se obter o maior número de informações possíveis em alta vazão e em ensaios miniaturizados, foi introduzido o HCS para permitir que a microscopia de fluorescência entrasse na era do HTS (125).

Ao longo dos anos, diferentes definições surgiram para atender à evolução desse campo. Dentre eles estão os termos HCA (análise de alto conteúdo, do inglês *high-content analysis*) e HCI (imageamento de alto conteúdo, do inglês *high-content imaging*), utilizados para se referir à análise de todos os dados de imagem das células adquiridas por um sistema de imageamento. Essas nomenclaturas também são frequentemente utilizadas em contexto acadêmico onde se utiliza a metodologia do HCS, porém sem a aplicação de uma triagem (126).

O HCS (ou HCA) é uma técnica automatizada multiplexada de imagem (combina múltiplas marcações fluorescentes independentes) baseada em múltiplos alvos, permitindo a avaliação simultânea de vários parâmetros celulares (127,128). O HCS coleta informações funcionais e morfométricas de diferentes coleções de células individuais. Além disso, a marcação simultânea de três ou quatro cores permite extrair várias informações de cada célula qualitativa e quantitativamente, tais como intensidade, tamanho, distância e distribuição (127,129).

As técnicas atuais para a descoberta de fármacos anticancerígenos são bastante limitadas quando comparadas às possibilidades de estudo que o HCS oferece. Sendo o câncer uma patologia multifatorial, a utilização de análises multiparamétricas é de grande valia na pesquisa oncológica.

1.4.3 Linhagens celulares

O uso de um modelo *in vitro* apropriado na pesquisa do câncer é a chave para a investigação de vias celulares, estudos de desregulação de proliferação, apoptose e progressão do câncer, definição de potenciais marcadores moleculares e para a triagem e caracterização de fármacos (130–133). Células cancerosas são amplamente utilizadas na pesquisa e demonstraram ser um excelente modelo para o estudo de mecanismos biológicos envolvidos no câncer (130).

As linhagens celulares favorecem a realização de estudos funcionais, como o de efeitos de fármacos sobre as vias de sinalização celular. É possível, por exemplo, compreender o mecanismo de ação de compostos, a resistência/sensibilidade de alguns tipos de câncer a diferentes substâncias, auxiliar no descobrimento de biomarcadores em resposta a anticancerígenos e investigar vias de sinalização associadas a respostas terapêuticas (134). Células com determinados genes inativados ou mutações especificamente inseridas permitem que a validação de alvos e estudos mecanísticos sejam feitos de modo bastante eficaz (135). Um exemplo dessa abordagem é a utilização combinada das linhagens celulares derivadas da Jurkat: A3, I2.1 e I9.2.

Células da linhagem leucêmica linfoblástica Jurkat foram tratadas com anticorpo anti-Fas e isoladas por diluição limitante para se obter uma linhagem celular que tivesse baixa taxa espontânea de resistência à apoptose mediada por Fas. Esse processo culminou com a criação de um subclone muito sensível à apoptose Fas-mediada: a linhagem A3 (136). Essas células foram posteriormente tratadas com ICR-191 (6-cloro-9-[3-(2-cloroetilamina)propilamina]-2-metoxi-acridina), uma acridina ligada a uma cadeia lateral alquílica longa (137,138). Conhecido por ser um agente mutagênico indutor de *frameshift*, o ICR-191 permitiu que fossem isolados clones a partir de A3 com mutações recessivas resistentes à morte por Fas (136,138). Dessa forma, foram geradas as linhagens I2.1 e I9.2 (Figura 9). A primeira não expressa o domínio de morte FADD e a segunda é deficiente em caspase-8, de modo que ambas são completamente resistentes à morte celular Fas-induzida (139,140).

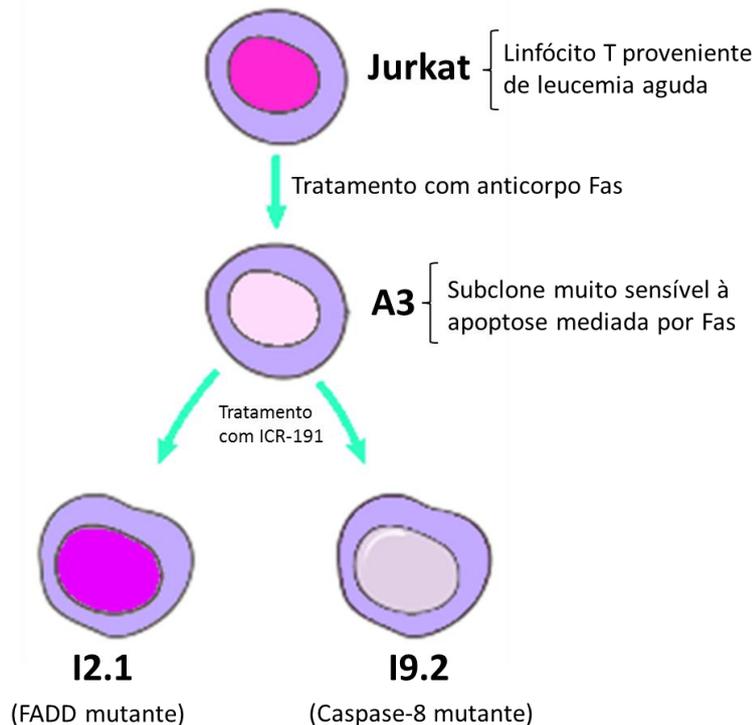


Figura 9: Esquema da origem das linhagens leucêmicas A3, I2.1 e I9.2.

1.5 Quinonas e quimioterapia

O tratamento de inúmeras enfermidades humanas é, há muito tempo, feito através do uso de substâncias orgânicas originadas de fontes naturais (141). Dos medicamentos aprovados pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA EUA) nas últimas décadas, 74,8% são derivados de produtos naturais, demonstrando a importância dessa fonte nos estudos de desenvolvimento de novos medicamentos (142). A descoberta de fármacos a partir de plantas medicinais possui um importante papel no tratamento do câncer e, de fato, muitas das novas aplicações clínicas de metabólitos secundários oriundos de plantas e seus derivados têm sido direcionados ao combate dessa patologia (143,144). Dentre as substâncias provenientes de produtos naturais investigadas e utilizadas para a terapia do câncer, destacam-se as quinonas (145–149).

As quinonas são dienonas cíclicas conjugadas e representam uma importante e ampla família de metabólitos na natureza, detendo uma grande variedade de funções (150). Muitos fármacos contendo uma porção quinona

receberam aprovação clínica para o tratamento do câncer, tais como mitomicina C (43,151,152), doxorubicina (65,145) e menadiona (152,153).

De acordo com a literatura, os efeitos tóxicos e antitumorais das quinonas são devidos à inibição das topoisomerasas (41,154,155). Porém, o mecanismo de ação das quinonas também pode estar relacionado a uma forte ativação do ciclo redox, onde ocorre a biorredução do núcleo quinona levando à formação de um radical semiquinona ou hidroquinona (145).

Através de um processo catalisado por flavoenzimas (NADPH citocromo P-450 redutase, NADPH citocromo b5 redutase ou NADPH ubiquinona oxidoreductase) que utilizam NADPH como doador de elétrons, um substrato quinonóidico é reduzido a um radical semiquinona (Figura 10). Uma vez formada, a espécie semiquinona, em condições aeróbias, pode ser oxidada à quinona original pelo oxigênio molecular, um processo que resulta na produção concomitante do ânion-radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$). Na presença da enzima superóxido dismutase esse radical é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Através da catálise com metais de transição (reação de Fenton) ou pela reação com H_2O_2 , o ânion-radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) gera radicais hidroxil (HO^{\cdot}), extremamente tóxicos. A maioria dos efeitos citotóxicos causados pelas chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) é atribuída a esses radicais HO^{\cdot} . E, apesar de H_2O_2 não ser um radical livre, o peróxido de hidrogênio é uma substância bastante reativa, podendo promover também a oxidação de algumas biomoléculas.

Vale ressaltar que as células produzem EROs continuamente ao longo de seu metabolismo aeróbico e, portanto, são equipadas com diversos sistemas de defesa antioxidante. Porém, a liberação excessiva de EROs leva a um desequilíbrio oxidativo que contribui para os efeitos patológicos produzidos por essas espécies. Sendo assim, pode-se dizer que HO^{\cdot} e H_2O_2 são as principais espécies responsáveis pelo estresse oxidativo celular provocado por quinonas (43,145,156).

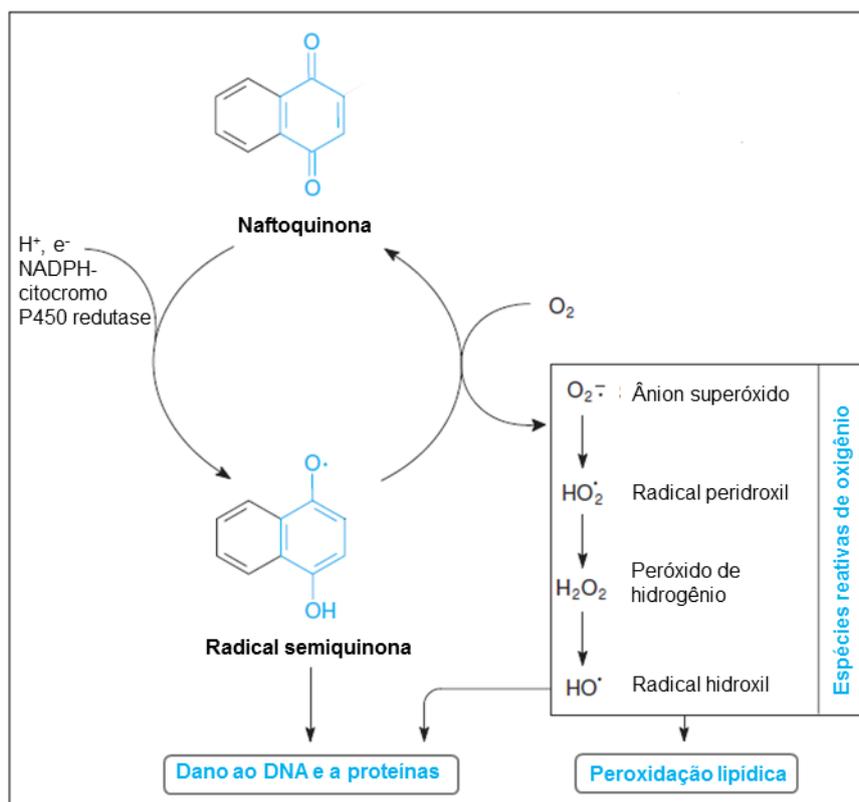


Figura 10: Ciclo redox induzido por quinonas. Adaptado de (157).

Além da conversão de quinonas já descrita acima, também pode ocorrer a redução direta de dois elétrons de quinona a hidroquinona, processo este que é mediado pela enzima NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1 (NQO1) (145,158). A redução de quinonas a hidroquinonas por NQO1 utiliza NADH ou NADPH como substrato e é primariamente considerado um mecanismo de desintoxicação, uma vez que essa reação evita a formação de semiquinonas altamente reativas (159,160). Sendo assim, essa enzima fornece para a célula uma proteção contra o estresse oxidativo, com a desintoxicação direta de quinonas reativas, a manutenção de oxidantes lipossolúveis sob a forma reduzida e a estabilização da proteína supressora tumoral p53 (161). No entanto, de modo paradoxal, tem sido amplamente descrito na literatura que uma alta expressão de NQO1 em estágios iniciais da carcinogênese pode favorecer a proliferação de células tumorais (162–168). Em alguns casos ainda, a redução de dois elétrons de uma quinona pode levar a um ciclo redox reativo de hidroquinona. Além disso, as hidroquinonas podem representar a forma biologicamente ativa de algumas quinonas antineoplásicas, como é o caso da mitomicina C (145).

A estrutura molecular das quinonas permite a classificação das mesmas em diferentes grupos, utilizando como critério o tipo de anel aromático que sustenta o anel quinonóidico: as benzoquinonas possuem anel benzênico; as antraquinonas apresentam um anel antracênico linear ou angular; as naftoquinonas possuem um anel naftalênico (43,150). A estrutura dessas quinonas está representada na Figura 11.

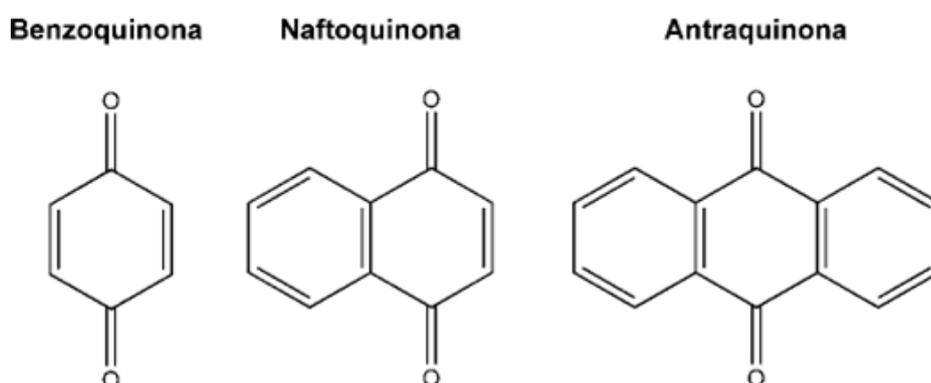


Figura 11: Estrutura básica de *p*-quinonas.

O lapachol, uma naftoquinona natural, é extraído do tronco de plantas da família Bignoniaceae, em particular do gênero *Tabebuia*, nativo da América do Sul e Central (169). Essa quinona foi descrita pela primeira vez em 1882, por Paternò (170) e teve, em 1896, sua estrutura química estabelecida por Hooker (171). Em 1927, Fieser propôs uma rota para a obtenção sintética do lapachol, ajudando a confirmar sua estrutura química (Figura 12 B) (172).

Em 1968, em estudo conduzido por Rao e colaboradores identificou que o lapachol exibia atividade antitumoral (171). Desde então, esse composto vem sendo utilizado em diversos estudos de combate ao câncer.

Estudos clínicos apontaram que o lapachol é bem tolerado, mas apresentou baixa atividade antitumoral, provavelmente pelo fato de não se ter alcançado concentração sanguínea efetiva. Em doses maiores surgem efeitos tóxicos como náuseas, vômito e aumento reversível do tempo de protrombina (173).

Dessa forma, embora o lapachol apresente efeitos benéficos, isso não significa que ele seja um composto anticancerígeno perfeito, além de suas

concentrações plasmáticas serem baixas demais para demonstrar um efeito terapêutico. No entanto, devido às atividades antitumorais que é capaz de exercer, o lapachol é um excelente candidato para que sejam feitas modificações sistemáticas, desenvolvendo análogos com melhor atividade e perfil farmacocinético (174).

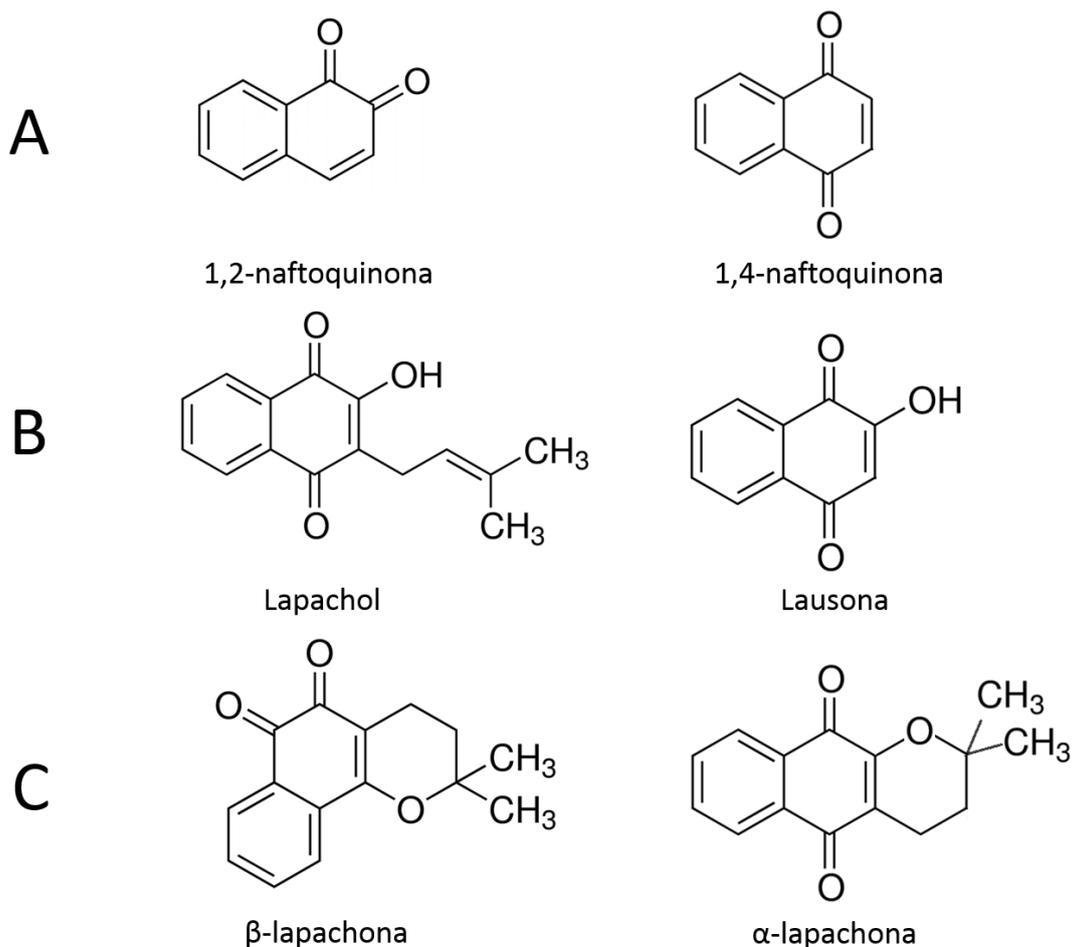


Figura 12: Estrutura de naftoquinonas naturais e seus derivados. Núcleo naftoquinônico (A), estrutura das naftoquinonas lapachol e lausona (B) e dos derivados β - e α - lapachona (C).

1.5.1 Lapachonas

A β -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona), representada na Figura 12 C, é um derivado do lapachol. Ela vem se mostrando significativamente ativa contra diversos tipos de câncer, incluindo

leucemia, câncer de próstata, osteosarcoma, câncer de mama, câncer de bexiga, câncer de pulmão, hepatoma e câncer pancreático (175). Esse efeito pode ser proveniente da inibição de topoisomerase e/ou do estresse oxidativo e ambos os processos culminam com indução da apoptose (176,177).

Derivados sintéticos da β -lapachona também já apresentaram atividade citotóxica contra diversas células cancerosas humanas (178). Seu isômero estrutural, α -lapachona, também já foi identificado como inibidor de topoisomerase II e esse composto, juntamente com seus derivados, vem sendo estudado como potencial agente anticancerígeno (179–181).

Cientes do potencial terapêutico das lapachonas, novos compostos com núcleos 1,2- e 1,4-naftoquinônicos derivados de α e β - lapachona foram sintetizados pelo grupo da Dra Sabrina Ferreira na UFRJ (182).

Estudos prévios em nosso laboratório identificaram que esses compostos atuam *in vitro* como inibidores do tipo catalítico das enzimas Topo I e/ou II α humanas (Tabela 1) (183). Alguns desses compostos foram classificados como duais, isto é, capazes de inibir ambos os tipos de topoisomerase humana. Esta classe de inibidores tem recebido especial atenção devido ao maior potencial de ação anticancerígena. No entanto, mais estudos são necessários para (i) avaliar o efeito citotóxico promovido por esses compostos e (ii) investigar vias apoptóticas envolvidas na morte celular desencadeada por eles.

Tabela 1: Atividade inibitória das PNQs contra topoisomerases

Composto	Atividade contra*	
	Topo I	Topo II α
SQ1	-	++
SQ2	-	+++
SQ3	-	+++
SQ4	+	+++
SQ5	-	++++
SQ6	+	++
SQ7	-	+
SQ8	++	+
SQ9	+	+
SQ10	+	-
SQ11	+	++++
SQ12	-	+
SQ13	+	+
SQ14	-	-
SQ15	+++	++++
SQ16	+	-
SQ17	++	-
SQ18	+	-
SQ19	+	++++
SQ20	-	-
SQ21	++	++++
SQ22	++	+
SQ23	++	++++
SQ25	++	+++
SQ26	-	+
SQ27	+	+++
SQ28	+++	+++
SQ30	-	+
SQ31	-	+
SQ32	-	+
SQ33	-	-
SQ34	+++	++
SQ35	-	++++
SQ36	-	+
SQ37	-	++

* A atividade das substâncias está representada por uma escala que vai de um sinal negativo "-", significando ausência total de atividade inibitória (relaxação do DNA observada é igual ou superior ao controle de reação da Topo II α sem adição de inibidor), passando pelos sinais positivos "+", "++", "+++ até "++++" onde este último representa uma atividade inibitória igual ou superior aos compostos-padrão avaliados: camptotecina ou etoposídeo (183).

1.6 Justificativa

Apesar das terapias disponíveis atualmente na clínica médica, o câncer tornou-se uma das maiores causas de morte em diversos países, sendo a leucemia responsável por muitas delas. Portanto, a descoberta de efetivos agentes anticancerígenos é de extrema importância para a oncoterapia.

A inibição de enzimas que contribuem para a sinalização celular e progressão do câncer configura uma promessa para o tratamento desta patologia. Nesse âmbito, inibidores enzimáticos que são projetados contra alvos que sofreram mutações ou que são superexpressos em células cancerosas, podem atuar mais seletivamente do que os quimioterápicos convencionais. No entanto, não há garantias de que todos esses novos alvos sejam drogáveis, isto é, apresentem propriedades físico-químicas adequadas para ligação de uma molécula orgânica pequena com características típicas de biodisponibilidade de um fármaco (consequência de características adequadas de peso molecular, superfície polar, presença de grupos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, etc). Assim, é imprescindível a busca contínua por novos compostos capazes de interferir com a atividade de alvos moleculares validados contra o câncer, mas que tenham melhor tolerabilidade ao tratamento advindo de um melhor perfil toxicológico.

Dentre os alvos mais importantes na quimioterapia antitumoral, destacam-se as enzimas DNA topoisomerases I e II α , devido a sua superexpressão em células de câncer. Essas enzimas são essenciais em processos celulares, como replicação, transcrição e segregação cromossomal, sendo, portanto, indispensáveis para o desenvolvimento e a divisão celular.

Os fármacos antitumorais atualmente utilizados na clínica e que atuam sob as topoisomerases, embora sejam efetivos, apresentam diversos efeitos adversos e toxicidade, podendo haver resistência celular a esses compostos. Portanto, é imprescindível a busca por novas substâncias capazes de apresentar alta eficácia, mas que tenham baixa toxicidade. Como as naftoquinonas também são inibidoras das topoisomerases, seus compostos naturais e sintéticos têm sido amplamente investigados e parecem ser promissores para a terapia do câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito citotóxico em linhagens de leucemia provocado por derivados de piranonaftoquinonas (PNQs) ativos sobre Topo I e/ou II α humanas.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade celular das linhagens leucêmicas A3, I2.1 e I9.2 e da linhagem normal WSS-1 após tratamento com cada uma das 35 PNQs;
- Analisar a ocorrência de apoptose nas células leucêmicas tratadas com PNQs citotóxicas;
- Identificar alterações no ciclo celular de células leucêmicas tratadas com PNQs citotóxicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Compostos avaliados

Novos compostos com núcleos 1,2- e 1,4-naftoquinônicos inibidores de topoisomerasas I e II humanas derivados de α e β -lapachona foram avaliados quanto ao potencial citotóxico e suas estruturas químicas estão representadas na Figura 13. Todas as substâncias foram diluídas em DMSO e os estoques foram mantidos na concentração de 10 mM a -20 °C.

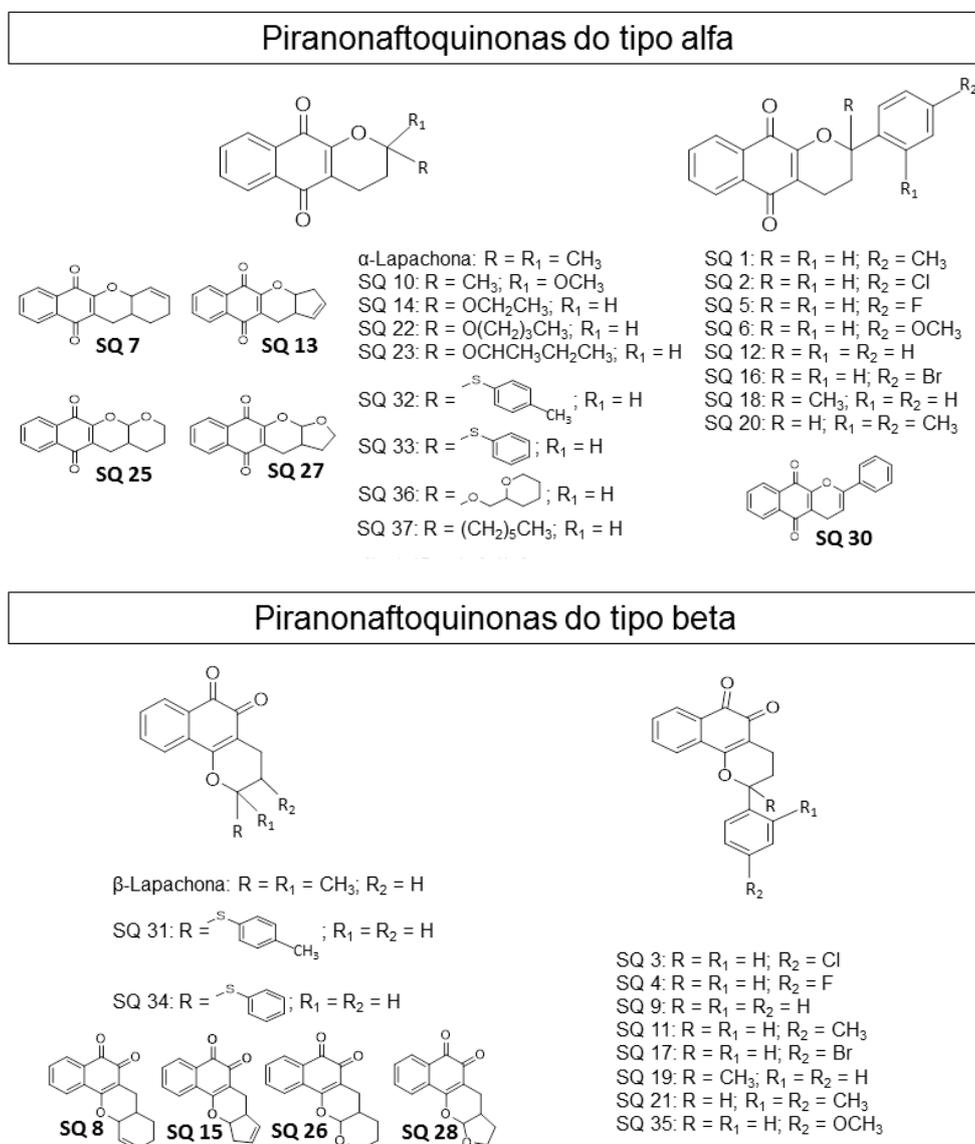


Figura 13: Estrutura geral das pirano-naftoquinonas derivadas de α - e β -lapachona.

3.2 Cultura celular

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho incluem linhagens leucêmicas humanas linfóides T A3 (ATCC[®] CRL-2570), I2.1 (ATCC[®] CRL-2572) e I9.2 (ATCC[®] CRL-2571) e a linhagem celular renal originária de um doador normal, WSS-1 (ATCC[®] CRL-2029). As células leucêmicas foram propagadas em meio RPMI-1640 (R8758, Sigma-Aldrich) e a linhagem normal em DMEM com alta concentração de glicose (D6429, Sigma-Aldrich), ambos suplementados com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 50 µg/mL gentamicina, e foram mantidas a 37 °C em estufa de 5% de CO₂.

Todas as linhagens trabalhadas foram rotineiramente avaliadas para detectar a contaminação por micoplasma, garantindo a esterilidade das culturas. Para isso, foi usado o método de PCR. A enzima *Taq* DNA polimerase (GoTaq, Promega) foi utilizada nas amplificações e as reações foram conduzidas em termociclador (Applied Biosystems). Inicialmente as amostras foram aquecidas por 5 min a 95 °C, seguido por 34 ciclos de 95 °C (1 min), 58 °C (1 min) e 72 °C (1 min). Por fim, foi realizada uma extensão de 7 min a 72 °C. Os oligonucleotídeos iniciadores usados foram o iniciador senso Mic1 (GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG) e o anti-senso Mic2 (CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G) (184).

3.3 Citotoxicidade dos derivados de piranoftoquinonas sobre as células leucêmicas e normal

As análises de viabilidade foram realizadas paralelamente sobre as células não-tratadas (controle negativo) e tratadas com os compostos-teste diluídos em meio de cultura após 24 ou 48 horas de incubação com os mesmos em placas de 96 poços. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo, por ser um agente citotóxico bem caracterizado na literatura.

3.3.1 Análise da viabilidade celular

Para aferir a citotoxicidade causada pelos derivados de piranoftoquinonas, foi utilizada solução de resazurina (Sigma-Aldrich) 0,1 mg/mL. Para os ensaios de viabilidade, 5×10^4 células/mL (linhagens leucêmicas) ou 1×10^4 células/mL (linhagem normal) foram sedimentadas em placa de 96 poços em um volume final de 100 μ L por poço. Estudos prévios do grupo identificaram, a partir de testes de hemólise com hemácias de cordeiro, que 200 μ M foi a concentração máxima a não induzir rompimento inespecífico de membrana plasmática. A fim de permitir maior segurança de trabalho com os compostos avaliados, para os ensaios de viabilidade foi escolhida uma concentração de teste abaixo do limite de hemólise. Portanto, foi realizada uma curva com concentrações crescentes dos compostos, até o limite de 100 μ M. Após 24 ou 48 horas de incubação com os compostos-teste, foi adicionada a solução de resazurina. As células foram novamente incubadas a 37 °C em estufa de 5% de CO₂ durante 30 min. A quantificação fluorimétrica ($\lambda_{\text{ex}} = 560$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm) foi feita no leitor de placas Flexstation-3 (Molecular Devices) no tempo inicial (0h; imediatamente após a adição da resazurina) e 30 min. O experimento foi feito utilizando-se três replicatas para cada condição testada e foi repetido no mínimo duas vezes. O valor de fluorescência referente ao ponto 0 h de cada poço foi descontado do resultado obtido após 30 min de incubação com a resazurina. Os valores de IC₅₀ foram calculados através de uma curva logística de quatro parâmetros no software SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, Chicago, IL). Os valores de IC₂₀ foram obtidos por interpolação gráfica a partir da curva de IC₅₀.

3.4 Análises de alto conteúdo (HCA, do inglês *High Content Analysis*)

Os ensaios de HCA foram realizados paralelamente sobre as células não-tratadas (controle negativo) e tratadas com doxorubicina (controle positivo) ou com os compostos-teste após 48 horas de incubação com os mesmos em placas de 96 poços. Para esses experimentos foram utilizados 100 μ L de células leucêmicas por poço na concentração de 5×10^4 células/mL.

A Figura 14 ilustra as etapas envolvidas nas análises de alto conteúdo.

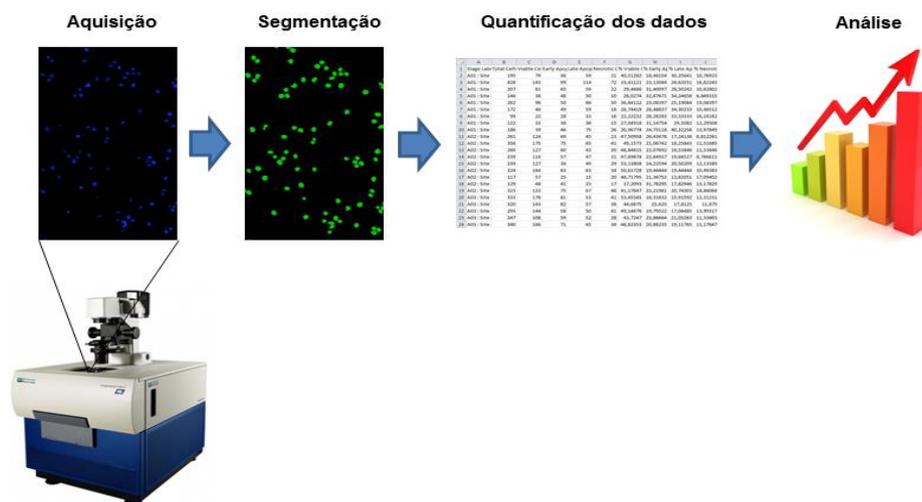


Figura 14: Fluxo de trabalho em HCA

3.4.1 Análise de apoptose

O kit “Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit I” (BD Biosciences) foi utilizado para determinar os percentuais de células apoptóticas, como descrito pelo fabricante. Após 48 h de tratamento com os compostos, as células foram incubadas com 1 μ L de FITC Anexina V, 1 μ L de iodeto de propídeo (IP) e 11 μ L de 10X Annexin V Binding Buffer por 15 min à temperatura ambiente no escuro. O núcleo das células foi marcado com 0,1 μ g/mL de Hoechst 33342 (Molecular Probes, NY) em uma incubação de 10 min. A Anexina V tem alta afinidade pela fosfatidilserina, que fica exposta em células apoptóticas por ser deslocada do interior da membrana plasmática para fora dela. Já o IP e o Hoechst são marcadores nucleares. Somente células mortas ou com a membrana danificada são permeáveis ao IP, enquanto que todas as células são permeáveis ao Hoechst. A presença de apoptose foi analisada dentro de uma hora através do ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices). Nove sítios por poço e três poços por tratamento foram adquiridos em objetiva de 20x. Foram utilizados os canais “DAPI” para adquirir células marcadas com Hoechst 33342, “FITC” para adquirir células marcadas com FITC Anexina V e “Texas Red” para adquirir células marcadas com IP. O percentual de apoptose foi determinado pelo módulo “Cell Health” do software MetaXpress (Molecular

Devices). Nesse módulo foram criadas máscaras de segmentação para cada uma das sondas utilizadas através de ajustes em função do tamanho e da intensidade de fluorescência dos objetos.

3.4.2 Efeitos sobre o ciclo celular

Para avaliar o efeito dos compostos testados sobre o ciclo celular das linhagens leucêmicas, foram utilizadas as mesmas imagens adquiridas com o ensaio de apoptose com 5 μM de composto. O módulo “Cell Cycle” do software MetaXpress foi utilizado para analisar as diferentes fases do ciclo celular. Nesse módulo foi criada uma máscara de segmentação para a sonda Hoechst 33342 através de ajustes em função do tamanho e da intensidade de fluorescência dos objetos. As regiões do ciclo foram selecionadas em função dos picos obtidos a partir do controle positivo (poços tratados com doxorubicina).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Viabilidade celular

As piranonaftoquinonas (PNQs) foram testadas em três linhagens de leucemia: A3, I2.1 e I9.2. Como controle positivo do ensaio, foi usada a doxorubicina, uma antraciclina inibidora de topoisomerase rotineiramente utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo a leucemia (63,65,185). Foi realizada uma curva de concentração dos compostos até o limite de 100 μ M e a citotoxicidade foi avaliada através da biorredução da resazurina. A partir dos dados encontrados, foi calculado o percentual da viabilidade celular de todos os pontos da curva de cada um dos compostos testados em relação ao controle negativo (100%). Esses percentuais foram usados na obtenção dos valores de IC_{50} (inibição de 50% da viabilidade) através de ajuste por regressão não-linear à função logística de 4 parâmetros, função que é largamente utilizada em bioensaios como curva dose-resposta, por exemplo (186). Os resultados referentes ao tratamento por 24 e 48h de incubação com os compostos encontram-se na Tabela 2 e curvas representativas dos dados encontrados são apresentadas pela Figura 15 (A, B e C).

Tabela 2: Atividade citotóxica de PNQs durante 24 e 48h de incubação em células leucêmicas.

Composto*	24h			48h		
	A3	I2.1	I9.2	A3	I2.1	I9.2
	IC ₅₀ (µM) ± EP					
SQ1	IC ₅₀ > 100	CSA	CSA	22,3 ± 3,3	CSA	21,5 ± 2,4
SQ2	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100	ND	ND	ND
SQ3	1,8 ± 0,4	1,4 ± 0,2	3,2 ± 0,3	1,9 ± 0,4	2,2 ± 0,2	2,4 ± 0,2
SQ4	2,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,6 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1
SQ5	CSA	65,8 ± 3,7	CSA	40,6 ± 2,6	CSA	48,3 ± 13,1
SQ6	IC ₅₀ > 100	ND				
SQ7	60 ± 12	IC ₅₀ > 100	CSA	9,4 ± 1,5	23,3 ± 1,7	12,7 ± 1,9
SQ8	8,4 ± 0,4	12 ± 1	CSA	4,8 ± 0,5	CSA	4,6 ± 0,4
SQ9	2,9 ± 0,5	2,2 ± 0,4	2,5 ± 0,5	2,2 ± 0,1	2,7 ± 0,2	1,4 ± 0,2
SQ10	IC ₅₀ > 100					
SQ11	0,50 ± 0,08	0,3 ± 0,1	CSA	0,69 ± 0,04	0,83 ± 0,05	0,95 ± 0,02
SQ12	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100	ND	ND	IC ₅₀ > 100
SQ13	25 ± 4	28,6 ± 7,5	CSA	CSA	CSA	7,8 ± 0,6
SQ14	IC ₅₀ > 100	61,2 ± 6,8	CSA	CSA	CSA	CSA
SQ15	20 ± 2	27,6 ± 1,8	24,6 ± 6,5	15,9 ± 1,5	CSA	15,5 ± 1,5
SQ16	IC ₅₀ > 100	75,8 ± 16,6	CSA			
SQ17	1,9 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,75 ± 0,06	0,97 ± 0,05
SQ18	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100	59,3 ± 22,9	62,8 ± 13,6	IC ₅₀ > 100
SQ19	3,6 ± 0,2	3,2 ± 0,3	3,0 ± 0,6	2,6 ± 0,3	2,1 ± 0,1	1,17 ± 0,07
SQ20	IC ₅₀ > 100					
SQ21	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1
SQ22	65 ± 12	CSA	CSA	23,8 ± 3,4	CSA	35,28 ± 4,04
SQ23	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100	CSA	60,2 ± 22,4	68,1 ± 26,7	19,3 ± 8,5
SQ25	14 ± 1	12 ± 1	8,9 ± 1,7	5,6 ± 0,7	6,2 ± 0,6	2,0 ± 0,7
SQ26	7,5 ± 0,8	7,6 ± 0,5	9 ± 1	6,9 ± 0,2	4,03 ± 0,37	2,9 ± 0,3
SQ27	CSA	23,6 ± 2,3	11,7 ± 1,7	15,9 ± 1,8	24 ± 1	12,1 ± 1,3
SQ28	CSA	12,7 ± 0,6	7,6 ± 0,6	13,8 ± 1,5	17 ± 1	8,7 ± 1,1
SQ30	IC ₅₀ > 100					
SQ31	2,6 ± 0,2	3,3 ± 0,4	3,7 ± 0,5	1,8 ± 0,2	2,7 ± 0,3	4,3 ± 0,9
SQ32	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100	ND	ND	CSA
SQ33	CSA	IC ₅₀ > 100	CSA	52,9 ± 5,7	62,5 ± 12,8	39,8 ± 5,4
SQ34	CSA	CSA	CSA	1,2 ± 0,2	CSA	CSA
SQ35	1,5 ± 0,4	1,6 ± 0,3	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,1	1,17 ± 0,05	CSA
SQ36	CSA	IC ₅₀ > 100	11,5 ± 2,3	6,0 ± 0,6	7,4 ± 0,7	3,6 ± 0,5
SQ37	IC ₅₀ > 100					
Alfa-lap	24,4 ± 0,8	CSA	CSA	20,4 ± 1,4	28,5 ± 4,4	14,8 ± 1,9
Beta-lap	3,4 ± 0,1	CSA	IC ₅₀ > 100	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,27 ± 0,06
Doxo	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,029 ± 0,006	0,062 ± 0,003	0,051 ± 0,001

* A doxorubicina (Doxo) foi utilizada como controle positivo e os precursores α e β-lapachona (Alfa-lap e Beta-lap, respectivamente) foram testados com fins comparativos. EP: erro padrão; CSA: curva sem ajuste; ND: não determinado; IC₅₀>100: valor não calculado por necessitar de concentrações superiores ao limite testado (100 µM).

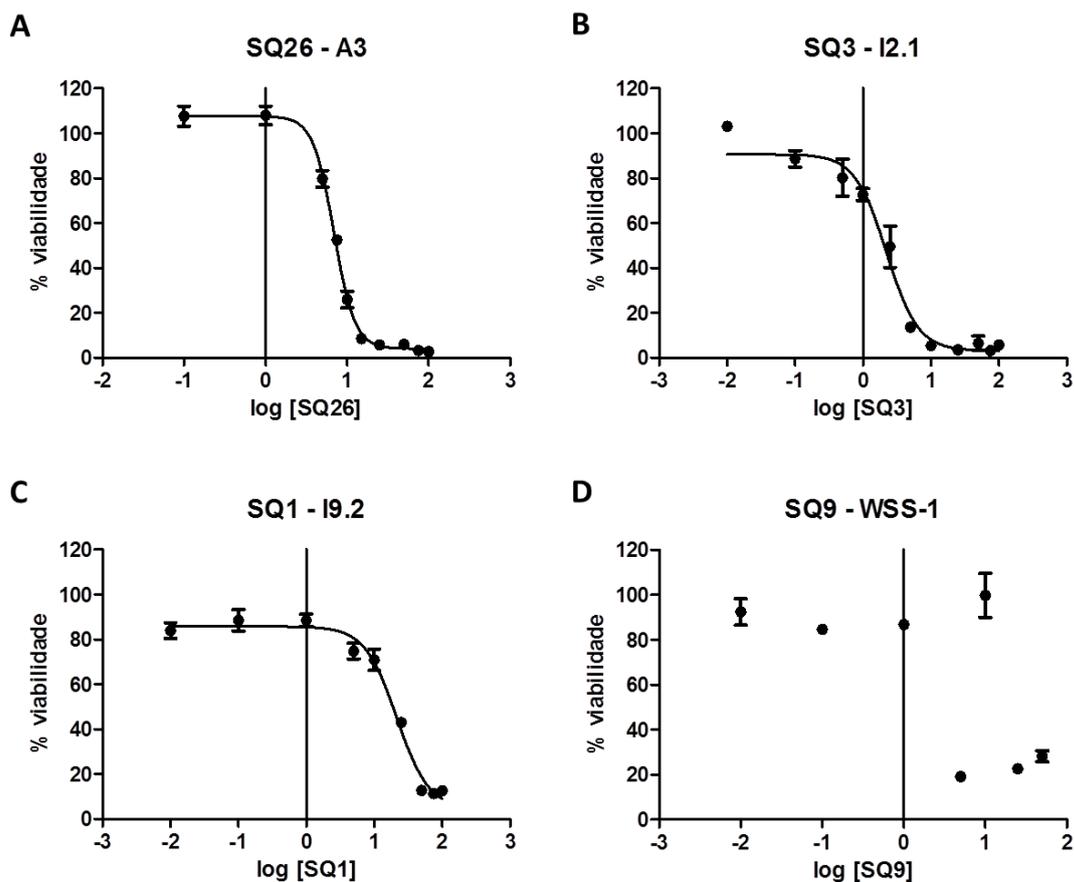


Figura 15: Curvas representativas de IC₅₀. Os gráficos apresentam o percentual de viabilidade celular em função das concentrações de composto em escala logarítmica. Curvas referentes ao tratamento com: A) SQ26 sobre a linhagem A3; B) SQ3 sobre a linhagem I2.1; C) SQ1 sobre a linhagem I9.2 e D) SQ9 sobre a linhagem WSS-1.

Em muitos casos, o efeito citotóxico dos compostos da série testada foi maior no tratamento de 48h do que no de 24h, como é o caso de SQ1 e SQ7, por exemplo. Para a linhagem A3, em 24h SQ1 teve um efeito citotóxico baixo, pois seriam necessárias concentrações superiores ao limite testado (100 μ M) para que seu IC₅₀ pudesse ser determinado. No entanto, em 48h, 22,3 μ M de composto já foram suficientes para reduzir a viabilidade celular para 50% em relação ao controle negativo (ausência de PNQs e doxorubicina). Ainda em relação a essa mesma linhagem, a SQ7 teve um IC₅₀ de 60 μ M em 24h de incubação e, em 48h, a concentração responsável por gerar o mesmo efeito sobre a viabilidade das células reduziu para 9,4 μ M.

Além disso, é possível observar que os derivados da β -lapachona foram mais potentes que os da α -lapachona. Os β -derivados tiveram valores de IC₅₀ variando entre 0,3 e 27,6 μ M, ao passo que a faixa dos α -derivados ficou entre

2 e 75,8 μM . Essa mesma relação é observada quando comparamos os precursores α -lapachona (IC_{50} variou de 14,8 a 28,5 μM) e β -lapachona (IC_{50} variou de 1,2 a 3,4 μM). A partir desses dados, verificamos que alguns compostos da série apresentaram potência superior à de seus precursores. A SQ11, por exemplo, no tratamento de 48h na linhagem A3 teve um IC_{50} de 0,69 μM , enquanto a β -lapachona, precursora desse composto, apresentou IC_{50} de 1,3 μM para a mesma linhagem durante o mesmo tempo de tratamento.

A doxorubicina, por sua vez, foi o composto que apresentou maior potência dentre todos os testados sobre as células leucêmicas (IC_{50} variou de 0,029 a 0,12 μM). No entanto, ainda era preciso avaliar cada um desses compostos quanto à seletividade dos mesmos. As substâncias utilizadas atualmente para a quimioterapia do câncer acabam por afetar drasticamente a divisão de células normais do organismo, desencadeando assim uma série de efeitos adversos (187). Dessa forma, um dos maiores objetivos da oncoterapia é identificar compostos que otimizem a atividade antitumoral, mas que apresentem menores efeitos adversos e baixa toxicidade (188,189). Em virtude disso, foi realizada uma curva de concentração dos compostos até o limite de 100 μM em uma linhagem celular normal (WSS-1). A Tabela 3 contém os valores encontrados para essa linhagem durante 24 e 48h de incubação com os compostos.

Tabela 3: Atividade citotóxica de PNQs durante 24 e 48h de incubação em células normais (WSS-1).

Composto*	24h	48h
	IC ₅₀ (µM) ± EP	IC ₅₀ (µM) ± EP
SQ1	IC ₅₀ > 100	26,7 ± 4,8
SQ2	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100
SQ3	5,5 ± 0,6	4,8 ± 0,2
SQ4	IC ₅₀ > 100	1,4 ± 0,3
SQ5	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100
SQ6	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100
SQ7	IC ₅₀ > 100	45,0 ± 4,3
SQ8	CSA	CSA
SQ9	IC ₅₀ > 100	CSA
SQ10	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100
SQ11	IC ₅₀ > 100	CSA
SQ12	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100
SQ13	IC ₅₀ > 100	18,6 ± 1,9
SQ14	IC ₅₀ > 100	CSA
SQ15	31,8 ± 3,7	CSA
SQ16	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100
SQ17	1,04 ± 0,07	0,16 ± 0,06
SQ18	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100
SQ19	4,3 ± 0,5	4,5 ± 0,3
SQ20	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100
SQ21	IC ₅₀ > 100	1,5 ± 0,5
SQ22	IC ₅₀ > 100	CSA
SQ23	IC ₅₀ > 100	CSA
SQ25	IC ₅₀ > 100	9,9 ± 1,2
SQ26	7,6 ± 0,7	7,2 ± 0,5
SQ27	3,6 ± 1,2	46,6 ± 18,1
SQ28	CSA	22,3 ± 2,8
SQ30	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100
SQ31	6,2 ± 0,6	4,5 ± 0,3
SQ32	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100
SQ33	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100
SQ34	IC ₅₀ > 100	CSA
SQ35	IC ₅₀ > 100	2,7 ± 0,6
SQ36	IC ₅₀ > 100	9,6 ± 1,1
SQ37	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100
Alfa-lap	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100
Beta-lap	IC ₅₀ > 100	IC ₅₀ > 100
Doxo	IC ₅₀ >10	0,024 ± 0,004

* A doxorubicina (Doxo) foi utilizada como controle positivo e os precursores α e β-lapachona (Alfa-lap e Beta-lap, respectivamente) foram testados com fins comparativos. CSA: curva sem ajuste; IC₅₀>100: valor não calculado por necessitar de concentrações superiores ao limite testado (100 µM).

Os dados encontrados para a linhagem normal mostram que a maioria dos compostos apresenta baixo efeito citotóxico ($IC_{50} > 100 \mu M$) quando o tratamento tem duração de 24h. Com o aumento do tempo de incubação para 48h, alguns compostos passam a apresentar maior grau de toxicidade. No entanto, muitos deles não foram mensuráveis por uma dificuldade em se obter uma curva ajustada, como é o caso da SQ9, por exemplo (Figura 15 D). Essa problemática de curva sem ajuste (CSA) também foi observada em algumas situações nos ensaios com células leucêmicas (Tabela 2). Tal característica pode ser atribuída a um perfil inerente de alguns compostos, como questões envolvendo, por exemplo, solubilidade e efeito “tudo ou nada”. Sendo assim, esses compostos não teriam muita aplicabilidade para um futuro uso terapêutico e, portanto, a investigação dos mesmos nesse trabalho foi descontinuada.

Os resultados do ensaio com a linhagem normal revelaram ainda que a doxorrubicina foi muito mais potente em 48h ($IC_{50} = 0,024 \mu M$) do que em 24h de tratamento ($IC_{50} > 10 \mu M$). O IC_{50} encontrado para WSS-1 foi praticamente o mesmo da linhagem leucêmica A3 ($0,029 \mu M$), valor esse que é ainda menor do que os determinados para as linhagens I2.1 e I9.2 ($0,062$ e $0,051 \mu M$, respectivamente) durante o mesmo tempo de tratamento. Ou seja, a doxorrubicina apresenta baixíssimo grau de seletividade, podendo ser até mais tóxica para células normais do que cancerosas. Esse dado corrobora as informações encontradas na literatura, na qual a doxorrubicina é descrita por apresentar inúmeros efeitos adversos, sendo a cardiotoxicidade o mais acentuado deles (185).

Uma vez que o tratamento de 48h gerou efeitos citotóxicos mais potentes para muitos dos compostos, esse foi o tempo de incubação escolhido para dar prosseguimento ao estudo. Dessa forma, os compostos que tiveram valores de IC_{50} mensuráveis para as linhagens leucêmicas e para a linhagem normal em 48h de tratamento foram selecionados para que fosse identificado o índice de seletividade (IS) dos mesmos. Para tal, foi calculada a razão entre o valor de IC_{50} obtido para a linhagem normal e para a leucêmica (Tabela 4).

Tabela 4: Índice de seletividade (IS) dos compostos em 48h de tratamento

Composto	A3	(WSS-1/A3)	I2.1	(WSS-1/I2.1)	I9.2	(WSS-1/I9.2)	WSS-1
	IC ₅₀ (μ M)	IS	IC ₅₀ (μ M)	IS	IC ₅₀ (μ M)	IS	IC ₅₀ (μ M)
SQ3	1,9	2,5	2,2	2,2	2,4	2,0	4,8
SQ4	1,6	0,8	1,3	1,1	1,3	1,0	1,4
SQ7	9,4	4,8	23,3	1,9	12,7	3,5	45,0
SQ17	0,4	0,4	0,75	0,2	0,97	0,2	0,16
SQ19	2,6	1,7	2,1	2,1	1,17	3,8	4,5
SQ21	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,5
SQ25	5,6	1,7	6,2	1,6	2,0	4,9	9,9
SQ26	6,9	1,0	4,03	1,8	2,9	2,4	7,2
SQ27	15,9	2,9	24,0	1,9	12,1	3,8	46,6
SQ28	13,8	1,6	17,0	1,3	8,7	2,5	22,3
SQ31	1,8	2,5	2,7	1,6	4,3	1,0	4,5
SQ36	6,0	1,6	7,4	1,3	3,6	2,6	9,6
Alfa-lap	20,4	$\geq 4,9$	28,5	$\geq 3,5$	14,8	$\geq 6,7$	IC ₅₀ > 100
Beta-lap	1,3	$\geq 20,4$	1,2	$\geq 83,3$	1,27	$\geq 78,7$	IC ₅₀ > 100

IC₅₀>100: valor não calculado por necessitar de concentrações superiores ao limite testado (100 μ M).

A partir da análise dos IS, constatamos que algumas PNQs apresentam baixa seletividade entre as linhagens leucêmicas e a normal, como é o caso da SQ17, por exemplo. Esse composto chegou a ser mais tóxico para a linhagem normal do que para as leucêmicas (IS variou entre 0,17 e 0,35). Em contrapartida, alguns compostos mostraram seletividade maior, como é o caso da SQ25, que foi quase cinco vezes mais potente para a linhagem leucêmica I9.2 do que para a linhagem normal.

Vale ressaltar que o IS dos compostos precursores α e β -lapachona não foi precisamente determinado, pois o IC₅₀ dos mesmos na linhagem normal não pôde ser calculado (IC₅₀ > 100 μ M). No entanto, é possível identificar valores mínimos de IS para esses compostos admitindo um IC₅₀ de pelo menos 100 μ M para a linhagem WSS-1. Essa análise fornece um dado de extrema relevância: essas moléculas apresentaram um alto grau de seletividade pelas células leucêmicas. Em especial a β -lapachona, cujo IS para a linhagem leucêmica I2.1 chega a ser $\geq 83,3$. Esse resultado é corroborado por dados da literatura, onde já foram descritos estudos mostrando a seletividade da β -lapachona por células cancerosas em relação a células normais (176,190).

Os dados obtidos a partir do grau de seletividade dos compostos testados foram utilizados a fim de selecionar as PNQs que dariam continuidade ao

trabalho. No entanto, com o intuito de se obter maior abrangência de informações a respeito do efeito dessas moléculas sobre as células leucêmicas, também foram utilizados como critério de escolha as diferentes potências de cada composto entre as diferentes linhagens, bem como a origem estrutural de cada um - derivados de α ou β -lapachona (Figura 16). Considerou-se ainda sua atividade inibitória *in vitro* contra topoisomerasas previamente descrita (Tabela 5) (183).

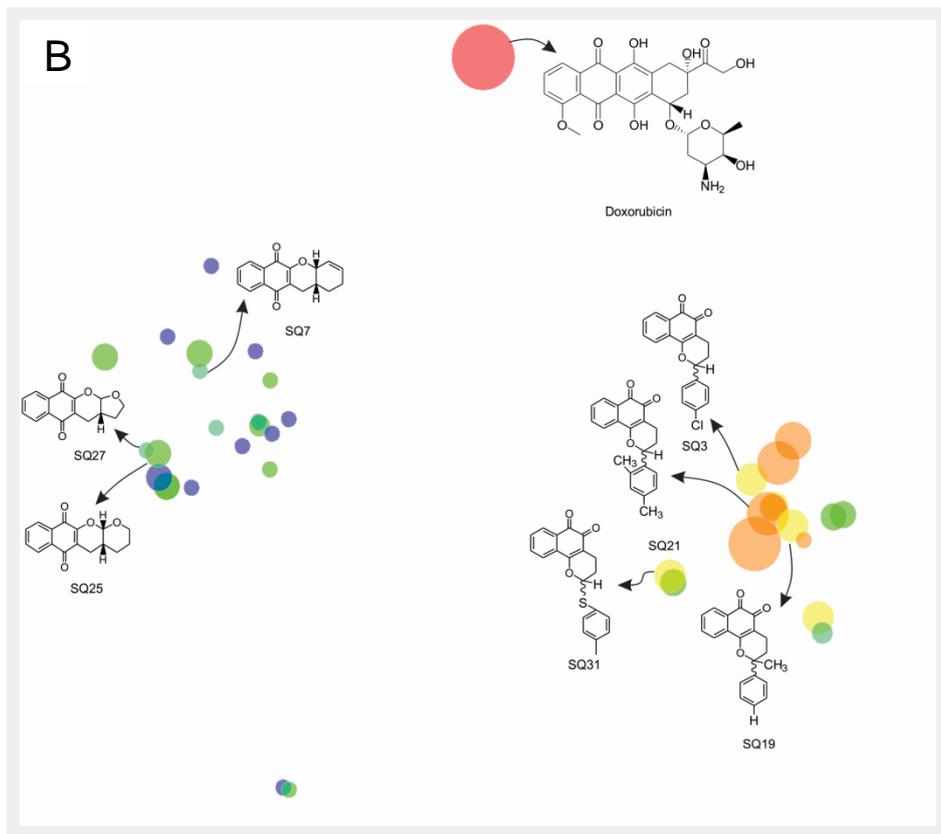
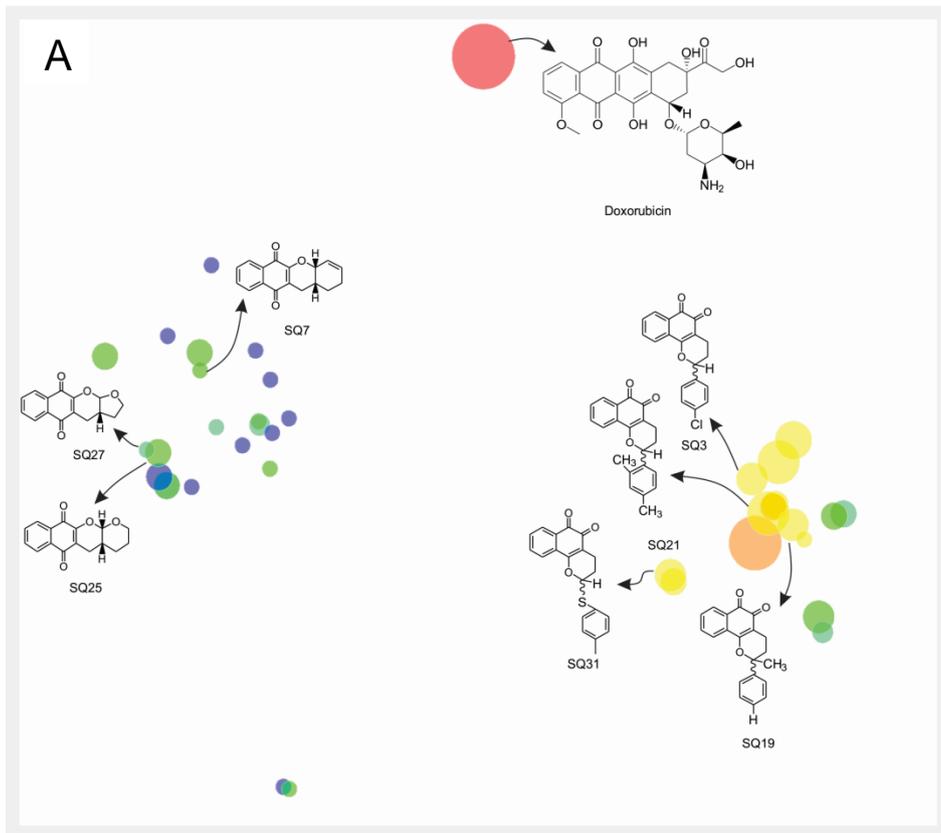


Figura 16: (continua na próxima página)

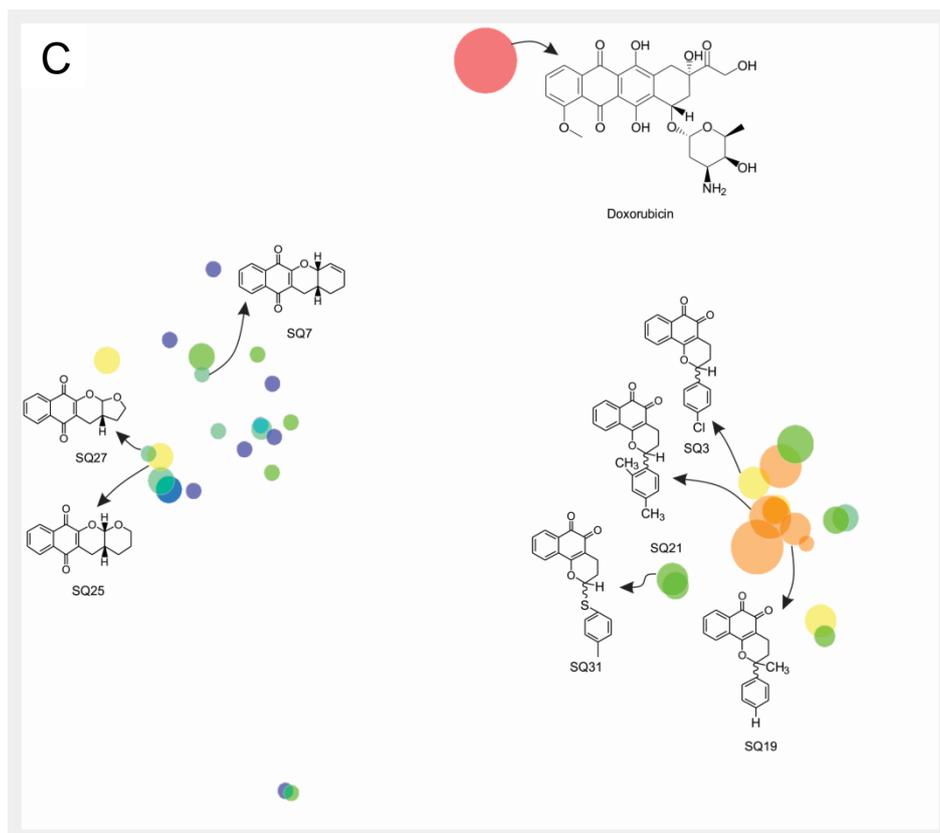


Figura 16: Mapa de relação estrutura-atividade (SAR) para a ação citotóxica das PNQs contra as linhagens de leucemia A3 (A), I2.1 (B) e I9.2 (C). Cada círculo representa uma PNQ e a distância entre as moléculas no mapa é inversamente proporcional à similaridade estrutural, conforme calculado pelo índice de Tanimoto, a partir de descritores estruturais do tipo “Unity Fingerprints”. Para cada linhagem celular, os círculos foram coloridos de acordo com o IC_{50} dos compostos, indo do menos potente em lilás até o mais potente em vermelho. O diâmetro dos círculos é proporcional à potência citotóxica contra a linhagem normal WSS-1. Os mapas de SAR foram gerados no pacote de modelagem molecular Sybyl-X 2.1 (Tripos Inc., St. Louis, MO, EUA).

Tabela 5: Relação entre efeito citotóxico das PNQs e respectivas atividades inibitórias contra topoisomerases

Composto	A3	I2.1	I9.2	WSS-1	Atividade contra*	
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	Topo I	Topo IIα
SQ3	1,9	2,2	2,4	4,8	-	+++
SQ4	1,6	1,3	1,3	1,4	+	+++
SQ7	9,4	23,3	12,7	45	-	+
SQ17	0,4	0,75	0,97	0,16	++	-
SQ19	2,6	2,1	1,17	4,5	+	++++
SQ21	1,2	1,2	1,2	1,5	++	++++
SQ25	5,6	6,2	2	9,9	++	+++
SQ26	6,9	4,03	2,9	7,2	-	+
SQ27	15,9	24	12,1	46,6	+	+++
SQ28	13,8	17	8,7	22,3	+++	+++
SQ31	1,8	2,7	4,3	4,5	-	+
SQ36	6	7,4	3,6	9,6	-	+

* A atividade das substâncias está representada por uma escala que vai de um sinal negativo “-”, significando ausência total de atividade inibitória (relaxação do DNA observada é igual ou superior ao controle de reação da Topo IIα sem adição de inibidor), passando pelos sinais positivos “+”, “++”, “+++” até “++++” onde este último representa uma atividade inibitória igual ou superior aos compostos-padrão avaliados: camptotecina ou etoposídeo (183).

Dessa forma, para a realização das análises de alto conteúdo foram escolhidos os compostos SQ3, para análises sobre as três linhagens leucêmicas; SQ7, para as linhagens A3 e I9.2; SQ19, para a linhagem I9.2; SQ21, para todas as três linhagens; SQ25, para a linhagem I9.2; SQ27, para todas as três linhagens e SQ31, para a linhagem A3 (Figura 17).

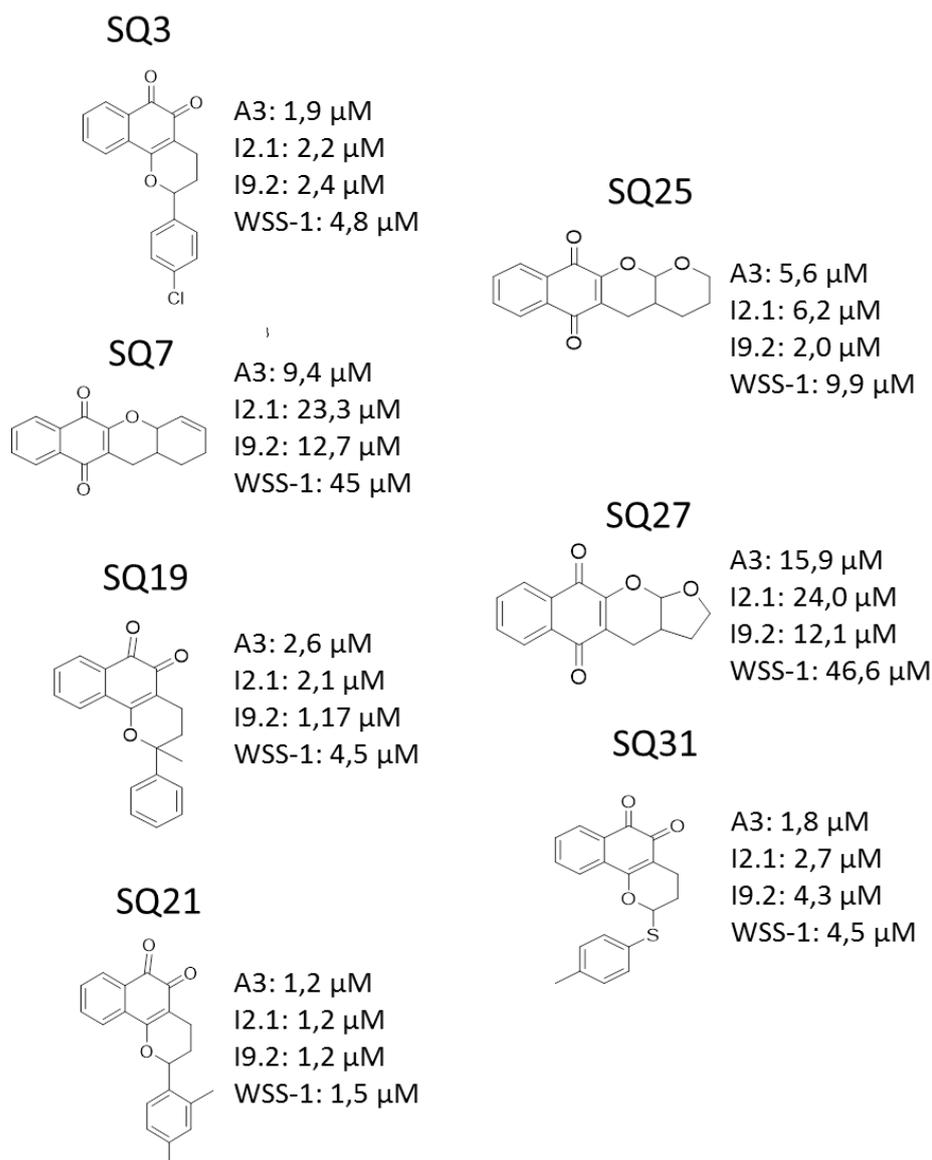


Figura 17: Estrutura e IC₅₀ dos compostos selecionados. Estrutura molecular das PNQs selecionadas para os ensaios de HCA. Ao lado de cada composto estão os valores de IC₅₀ obtidos durante 48h de tratamento para cada linhagem indicada.

4.2 Apoptose

Em diversas patologias humanas a morte celular é um processo desregulado e, portanto, testes que medem fenômenos relacionados à morte celular são amplamente utilizados para o descobrimento de fármacos (191). A inativação da morte celular programada, ou apoptose, é um componente

essencial para o desenvolvimento do câncer, de forma que a modulação dessa resposta provou ser uma estratégia terapêutica bastante eficaz (192).

Tendo em vista o potencial citotóxico dos compostos selecionados a partir dos resultados de viabilidade pelo método da resazurina, foram realizados ensaios de HCA para avaliar o efeito apoptótico das PNQs sobre as linhagens de leucemia. Assim, as células leucêmicas foram incubadas por 48h com os compostos e a morte celular foi detectada através das sondas Hoechst 33342, FITC-Anexina V e iodeto de propídeo, como descrito no item 3.4.1. Esse tipo de marcação fluorescente permite classificar as células em três diferentes condições: viáveis (An^{-}/IP^{-}), apoptose inicial (An^{+}/IP^{-}) ou morte celular (An^{+}/IP^{+} ; An^{-}/IP^{+}), como representado pela Figura 18.

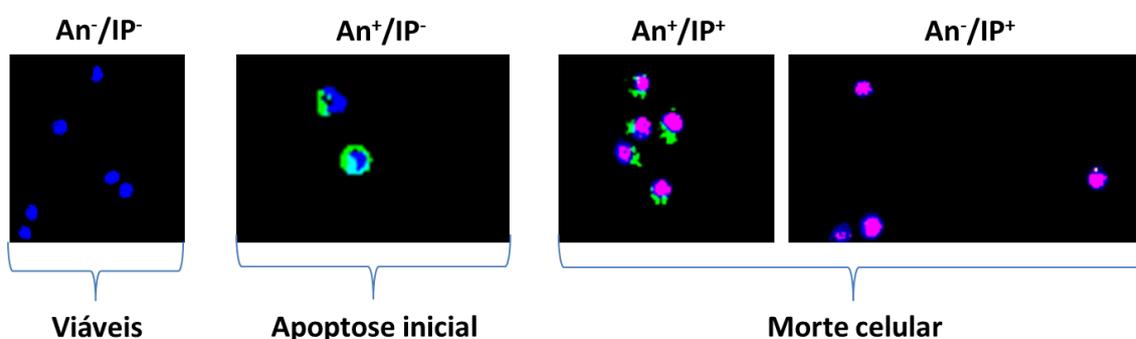


Figura 18: Esquema representativo da classificação de morte celular.

Para esses testes foram usadas concentrações referentes ao IC_{20} e ao IC_{50} determinados para cada linhagem. Além disso, foi usada também a concentração fixa de $5 \mu M$ para permitir a comparação do efeito provocado por uma mesma quantidade de composto nas diferentes linhagens.

No entanto, o percentual de morte celular referente aos valores de IC_{20} e IC_{50} foi subestimado para a maioria dos compostos. Ou seja, utilizando-se a concentração referente ao valor de IC_{50} no ensaio de resazurina, esperava-se encontrar cerca de 50% de células não viáveis no ensaio de HCA. Porém, o observado nesses casos foi que o percentual de morte celular era bem inferior a 50%, exceto para doxorrubicina, que manteve o efeito de morte esperado para as concentrações testadas. A Figura 19 mostra exemplos representativos das situações encontradas para diferentes compostos e linhagens.

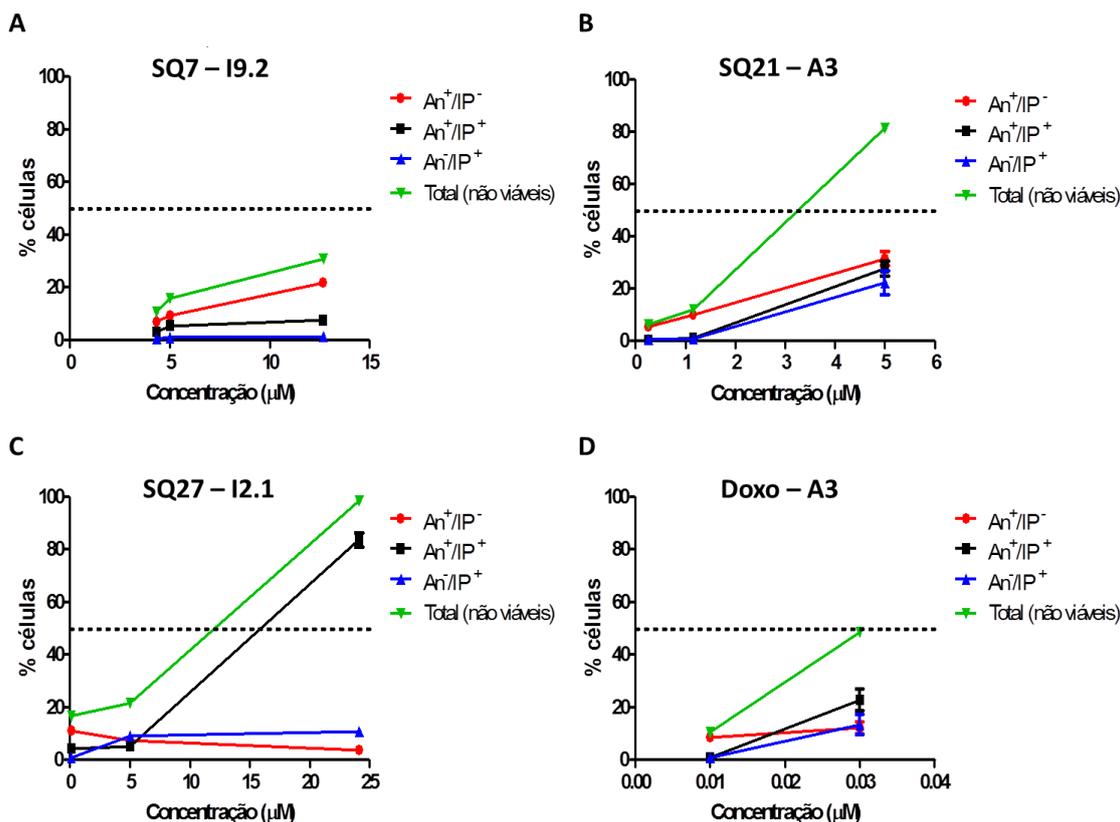


Figura 19: Representação dos percentuais de morte celular nas diferentes concentrações testadas em HCA. Os gráficos apresentam os percentuais de células mortas (An⁺/IP⁺, An⁻/IP⁺) ou em apoptose inicial (An⁺/IP⁻) e o total de células não viáveis (An⁺/IP⁻, An⁺/IP⁺, An⁻/IP⁺). A linha tracejada destaca a região referente ao valor esperado para a concentração do IC₅₀. A) IC₂₀, IC₅₀ e 5 µM de SQ7 para a linhagem I9.2; B) IC₂₀, IC₅₀ e 5 µM de SQ21 para a linhagem A3; C) IC₂₀, IC₅₀ e 5 µM de SQ27 para a linhagem I2.1; D) IC₂₀ e IC₅₀ de doxorubicina para a linhagem A3. An⁻ = Anexina V negativa; An⁺ = Anexina V positiva; IP⁻ = iodeto de propídeo negativo; IP⁺ = iodeto de propídeo positivo.

Como podemos observar nos exemplos mostrados, o total de células não viáveis para a maioria dos compostos não atingiu a faixa tracejada dos gráficos (50% do total de células), embora fosse esperado que o ponto referente à concentração do IC₅₀ ficasse próximo a essa linha. Em alguns casos, o percentual de células não viáveis referente à concentração de IC₅₀ ficou próximo do IC₂₀, como está representado pela SQ21 na linhagem A3 (Figura 18 B). A doxorubicina, no entanto, teve valores de IC₅₀ coincidentes entre os dois diferentes métodos. Já no caso da SQ27, o IC₅₀ estimado pelo ensaio da resazurina apresentou alta taxa de células em apoptose tardia, chegando a ultrapassar a condição de 50% de células não viáveis.

A viabilidade celular determinada pela resazurina configura um ensaio metabólico, pois envolve a atividade mitocondrial da célula. Enzimas mitocondriais, como a NADH desidrogenase, são provavelmente responsáveis pela transferência de elétrons de NADH para a resazurina, que é reduzida à resorufina (193). O ensaio de apoptose, por sua vez, está relacionado à integridade de membrana e a alterações morfológicas envolvidas com o processo de apoptose. O iodeto de propídeo é impermeável à membrana celular, marcando somente células com comprometimento de membrana. A anexina V é utilizada por marcar a fosfatidilserina, fosfolípido exclusivamente interno à membrana que torna-se exposto à superfície celular desde os estágios iniciais do processo apoptótico (194).

Sendo assim, essa diferença de resultados entre a análise de viabilidade com resazurina e o estudo de apoptose em HCA pode ser atribuída às diferenças existentes no princípio de cada um desses dois métodos. Entretanto, deve-se destacar que a definição de morte pela NCCD, i.e., “são consideradas mortas somente as células que exibem uma permeabilização irreversível da membrana plasmática”, é diretamente relacionada apenas aos resultados oriundos da técnica de HCA. Além disso, a redução na capacidade redutora de uma célula, conforme medido pelo método da resazurina, pode não necessariamente implicar num processo irreversível de morte celular. Inclusive, compostos com facilidade de sofrerem reações de oxirredução podem interferir com o ensaio ao reagirem com a resazurina ou afetarem o *pool* de equivalentes redutores da célula. Desta forma, o uso da técnica de HCA ou de outros marcadores bioquímicos de viabilidade celular (e.g. ATP) podem ser alternativas metodológicas mais precisas para estudos de citotoxicidade.

Tendo em vista a diferença de informações observadas para as PNQs, foi escolhido somente o ponto de 5 μM para dar prosseguimento às análises. A doxorubicina permaneceu como controle positivo no seu valor de IC_{50} . Os resultados do ensaio de apoptose nas três linhagens estão representados na Figura 20.

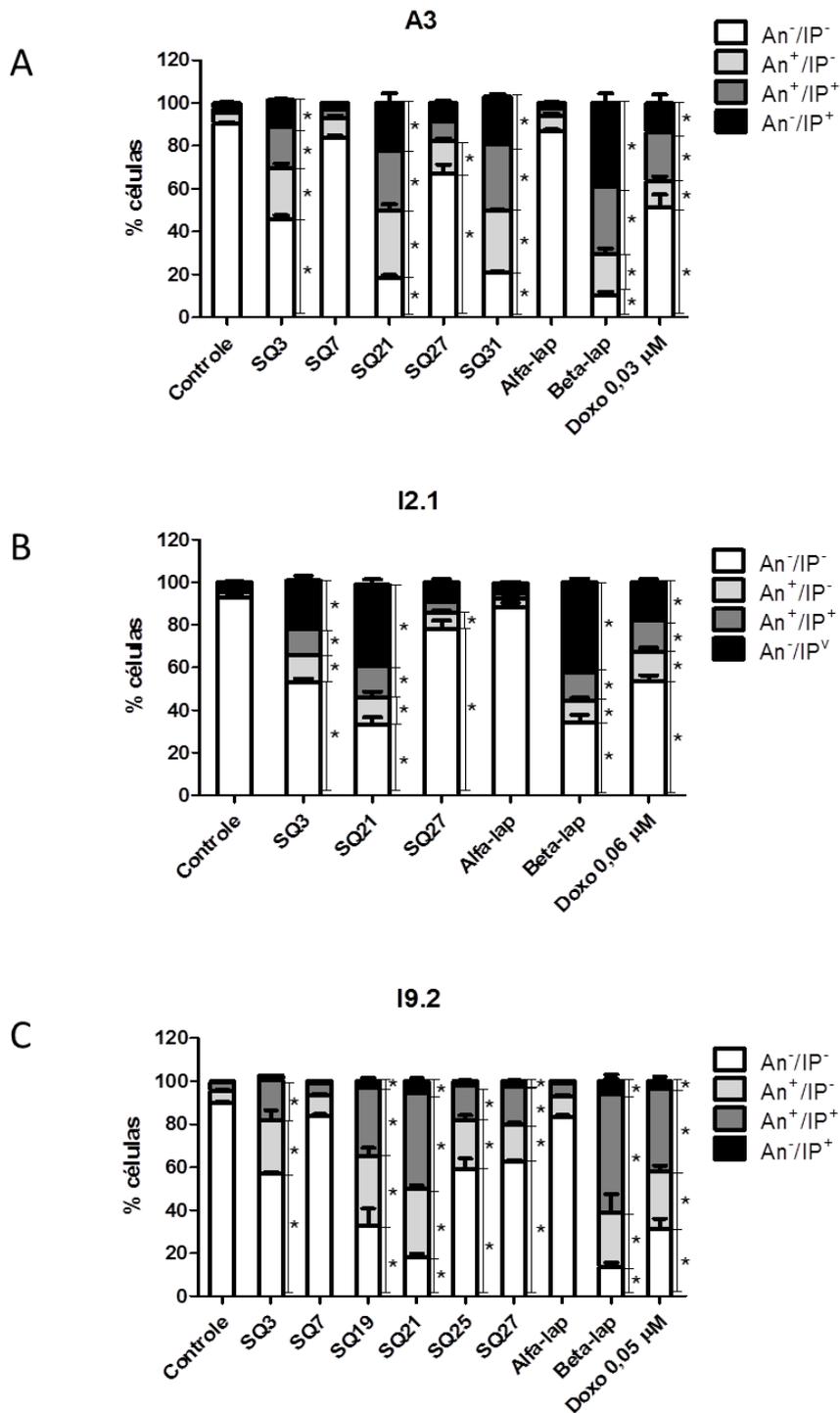


Figura 20: Ensaio de apoptose por HCA. As células foram incubadas por 48h com 5 μ M de composto. A) resultados referentes à linhagem A3; B) resultados referentes à linhagem I2.1; C) resultados referentes à linhagem I9.2. As colunas representam médias e as barras de erro, os valores de desvio padrão, $n = 3$. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, segundo teste de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey.

De acordo com a literatura, o tratamento com doxorubicina é responsável por reduzir o número de células viáveis ao induzir apoptose em diversas linhagens celulares, incluindo a leucêmica parental da A3, a Jurkat (195–200). Os resultados apresentados revelam que, como esperado, a doxorubicina provocou diminuição no total de células viáveis com aumento de células apoptóticas em relação ao controle, independentemente da linhagem testada (Figura 20 A, B e C).

A Figura 19 indica ainda que a maioria dos compostos teve efeito sobre a morte celular. Na linhagem A3 (Figura 20 A), todos os compostos tiveram aumento dos percentuais de células não viáveis em relação ao controle, exceto a SQ7 e a α -lapachona. À exceção da SQ27, que só aumentou o número de células em apoptose inicial, todos os outros compostos geraram aumento de percentual de células não-viáveis em cada uma das condições analisadas. O mesmo padrão visto em A3 se repetiu para a linhagem I2.1 (Figura 20 B), i.e., α -lapachona foi indistinguível do controle e a SQ27 permaneceu aumentando apenas o percentual de células em apoptose inicial. O restante dos compostos provocou aumento dos percentuais de morte celular em todas as condições avaliadas. Quanto à linhagem I9.2 (Figura 20 C), embora SQ7 e α -lapachona tenham apresentado a mesma resposta vista nas duas outras linhagens, observamos que a SQ27, ao reduzir o número de células viáveis, passou a gerar mais células em outros estágios de morte celular, além da apoptose inicial. O restante dos compostos alterou todos os parâmetros de morte celular em relação ao controle, exceto a SQ3 e SQ25 que não tiveram diferença em relação ao controle para a marcação An⁻/IP⁺.

Como as PNQs que apresentaram perfil de resposta diferenciado em relação ao restante dos compostos, SQs 7, 25 e 27, são derivadas da α -lapachona e esta não interferiu na morte celular em nenhuma das linhagens, decidimos analisar os dados anteriores com base na origem estrutural das moléculas (α ou β -derivados), como mostram as Figuras 21, 22 e 23.

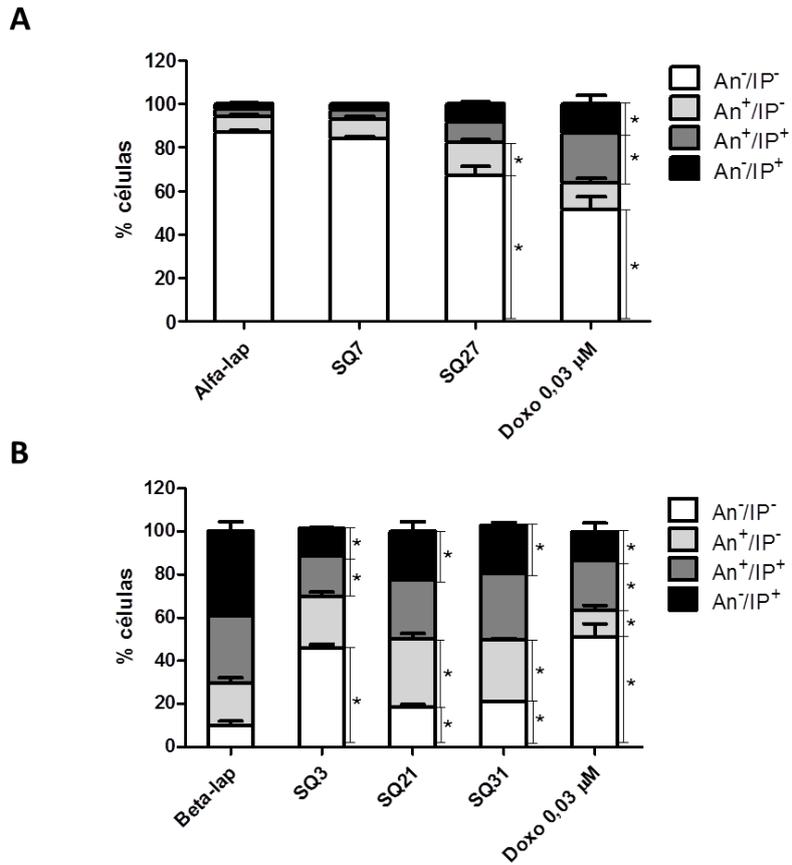


Figura 21: Ensaio de apoptose por HCA na linhagem A3. As colunas representam médias e as barras de erro, os valores de desvio padrão, $n = 3$. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao composto precursor (α ou β -lapachona), segundo teste de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey. A doxorubicina na concentração de IC_{50} foi incluída apenas para fins comparativos. A) comparação entre α -lapachona e derivados. B) comparação entre β -lapachona e derivados.

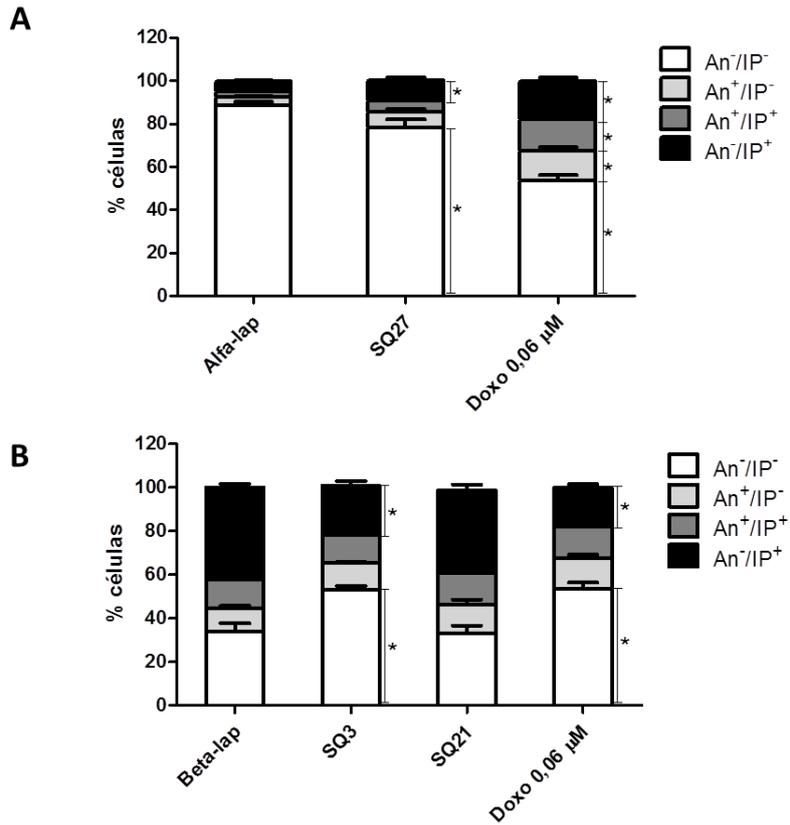


Figura 22: Ensaio de apoptose por HCA na linhagem I2.1. As colunas representam médias e as barras de erro, os valores de desvio padrão, $n = 3$. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao composto precursor (α ou β -lapachona), segundo teste de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey. A doxorrubicina na concentração de IC_{50} foi incluída apenas para fins comparativos. A) comparação entre α -lapachona e derivados. B) comparação entre β -lapachona e derivados.

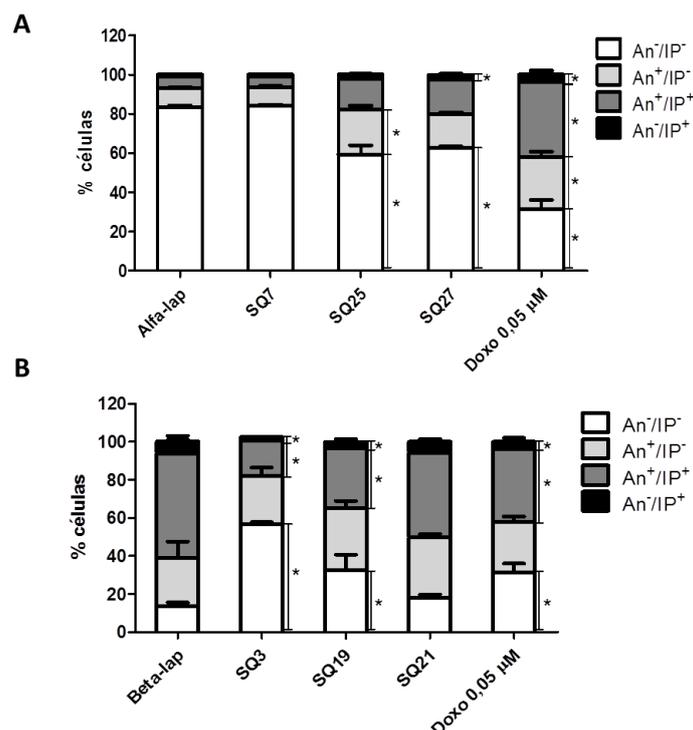


Figura 23: Ensaio de apoptose por HCA na linhagem I9.2. As colunas representam médias e as barras de erro, os valores de desvio padrão, $n = 3$. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao composto precursor (α ou β -lapachona), segundo teste de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey. A doxorubicina na concentração de IC_{50} foi incluída apenas para fins comparativos. A) comparação entre α -lapachona e derivados. B) comparação entre β -lapachona e derivados.

Como podemos observar através das Figuras 21 e 23, a SQ7 não apresentou diferença estatística significativa em relação ao seu precursor, α -lapachona, em ambas as linhagens avaliadas (A3 e I9.2). Os outros derivados da α -lapachona SQ25 e SQ27, no entanto, já apresentaram um maior efeito sobre a morte celular do que o próprio precursor em termos da redução no percentual de células viáveis para todas as linhagens. Ambas SQ25 e SQ27 têm em comum em suas estruturas um anel oxigenado de 6 ou 5 átomos fusionado ao sistema 1,4-piranonaftoquinônico. O tratamento com doxorubicina em sua concentração de IC_{50} resultou em mais morte celular do que o com α -lapachona, mas foi menor do que com β -lapachona em todas as linhagens avaliadas.

Ainda em relação à β -lapachona, identificamos que os derivados SQ3, SQ19 e SQ31 tiveram efeito menor que seu precursor, independentemente da linhagem testada, pois, com a mesma concentração de composto, a β -

lapachona provocou maior efeito sobre a morte celular. A SQ21, por sua vez, comportou-se de forma diferenciada em relação ao seu precursor, de acordo com a linhagem testada. Como demonstrado pela Figura 20, na linhagem A3 a PNQ em questão gerou respostas estatisticamente diferentes da β -lapachona. Nessa condição, embora a SQ21 tenha efeito menor que seu precursor (maior percentual de células viáveis), houve um maior percentual de células marcadas apenas com anexina V, indicando que esse composto favoreceu o encaminhamento para a apoptose. Já nas linhagens I2.1 e I9.2, o efeito da SQ21 sobre a morte celular não apresentou diferença estatística significativa em relação ao da β -lapachona.

Esse perfil de resposta nos leva a um segundo tipo de análise, que é a diferença do comportamento de cada um dos compostos entre as linhagens testadas. A fim de investigarmos se as modificações genéticas que existem entre esses tipos celulares poderiam afetar o perfil de morte celular provocado pelas PNQs testadas, comparamos os efeitos gerados pelos tratamentos de 48h com 5 μ M dos compostos entre as linhagens testadas (Figura 24).

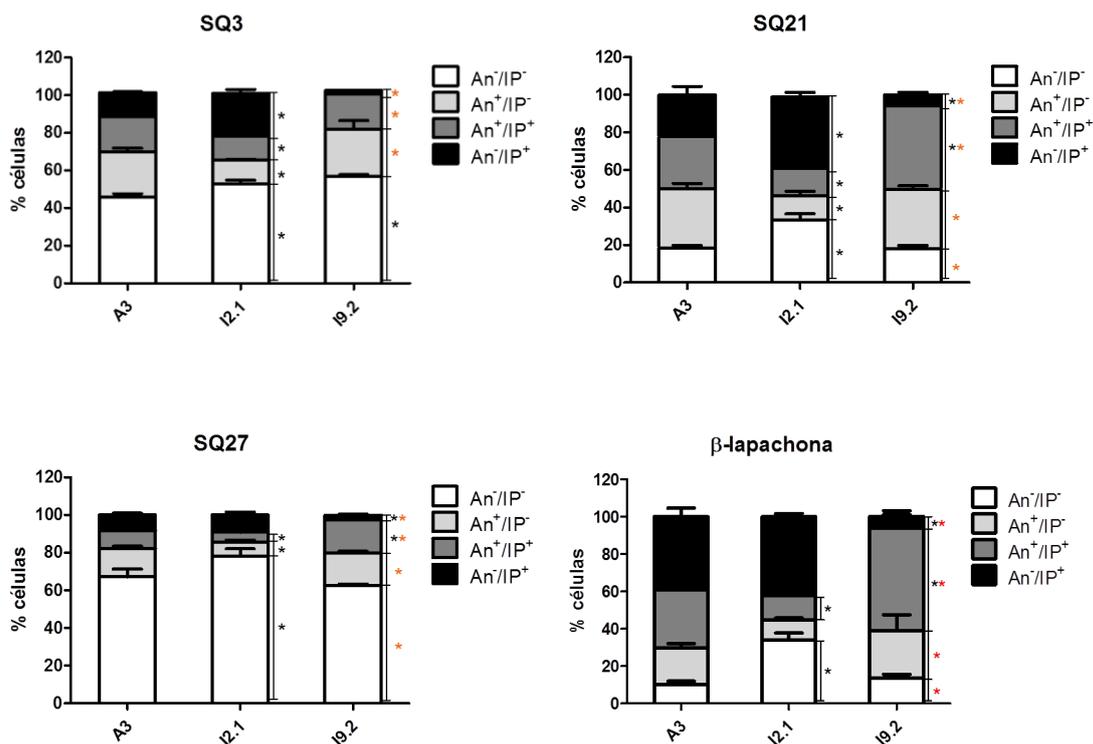


Figura 24: Comparação do efeito dos compostos sobre as diferentes linhagens testadas. As colunas representam médias e as barras de erro, os valores de desvio padrão, $n = 3$. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação à linhagem A3 e (*) em relação à linhagem I2.1, segundo teste de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey.

Em relação à SQ3, podemos observar que o número de células não viáveis na linhagem A3 foi maior do que nas sublinhagens I2.1 e I9.2, não havendo diferença estatística entre as duas últimas. No entanto, a distribuição de células dentro das classificações de morte celular foi diferente entre as linhagens, com maior predomínio de células An⁻/IP⁺ em I2.1 do que em A3 e I9.2.

Embora o tratamento com a SQ21 tenha gerado uma resposta muito similar no que diz respeito à quantidade de células viáveis e em apoptose inicial entre as linhagens A3 e I9.2, os percentuais de morte celular (An⁺/IP⁺ e An⁻/IP⁺) foram diferentes. Na I9.2 houve predomínio de células com dupla marcação (An⁺/IP⁺) com redução de células positivas apenas para IP, ao passo que na A3 os valores referentes a essas duas classificações foram mais parecidos entre si. Para a linhagem I2.1, apesar de haver maior número de células viáveis com o tratamento com esse composto, houve um predomínio de

células marcadas apenas com IP em relação ao restante das classificações de marcação.

A SQ27 teve um comportamento bastante parecido entre as linhagens A3 e I9.2. Houve diferença apenas na proporção de células mortas, uma vez que A3 apresentou percentual de células com dupla marcação (An⁺/IP⁺) menor do que o visto em I9.2. Quando comparada com as demais, I9.2 foi a que teve menos células marcadas apenas com IP. A I2.1, por sua vez, foi a linhagem com maior número de células viáveis após o tratamento com esse composto.

Na linhagem I9.2 a β -lapachona provocou aumento de células duplamente marcadas e redução de células marcadas apenas com IP, quando comparado às outras duas linhagens. O percentual de células viáveis após o tratamento com esse composto foi maior em I2.1 do que em A3 e I9.2, que tiveram valores bastante similares.

A partir dessas observações, identificamos que, de modo geral, a linhagem I2.1 apresentou mais células viáveis do que as linhagens A3 e I9.2 quando comparamos o efeito do tratamento por 48h de 5 μ M de um mesmo composto. Esse tipo celular é deficiente em FADD (140), uma proteína adaptadora que se liga ao domínio de morte de receptores como o Fas e recruta moléculas de pró-caspase-8, que torna-se ativa e inicia a cascata apoptótica (95,201,202). Sendo assim, essa linhagem é completamente resistente à morte Fas-induzida. Tendo em vista que o efeito sobre a morte celular foi menor nessa linhagem do que no restante, observamos uma indicação de que esses compostos têm um mecanismo de ação dependente da via Fas. No entanto, esse efeito parece não ser exclusivo dessa via, pois ainda observamos presença de apoptose nessa linhagem.

A I9.2 é deficiente em caspase-8 e, portanto, também considerada Fas-resistente (139). Sendo assim, era de se esperar que a resposta vista com o tratamento dos compostos em I9.2 fosse similar ao observado em I2.1. Contudo, o percentual de células viáveis para a linhagem I9.2 foi similar ao da linhagem Fas-sensível (A3) para a maioria dos compostos.

De acordo com a literatura, a caspase iniciadora da via Fas não se restringe à caspase-8. A caspase-10, assim como a 8, possui dois domínios efetores de morte (DEDs, do inglês *death-effector domains*), podendo ser

recrutada pelo mesmo complexo que a caspase-8 e ativada por receptores de morte (95).

Já foi relatada a presença de morte celular em células Jurkat deficientes em caspase-8 após estimulação prolongada com FasL, propondo-se que haja uma mediação da caspase-10 para justificar esse achado (203). Entretanto, Sprick e colaboradores (2002) alegam que a concentração necessária do ligante para provocar esse efeito é muito maior do que aquela demandada para se obter a mesma resposta na linhagem selvagem Jurkat (204).

Em contrapartida, alguns autores atribuem a redução de sensibilidade de células deficientes em caspase-8 ao FasL a baixos níveis de expressão de caspase-10, provando a ocorrência de maior sensibilização quando essas células são transfectadas com caspase-10. Outro grupo, no entanto, argumenta que esses níveis de caspase-10 ultrapassariam aqueles fisiologicamente tolerados por uma célula (203–205).

Um estudo mais recente também demonstra que (i) a linhagem I9.2 apresentou fenótipo apoptótico quando submetida a um estímulo com altas concentrações de FasL e que (ii) I2.1 foi completamente resistente à apoptose em todas as concentrações de ligante testadas. Além disso, a incubação de I9.2 com FasL promoveu clivagem das caspases efetoras 3 e 7 e diminuição dos níveis de pró-caspase-10 de forma dose-dependente. Com isso, os autores mostram que, mesmo na ausência de caspase-8, FasL desencadeia a ativação da via apoptótica, e sugerem que a caspase-10 esteja envolvida com esse evento (206).

Embora a morte celular pela via do Fas em células deficientes em caspase-8 ainda seja controversa, os dados encontrados no presente trabalho indicam que talvez haja de fato uma via de morte através da ativação do Fas independente de caspase-8. Apesar de não termos analisado a participação da caspase-10 nesses ensaios, essa seria uma possível justificativa para a diferença de resposta observada entre as linhagens A3, I2.1 e I9.2.

Alternativamente, o efeito observado na linhagem I9.2 poderia estar vinculado a outro tipo de morte celular programada. Já foi descrito que o Fas poderia desencadear vias de sinalização não-apoptótica na ausência de caspase-8, como a morte celular dependente de RIPK1 (necroptose) (207). Uma vez que Fas é ativado, a proteína adaptadora FADD se associa a ele.

FLIP, proteína reguladora da via clássica do Fas, se ligaria ao FADD, recrutando RIP. Ao ser fosforilada, RIP desempenharia um papel chave na regulação da necrose programada (208).

Essa via alternativa é completamente dependente de Fas e FADD (208), e, diferentemente da I2.1, ambos os componentes estão presentes na linhagem I9.2. Portanto, embora não tenhamos feito um ensaio específico para tal via, essa seria outra possível explicação a respeito da maior intensidade de morte celular observada em I9.2 do que em I2.1.

4.3 Ciclo celular

O ciclo celular compreende quatro fases sequenciais: Gap1 (G1), síntese (S), Gap2 (G2) e mitose (M). Quando as células estão quiescentes, isto é, não se dividem, dizemos que elas encontram-se em G0 (209). A proliferação celular é geralmente controlada pela passagem progressiva de uma célula por três fases distintas do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M), sendo o bloqueio do ciclo considerado uma das causas mais comuns da inibição da proliferação celular (210). Tendo em vista que o descontrole do ciclo celular é uma característica importante de células cancerosas em geral, a sua regulação é de suma importância para a oncoterapia (211). Dito isso, decidimos avaliar se as PNQs utilizadas para a análise de apoptose exercem algum efeito sobre o ciclo celular das linhagens leucêmicas testadas.

Na Figura 25 são mostrados os resultados da avaliação por HCA do ciclo celular das linhagens leucêmicas A3, I2.1 e I9.2 após 48h de tratamento com 5 μ M das PNQs selecionadas.

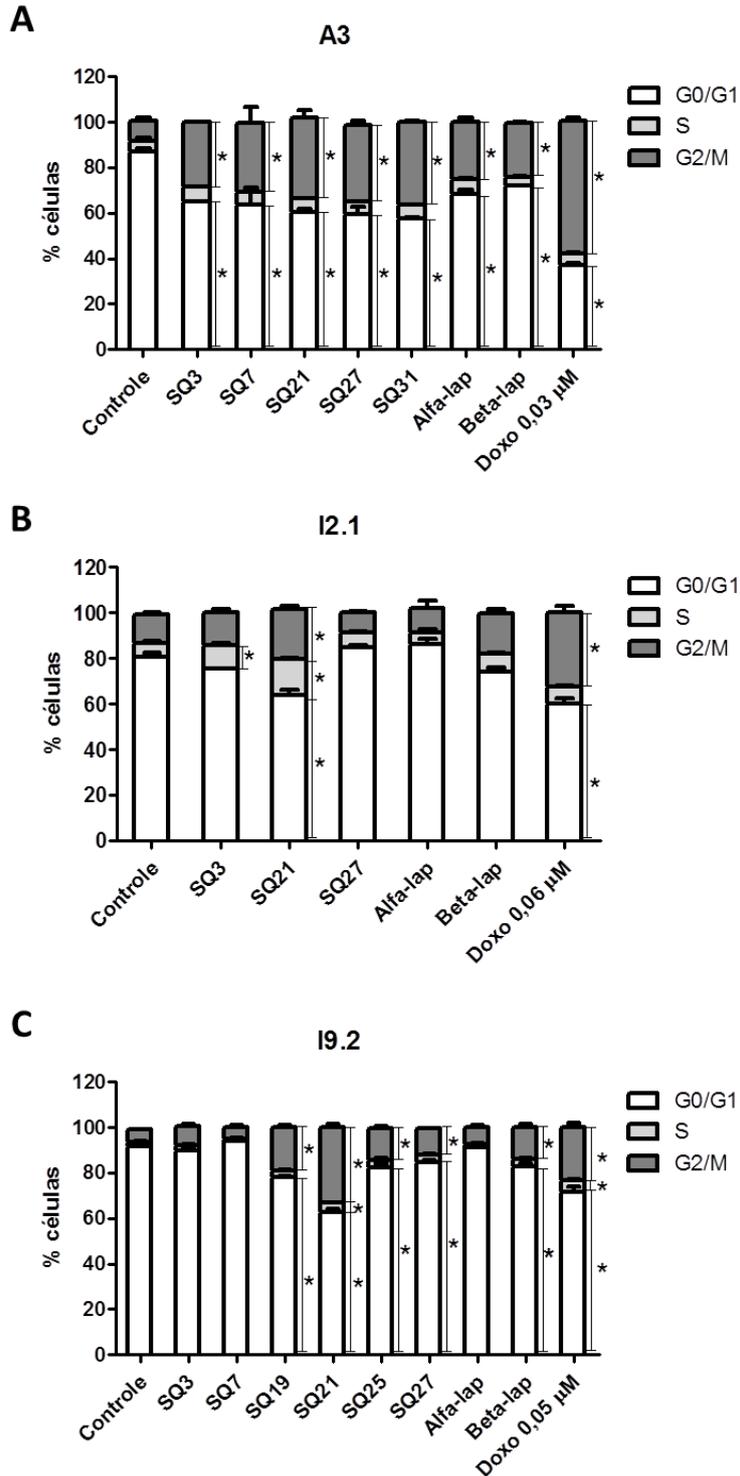


Figura 25: Ensaio de ciclo celular por HCA. As células foram incubadas por 48h com 5 μM de composto. A) resultados referentes à linhagem A3; B) resultados referentes à linhagem I2.1; C) resultados referentes à linhagem I9.2. As colunas representam médias e as barras de erro, os valores de desvio padrão, n = 3. (*) representa diferença estatística significativa (p < 0,05) em relação ao controle, segundo teste de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey.

De acordo com a literatura, o tratamento com doxorubicina em células Jurkat promove depleção de células em G0/G1 com retenção em G2/M (212–214). O complexo p34^{cdc2}/ciclina B1 é o principal regulador da progressão do ciclo celular no ponto de checagem G2/M e estudos do efeito da doxorubicina sobre o ciclo celular indicam que a retenção de células nessa etapa possa ser proveniente da inibição da desfosforilação da cinase p34^{cdc2} e da indução do aumento de ciclina B1 (215). Também foi visto que há aumento dos níveis de ciclina A, proteína também envolvida na regulação do ciclo celular (213,214,216). Essa ciclina parece ser crucial para apoptose e diferenciação de células leucêmicas, pois, em sua ausência, ocorre supressão de apoptose (217). Portanto, tal como descrito na literatura, constatamos que a doxorubicina induziu o aumento do percentual de células em G2/M e redução em G0/G1 para todas as linhagens testadas (Figura 25). Além disso, o efeito apoptótico provocado pelo tratamento com esse composto (Figura 20) pode estar associado a essa interferência no ciclo celular.

O ciclo celular da linhagem A3 foi afetado por todos os compostos testados, havendo diminuição do percentual de células na fase G0/G1 e aumento na fase G2/M em relação ao controle (Figura 25 A). Já na linhagem I2.1 (Figura 25 B) apenas SQ3, SQ21 e doxorubicina provocaram alguma alteração no ciclo celular. O percentual de células na fase S foi maior após o tratamento com SQ3 e com SQ21 e, assim como em A3, SQ21 e doxorubicina geraram retenção de células na fase G2/M, com redução na fase G0/G1. Em relação à linhagem I9.2 (Figura 25 C), o aumento de células na fase S surgiu após o tratamento com SQ21 e doxorubicina. Além disso, foi observado que os compostos SQ19, SQ21, SQ25, SQ27, β -lapachona e doxorubicina geraram menores percentuais de células na fase G0/G1 com maiores percentuais na fase G2/M.

Portanto, constatamos que a maioria das alterações de ciclo celular observada foi similar àquelas obtidas com o tratamento com doxorubicina, sugerindo que talvez os reguladores de ciclo celular afetados pelo fármaco em questão possam ser os mesmos acometidos pelo tratamento com PNQs. Além disso, a linhagem A3 parece ter apresentado maior sensibilidade aos efeitos sobre o ciclo celular a partir do tratamento com os compostos. De alguma

forma, a via clássica e íntegra do Fas pode ser, em parte, responsável pelas alterações no ciclo celular.

Além disso, vimos que a SQ21 foi a PNQ que mais modificou a distribuição de células no ciclo celular de I2.1 e de I9.2, e uma das principais responsáveis pela alteração em A3. E isso parece estar relacionado à morte celular, pois esse composto foi o derivado mais citotóxico para as três linhagens no ensaio de apoptose (Figura 20).

As Figuras 26, 27 e 28 permitem comparar o efeito das PNQs em relação aos seus precursores sobre o ciclo celular de cada uma das linhagens.

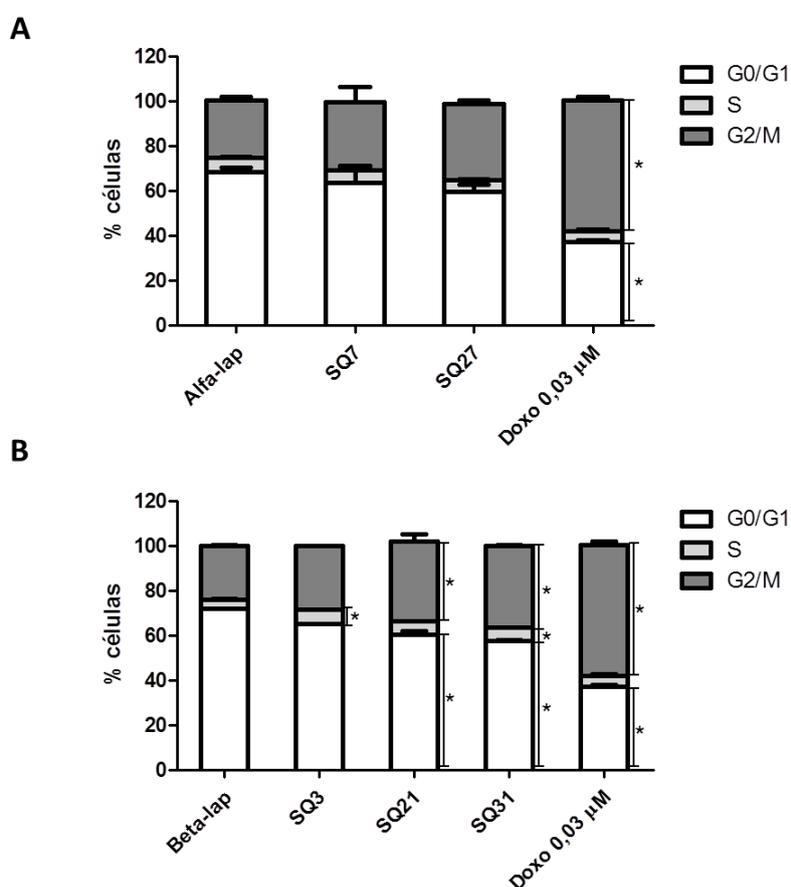


Figura 26: Ensaio de ciclo celular por HCA na linhagem A3. As colunas representam médias e as barras de erro, os valores de desvio padrão, n = 3. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao composto precursor (α ou β -lapachona), segundo teste de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey. A doxorrubicina na concentração de IC_{50} foi incluída apenas para fins comparativos. A) comparação entre α -lapachona e derivados. B) comparação entre β -lapachona e derivados.

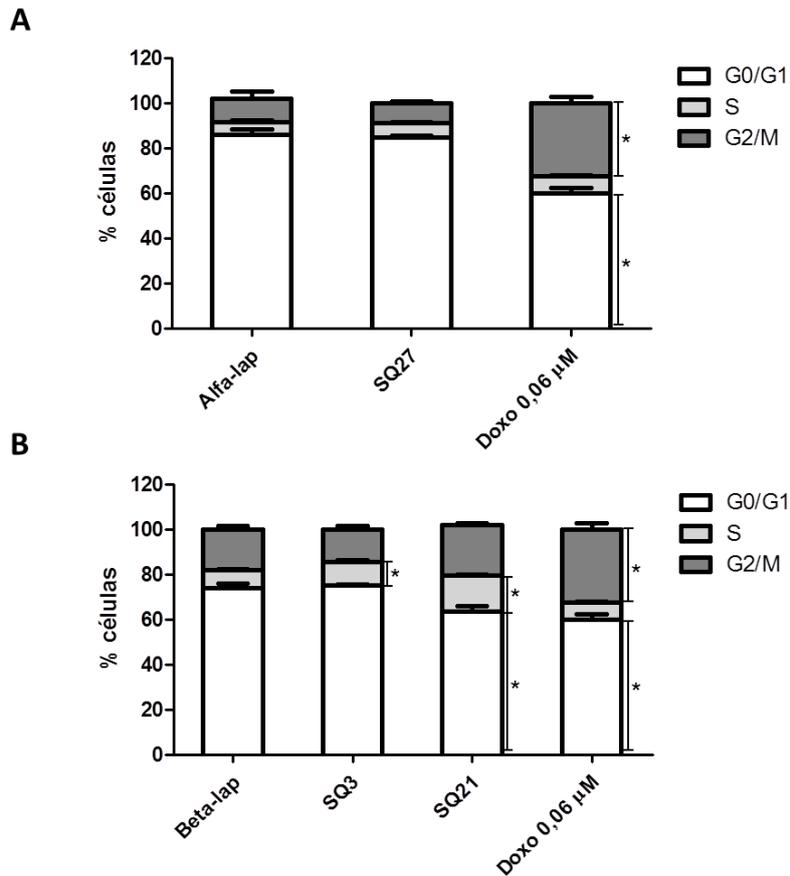


Figura 27: Ensaio de ciclo celular por HCA na linhagem I2.1. As colunas representam médias e as barras de erro, os valores de desvio padrão, $n = 3$. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao composto precursor (α ou β -lapachona), segundo teste de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey. A doxorrubicina na concentração de IC_{50} foi incluída apenas para fins comparativos. A) comparação entre α -lapachona e derivados. B) comparação entre β -lapachona e derivados.

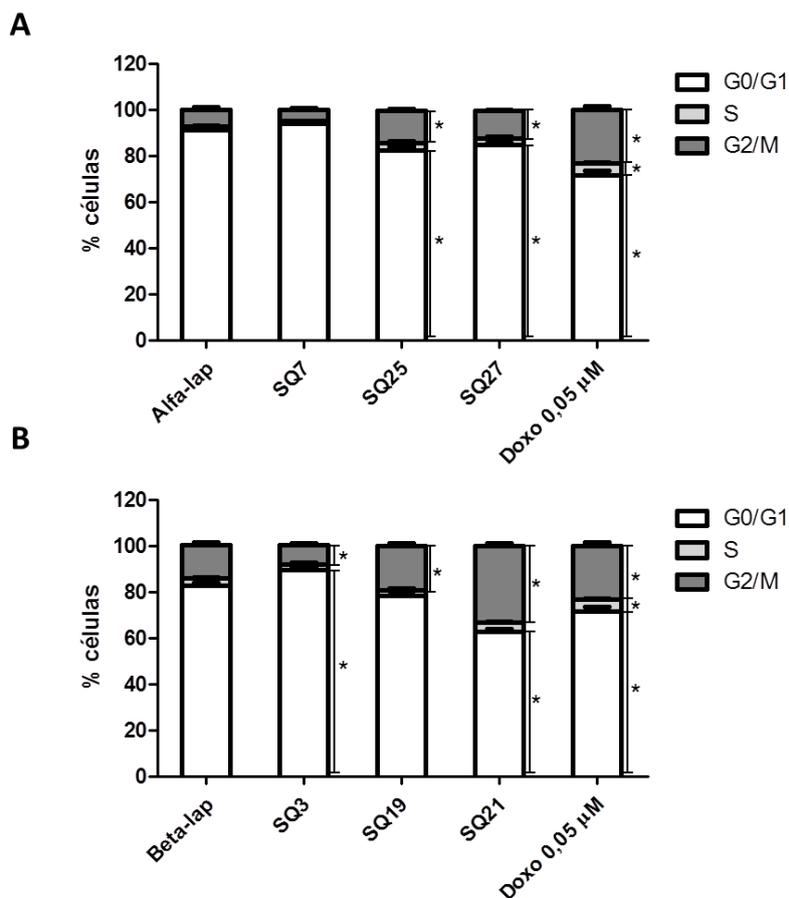


Figura 28: Ensaio de ciclo celular por HCA na linhagem I9.2. As colunas representam médias e as barras de erro, os valores de desvio padrão, $n = 3$. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao composto precursor (α ou β -lapachona), segundo teste de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey. A doxorrubicina na concentração de IC_{50} foi incluída apenas para fins comparativos. A) comparação entre α -lapachona e derivados. B) comparação entre β -lapachona e derivados.

Para as linhagens A3 e I2.1, identificamos que os derivados da α -lapachona apresentam o mesmo efeito sobre o ciclo celular que seu precursor (Figuras 26 e 27). Já em relação à linhagem I9.2, as SQs 25 e 27 passam a revelar um perfil alterado na distribuição de células em relação à α -lapachona, pois ambas provocam maior acúmulo de células em G2/M do que o precursor, com diminuição de G0/G1.

Os derivados de β -lapachona, por sua vez, são diferentes do precursor em pelo menos uma das fases do ciclo para todas as linhagens testadas. À exceção da SQ3, todos desencadearam menor concentração de células em G0/G1 e maior retenção em G2/M do que a própria β -lapachona para todas as três linhagens celulares analisadas. A SQ3, todavia, foi a única que apresentou

resposta diferenciada, pois, para A3 e I2.1 (Figuras 26 e 27), o percentual de células nas fases G0/G1 e G2/M não apresentou diferença estatística significativa em relação ao seu precursor. Na linhagem I9.2 (Figura 28), o efeito obtido foi contrário ao restante dos compostos, uma vez que a concentração de células em G0/G1 foi maior e a de G2/M foi menor do que a da β -lapachona nessa linhagem. Portanto, a β -lapachona parece causar mais alteração no ciclo celular de I9.2 do que seu derivado SQ3.

Destacamos ainda que o perfil de atuação da SQ19 sobre o ciclo celular de I9.2 assemelha-se com o da SQ21. Essas PNQs apresentam estruturas químicas bastante parecidas, como podemos ver pela Figura 17. Sendo assim, essa semelhança pode ser proveniente de uma relação estrutura-atividade.

Juntos, esses resultados apontam que a interferência com o ciclo celular provocada pelo tratamento com os compostos testados varia de acordo com a linhagem analisada. É possível então que o mecanismo e ação desses derivados do lapachol sejam, de alguma forma, dependentes, porém não restritos, da via Fas.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, concluímos que:

- A maioria dos novos compostos com núcleos 1,2- e 1,4-naftoquinônicos inibidores de topoisomerasas I e II humanas derivados de α e β -lapachona (PNQs) foi citotóxica para as linhagens leucêmicas A3, I2.1 e I9.2 após 24 e 48h de incubação;
- Em geral as PNQs se mostraram menos potentes que a doxorubicina. No entanto, foram mais seletivas para as linhagens leucêmicas que a normal (WSS-1);
- Os ensaios de apoptose por HCA revelaram que há uma diferença de resposta à morte celular entre as linhagens leucêmicas, indicando que as PNQs testadas induzem morte celular parcialmente pela via do Fas;
- Os resultados de morte celular obtidos com a linhagem I9.2 apontam que a ativação da via Fas não é necessariamente dependente de caspase-8, uma vez que o percentual de células mortas observado em I9.2 (deficiente em caspase-8) foi similar ao de A3 (selvagem) e maior que o de I2.1 (deficiente em FADD);
- De modo geral, as PNQs foram capazes de promover alterações no ciclo celular nas três linhagens leucêmicas, com retenção de células em G2/M, de modo similar à doxorubicina;
- Aparentemente, a linhagem A3 parece ser mais sensível às mudanças no ciclo celular provocadas pelo tratamento com os compostos testados. Isso indica que a presença de ambos os componentes FADD e caspase-8 pode interferir no comportamento celular relativo ao ciclo;
- A β -lapachona e seus derivados foram mais potentes que a α -lapachona e derivados, indicando que a estrutura dos compostos tem uma interferência direta sobre a sua atividade;
- As PNQs foram menos seletivas do que seus precursores (α e β -lapachona). Todavia, alguns compostos apresentaram maior potência, dados que propiciam futuros estudos de modificações estruturais que mantenham a potência e aumentem a seletividade;

- Em conjunto, os resultados obtidos com o presente trabalho contribuem para o início da elucidação da atuação *in vitro* desses derivados do lapachol.

6 PERSPECTIVAS

Como continuidade deste trabalho, destacamos algumas propostas para futuros estudos, tais como:

- Caracterização molecular do efeito sobre vias de morte e ciclo celular
 - ❖ Realizar cinética do efeito citotóxico provocado pelas PNQs avaliando a atividade das caspases 3, 8 e 10;
 - ❖ Avaliar, por meio de teste Cometa, possíveis danos ao DNA após tratamento com as PNQs;
 - ❖ Identificar alterações de mRNAs envolvidos com as vias intrínseca e extrínseca de morte celular;
 - ❖ Investigar a produção de EROs formadas a partir do tratamento com as PNQs e avaliar sua participação no efeito de morte celular;
 - ❖ Confirmar os resultados de ciclo celular utilizando marcadores específicos para as fases do ciclo.

- Investigação das topoisomerasas como alvos intracelulares das PNQs
 - ❖ Avaliar o efeito citotóxico das PNQs em linhagens sabidamente sensíveis e resistentes aos inibidores comerciais de topoisomerasas;
 - ❖ Investigar diferenças de expressão dos mRNAs das topoisomerasas em células tratadas ou não com as PNQs.

- Aprimoramento das moléculas de PNQs
 - ❖ Racionalizar os resultados de citotoxicidade, propondo modificações estruturais para a síntese de uma nova geração de compostos mais potentes e seletivos, através de modelagem computacional dos dados de estrutura-atividade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. Nature Publishing Group; 2009 Apr 9;458(7239):719–24.
2. Vásquez D, Rodríguez J a, Theoduloz C, Calderon PB, Valderrama J a. Studies on quinones. Part 46. Synthesis and in vitro antitumor evaluation of aminopyrimidoisoquinolinequinones. *Eur J Med Chem*. Elsevier Masson SAS; 2010 Nov;45(11):5234–42.
3. Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*. 2007;12(9):1543–68.
4. Cancer Research UK [Internet]. Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer#heading-Three>
5. WHO [Internet]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
6. Estimativa 2014 INCA [Internet]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>
7. Estimativa 2014 INCA: todas as neoplasias malignas [Internet]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/mapa.asp?ID=14>
8. INCA [Internet]. Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>
9. Foulds L. The Experimental Study of Tumor Progression : A Review. *Cancer Res*. 1954;14:327–39.
10. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 Oct 1;194(4260):23–8.
11. Hanahan D, Weinberg RA, Francisco S. The Hallmarks of Cancer. 2000;100:57–70.
12. Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. Elsevier Inc.; 2011 Mar 4;144(5):646–74.
13. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell*. 2009;136(5):823–37.
14. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073–81.

15. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(3):220–8.
16. Yates LR, Campbell PJ. Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet.* Nature Publishing Group; 2012 Nov;13(11):795–806.
17. Duffy MJ. The war on cancer: are we winning? *Tumour Biol.* 2013 Jun;34(3):1275–84.
18. Zaidi SK, Van Wijnen AJ, Lian JB, Stein JL, Stein GS. Targeting deregulated epigenetic control in cancer. *J Cell Physiol.* 2013 Nov;228(11):2103–8.
19. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 2012 Jan 19;481(7381):306–13.
20. Garay JP, Gray JW. Omics and therapy – A basis for precision medicine. *Mol Oncol.* 2012;6(2):128–39.
21. Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marmé D, Kerbel RS. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 1995 Dec;14(4):263–77.
22. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:178–94.
23. McDonald ER, El-Deiry WS. Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review). *Int J Oncol.* 2000 May;16(5):871–86.
24. De Almeida VL, Leitão A, Barrett Reina LDC, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim Nova.* 2005;28(1):118–29.
25. American Cancer Society [Internet]. Available from: <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/chemotherapyprinciplesanin-depthdiscussionofthetechniquesanditsroleintreatment/chemotherapy-principles-types-of-chemo-drugs>
26. Hait WN, Hambley TW. Targeted cancer therapeutics. *Cancer Res.* 2009 Mar 15;69(4):1263–7; discussion 1267.
27. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene.* 2003;22(47):7359–68.
28. Brunton L. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman.* 12th ed. McGraw Hill; 2012. 2112 p.

29. Koh Y, Nishio K, Saijo N. Mechanisms of Action of Cancer Chemotherapeutic Agents : Topoisomerase Inhibitors. *Cancer*. 2002;1–9.
30. Wang JC. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*. 1996 Jan;65:635–92.
31. Osheroff N. DNA topoisomerases. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1400(1-3):1–2.
32. Deweese JE, Osheroff M a, Osheroff N. DNA Topology and Topoisomerases. *Biochem Mol Biol Educ*. 2009 Jan;37(1):2–10.
33. Wang JC. *Untangling the Double Helix DNA Entanglement and the Action of the DNA Topoisomerases*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. 233 p.
34. Schoeffler AJ, Berger JM. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q Rev Biophys*. 2008 Feb;41(1):41–101.
35. Pommier Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem Rev*. 2009 Jul;109(7):2894–902.
36. Khadka DB, Cho W-J. Topoisomerase inhibitors as anticancer agents: a patent update. *Expert Opin Ther Pat*. 2013;23(8):1033–56.
37. Forterre P, Gribaldo S, Gadelle D, Serre M-C. Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie*. 2007 Apr;89(4):427–46.
38. Chen W, Qiu J, Shen Y. Topoisomerase II α , rather than II β , is a promising target in development of anti-cancer drugs. *Drug Discov Ther*. 2012;6(44):230–7.
39. Chikamori K, Grozav a G, Kozuki T, Grabowski D, Ganapathi R, Ganapathi MK. DNA topoisomerase II enzymes as molecular targets for cancer chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010;10(7):758–71.
40. Bassi L, Palitti F. Anti-topoisomerase drugs as potent inducers of chromosomal aberrations. *Genet Mol Biol*. 2000;23(4):1065–9.
41. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004;56(2):185–229.
42. Capranico G, Binaschi M, Borgnetto ME, Zunino F, Palumbo M. A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons. *Trends Pharmacol Sci*. 1997 Sep;18(9):323–9.

43. Silva MN, Ferreira VF, Souza CBV De. Um Panorama Atual da Química e da Farmacologia de Naftoquinonas, com Ênfase na β -Lapachona e Derivados. 2003;26(3):407–16.
44. Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Orta ML, Pastor N, Perez-Guerrero C, Austin C a., et al. Guanidine-reactive agent phenylglyoxal induces DNA damage and cancer cell death. *Pharmacol Reports*. 2012;64(6):1515–25.
45. Gilliland DG. Hematologic malignancies. *Current opinion in hematology*. 2001. p. 189–91.
46. Mckenna SJ. Leukemia. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2000;89(2):137–9.
47. Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact. Elsevier Ireland Ltd*; 2010;184(1-2):16–20.
48. Pui C-H, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006;354(2):166–78.
49. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Internet]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
50. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. *Cancer Statistics* , 2014. 2014;64(1):9–29.
51. Estimativa 2014 INCA - leucemias [Internet]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/mapa.asp?ID=8>
52. Koh Y, Park J, Ahn KS, Kim I, Bang SM, Lee JH, et al. Different clinical importance of FLT3 internal tandem duplications in AML according to FAB classification: Possible existence of distinct leukemogenesis involving monocyte differentiation pathway. *Ann Hematol*. 2009;88(11):1089–97.
53. Maioral MF, Gaspar PC, Rosa Souza GR, Mascarello A, Chiaradia LD, Licínio MA, et al. Apoptotic events induced by synthetic naphthylchalcones in human acute leukemia cell lines. *Biochimie. Elsevier Masson SAS*; 2013 Apr;95(4):866–74.
54. Ntziachristos P, Mullenders J, Trimarchi T, Aifantis I. Mechanisms of Epigenetic Regulation of Leukemia Onset and Progression. *Adv Immunol*. 2013;117:1–38.
55. Udensi UK, Tchounwou PB. Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014;33(1):106.

56. Subtipos de Leucemia [Internet]. Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/subtipos>
57. Stavroponlou V, Brauk L, Schwaller J. Insights into molecular pathways for targeted therapeutics in acute leukaemia. *Swiss Med Wkly*. 2010;140(OCTOBER):11–7.
58. Pieters R, Carroll WL. *Biology and Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia*. Hematol Oncol Clin North Am. Elsevier Ltd; 2010;24(1):1–18.
59. Lo Nigro L. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013;35(4):245–52.
60. García-pérez J, López-abente G, Gómez-barroso D, Morales-piga A, Pardo E, Tamayo I, et al. Childhood leukemia and residential proximity to industrial and urban sites. *Environ Res*. 2015;140:542–53.
61. Cancer Research UK: Acute lymphoblastic leukaemia and the blood [Internet]. Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/all/about/acute-lymphoblastic-leukaemia-and-the-blood>
62. Cancer Treatment Centers of America [Internet]. [cited 2015 Jan 1]. Available from: <http://www.cancercenter.com/leukemia/chemotherapy/>
63. American Cancer Society: Chemotherapy for acute lymphocytic leukemia [Internet]. Available from: <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acutelymphocyticallyinadults/detailedguide/leukemia-acute-lymphocytic-treating-chemotherapy>
64. American Cancer Society: Typical treatment of acute lymphocytic leukemia [Internet]. Available from: <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acutelymphocyticallyinadults/detailedguide/leukemia-acute-lymphocytic-treating-typical-treatment>
65. Hande KR. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr*. 1998;1400(1-3):173–84.
66. Jurečková J, Hatok J, Stefániková A, Dobrota D, Račay P. Targeting of Bcl-2 family proteins for treatment of acute leukaemia. *Gen Physiol Biophys*. 2011;30 Spec No(4):S3–12.
67. Wyllie AH. “where, o death, is thy sting?” A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol*. 2010;42(1):4–9.
68. Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):380–90.

69. Cerella C, Teiten M-H, Radogna F, Dicato M, Diederich M. From nature to bedside: Pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment. *Biotechnol Adv. Elsevier Inc.*; 2014;32(6):1111–22.
70. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson S a, Abrams JM, Adam D, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 2014;22(1):58–73.
71. Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2015;16(6):329–44.
72. Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell.* Elsevier Inc.; 2011;147(4):742–58.
73. Aburto MR, Hurlé JM, Varela-Nieto I, Magariños M. Autophagy During Vertebrate Development. *Cells.* 2012;1(3):428–48.
74. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2014;15(2):135–47.
75. Amaravadi RK, Thompson CB. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res.* 2007;13(24):7271–9.
76. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. FADD: an endogenous inhibitor of RIP3-driven regulated necrosis. *Cell Res.* Nature Publishing Group; 2011;21(10):1383–5.
77. Han J, Zhong C-Q, Zhang D-W. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immunol.* 2011;12(12):1143–9.
78. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 2012;45(6):487–98.
79. McCall K. Genetic control of necrosis-another type of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology.* 2010. p. 882–8.
80. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell.* Elsevier Inc.; 2011;147(4):728–41.
81. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy : cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010;221(1):3–12.

82. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. 2005;120(2):237–48.
83. Corcelle E, Nebout M, Bekri S, Gauthier N, Hofman P, Poujeol P, et al. Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *Cancer Res*. 2006;66(13):6861–70.
84. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray B a, Ritson GP, Nedelsky NB, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*. 2007;447(7146):859–63.
85. Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, et al. Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase- β , and Bcl-2. *Mol Cell*. 2007;25(2):193–205.
86. Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*. 2006;26(24):9220–31.
87. Huang J, Klionsky DJ. Autophagy and human disease. *Cell Cycle*. Nature Publishing Group; 2007;6(15):1837–49.
88. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972. p. 239.
89. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(6):663–9.
90. Su M, Mei Y, Sinha S. Role of the crosstalk between autophagy and apoptosis in cancer. *J Oncol*. 2013;2013.
91. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. *Experimental Oncology*. 2012. p. 255–62.
92. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Oncologist*. 1999;4(4):332–9.
93. Thatte U, Dahanukar S. Apoptosis. *Drugs*. 1997. p. 511–32.
94. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770–6.
95. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet*. 2009 Aug;46(8):497–510.

96. Mukhtar E, Adhami VM, Khan N, Mukhtar H. Apoptosis and autophagy induction as mechanism of cancer prevention by naturally occurring dietary agents. *Curr Drug Targets*. 2012;13(14):1831–41.
97. Byrne GI, Ojcius DM. Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(10):802–8.
98. Giansanti V, Torriglia A, Scovassi AI. Conversation between apoptosis and autophagy: Is it your turn or mine? *Apoptosis*. 2011;16(4):321–33.
99. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* (80-). 1998;281(August):1309–12.
100. Borner C. The Bcl-2 protein family: Sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. 2003;39(11):615–47.
101. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2001;29(Pt 6):684–8.
102. Jendrossek V. The Intrinsic Apoptosis Pathways as a Target in Anticancer Therapy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(8):1426–38.
103. Van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*. 2002;9(1):20–6.
104. Schimmer AD. Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. *Cancer Res*. 2004;64(20):7183–90.
105. Shiozaki EN, Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: Mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci*. 2004;29(9):486–94.
106. Fulda S, Debatin K-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25(34):4798–811.
107. Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol*. 2009;10(4):348–55.
108. Eimon PM, Kratz E, Varfolomeev E, Hymowitz SG, Stern H, Zha J, et al. Delineation of the cell-extrinsic apoptosis pathway in the zebrafish. *Cell Death Differ*. 2006;13(10):1619–30.
109. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002 Apr;2(4):277–88.
110. Favalaro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(5):330–49.

111. Rampersad SN. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)*. 2012;12(9):12347–60.
112. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55–63.
113. SLATER TF, SAWYER B, STRAEULI U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta*. 1963;77:383–93.
114. Berridge M V, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):474–82.
115. Gonzalez RJ, Tarloff JB. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol Vitro*. 2001;15(3):257–9.
116. Riss T, Moravec R, Niles A, Benink H. *Cell Viability Assays*. Assay Guid Man. 2013;21.
117. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000 Sep;267(17):5421–6.
118. Erikstein BS, Hagland HR, Nikolaisen J, Kulawiec M, Singh KK, Gjertsen BT, et al. Cellular stress induced by resazurin leads to autophagy and cell death via production of reactive oxygen species and mitochondrial impairment. *J Cell Biochem*. 2010;111(3):574–84.
119. Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc*. 2011;54:10–4.
120. Shama G, Malik DJ. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *Int J Hyg Environ Health*. Elsevier GmbH.; 2013;216(2):115–25.
121. Luminescent Cell Viability Assay - Promega [Internet]. [cited 2015 Jan 1]. Available from: <https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol/>
122. Ramm P. Image-based screening: A technology in transition. *Curr Opin Biotechnol*. 2005;16(1 SPEC. ISS.):41–8.

123. Lang P, Yeow K, Nichols A, Scheer A. Cellular imaging in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(4):343–56.
124. Giuliano K a, Haskins JR, Taylor DL. Advances in high content screening for drug discovery. *Assay Drug Dev Technol.* 2003;1(4):565–77.
125. Giuliano KA. High-Content Screening: A New Approach to Easing Key Bottlenecks in the Drug Discovery Process. *Journal of Biomolecular Screening.* 1997. p. 249–59.
126. Taylor DL. A personal perspective on high-content screening (HCS): from the beginning. *J Biomol Screen Off J Soc Biomol Screen.* 2010;15(7):720–5.
127. Kozak K, Agrawal A, Machuy N, Csucs G. Data Mining Techniques in High Content Screening: A Survey. *J Comput Sci Syst Biol.* 2009;02(04):219–39.
128. Haney S a., LaPan P, Pan J, Zhang J. High-content screening moves to the front of the line. *Drug Discov Today.* 2006;11(19-20):889–94.
129. Zanella F, Lorens JB, Link W. High content screening: Seeing is believing. *Trends Biotechnol. Elsevier Ltd;* 2010;28(5):237–45.
130. Louzada S, Adegas F, Chaves R. Defining the sister rat mammary tumor cell lines HH-16 cl.2/1 and HH-16.cl.4 as an In Vitro cell model for ErbB2. *PLoS One.* 2012;7(1).
131. Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(9):659–72.
132. Nakatsu N, Yoshida Y, Yamazaki K, Nakamura T, Dan S, Fukui Y, et al. Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(3):399–412.
133. Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi Y La, Girard L, Gandhi J, et al. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One.* 2009;4(7).
134. Ferreira D, Adegas F, Chaves R. The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methylation Analysis and Anticancer Drugs Testing. 2013;
135. Wilding JL, Bodmer WF. Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer Res.* 2014 May 1;74(9):2377–84.
136. ATCC: CRL 2570 [Internet]. Available from: <http://www.atcc.org/products/all/CRL-2570.aspx#characteristics>

137. Sahasrabudhe SR, Luo X, Humayun MZ. Specificity of base substitutions induced by the acridine mutagen ICR-191: Mispairing by guanine N7 adducts as a mutagenic mechanism. *Genetics*. 1991;129(4):981–9.
138. Chen WD, Eshleman JR, Aminoshariae MR, Ma a H, Veloso N, Markowitz SD, et al. Cytotoxicity and mutagenicity of frameshift-inducing agent ICR191 in mismatch repair-deficient colon cancer cells. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(6):480–5.
139. ATCC: CRL-2571 [Internet]. Available from: <http://www.atcc.org/products/all/CRL-2571.aspx#characteristics>
140. ATCC: CRL-2572 [Internet]. Available from: <http://www.atcc.org/products/all/CRL-2572.aspx>
141. Brandão HN, David JP, Couto RD, Nascimento JAP, David JM. Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos e Derivados de Plantas. *Quim Nova*. 2010;33(6):1359–69.
142. Tyagi AK, Prasad S. Drug Discovery Inspired by Mother Nature for Cancer Therapy. *Biochem Physiol Open Access*. 2015;04(01):1–3.
143. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*. 2003 Jul;66(7):1022–37.
144. Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod*. 2004 Dec;67(12):2141–53.
145. Asche C. Antitumour quinones. *Mini Rev Med Chem*. 2005 May;5(5):449–67.
146. Begleiter A, Blair GW, Lymphoblasts LY. Quinone-induced DNA Damage and Its Relationship to Antitumor Activity in L5178Y Lymphoblasts. 1984;44:78–82.
147. Chen Z-F, Tan M-X, Liu Y-C, Wang H-S, Yang B, Peng Y, et al. Cytotoxicity of the traditional chinese medicine (TCM) plumbagin in its copper chemistry. *Dalt Trans*. 2009 Dec 28;(48):10824–33.
148. Da Silva EN, de Deus CF, Cavalcanti BC, Pessoa C, Costa-Lotufo L V, Montenegro RC, et al. 3-Arylamino and 3-Alkoxy-Nor-Beta-Lapachone Derivatives: Synthesis and Cytotoxicity Against Cancer Cell Lines. *J Med Chem*. 2010 Jan 14;53(1):504–8.
149. Schmid P, Krockner J, Kreienberg R, Klare P, Kittel K, Sommer H, et al. Non-pegylated liposomal doxorubicin and docetaxel in metastatic breast cancer: final results of a phase II trial. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009 Jul;64(2):401–6.

150. Selva TMG. Estudos eletroquímicos da lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) e derivados da 1,4-naftoquinona com atividade moluscicida. Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2010.
151. Poplin EA, LoRusso P, Lokich JJ, Gullo JJ, Leming PD, Schulz JJ, et al. Randomized clinical trial of mitomycin-C with or without pretreatment with WR-2721 in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;33(5):415–9.
152. Tetef M, Margolin K, Ahn C, Akman S, Chow W, Leong L, et al. Mitomycin C and menadione for the treatment of lung cancer: a phase II trial. *Invest New Drugs.* 1995;13(2):157–62.
153. Prasad KN, Edwards-Prasad J, Sakamoto A. Vitamin-K3 (Menadione) Inhibits the Growth of Mammalian Tumor-Cells in Culture. *Life Sci.* 1981;29(4):1387–92.
154. Verma RP. Anti-cancer activities of 1,4-naphthoquinones: a QSAR study. *Anticancer Agents Med Chem.* 2006;6(5):489–99.
155. Jiménez-Alonso S, Orellana HC, Estévez-Braun A, Ravelo AG, Pérez-Sacau E, Machín F. Design and synthesis of a novel series of pyranonaphthoquinones as topoisomerase II catalytic inhibitors. *J Med Chem.* 2008 Nov 13;51(21):6761–72.
156. Gutierrez PL. The metabolism of quinone-containing alkylating agents: free radical production and measurement. *Front Biosci.* 2000;5:D629–38.
157. Casarett LJ, Klaassen CD. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 7th ed. Klaassen CD, editor. New York: McGraw-Hill Medical; 2008.
158. Cui X, Li L, Yan G, Meng K, Lin Z, Nan Y, et al. High expression of NQO1 is associated with poor prognosis in serous ovarian carcinoma. *BMC Cancer.* 2015;15(1):1–8.
159. Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): Chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact.* 2000;129(1-2):77–97.
160. Siegel D, Yan C, Ross D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem Pharmacol.* Elsevier Inc.; 2012;83(8):1033–40.
161. Nioi P, Hayes JD. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2004;555(1-2 SPEC. ISS.):149–71.

162. Prawan A, Buranrat B, Kukongviriyapan U, Sripa B, Kukongviriyapan V. Inflammatory cytokines suppress NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 and induce oxidative stress in cholangiocarcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135(4):515–22.
163. Cresteil T, Jaiswal a K. High levels of expression of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene in tumor cells compared to normal cells of the same origin. *Biochem Pharmacol.* 1991;42(5):1021–7.
164. Garate M, Wani A a., Li G. The NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 induces cell cycle progression and proliferation of melanoma cells. *Free Radic Biol Med. Elsevier Inc.;* 2010;48(12):1601–9.
165. Siegel D, Franklin WA, Ross D. Immunohistochemical detection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase in human lung and lung tumors. *Clin Cancer Res.* 1998;4(9):2065–70.
166. Awadallah NS, Dehn D, Shah RJ, Russell Nash S, Chen YK, Ross D, et al. NQO1 expression in pancreatic cancer and its potential use as a biomarker. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2008;16(1):24–31.
167. Buranrat B, Chau-in S, Prawan A, Puapairoj A, Zeekpudsa P, Kukongviriyapan V. NQO1 Expression Correlates with Cholangiocarcinoma Prognosis. *Asian Pac.J.Cancer Prev.* 2012. p. 131–6.
168. Yang Y, Zhang Y, Wu Q, Cui X, Lin Z, Liu S, et al. Clinical implications of high NQO1 expression in breast cancers. *J Exp Clin Cancer Res. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research;* 2014 Jan;33(1):14.
169. Díaz F, Medina JD. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea* ssp. *neochrysa*. 1996;59:423–4.
170. Epifano F, Genovese S, Fiorito S, Mathieu V, Kiss R. Lapachol and its congeners as anticancer agents: A review. *Phytochem Rev.* 2014;13(1):37–49.
171. Rao K V, McBride TJ, Oleson JJ. Recognition and Evaluation of Lapachol as an Antitumor Agent and Evaluation of Lapachol as an Antitumor. *Cancer Resour.* 1968;28(October):1952–4.
172. Fieser LF. The Alkylation of Hydroxynaphthoquinone. III. a Synthesis of Lapachol. *J Am Chem Soc.* 1927;49(3):857–64.
173. Fonseca S, Braga R, Santana D. Lapachol – química, farmacologia e métodos de dosagem *. 2003;84(1):9–16.
174. Almeida ER De. Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone. *Open Nat Prod J.* 2009;2(1):42–7.

175. Kung H, Lu K, Chau Y. The Chemotherapeutic Effects of Lapacho Tree Extract : β -Lapachone. 2014;3(2):26–9.
176. Li Y, Sun X, LaMont JT, Pardee AB, Li CJ. Selective killing of cancer cells by beta -lapachone: direct checkpoint activation as a strategy against cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(5):2674–8.
177. Reinicke KE, Bey E a, Bentle MS, Pink JJ, Ingalls ST, Hoppel CL, et al. Cancer Therapy : Preclinical Development of B-Lapachone Prodrugs for Therapy Against Human Cancer Cells with Elevated NAD (P) H : Quinone Oxidoreductase 1Levels. Clin Cancer Res. 2005;11(8):3055–64.
178. Di Chenna PH, Benedetti-Doctorovich V, Baggio RF, Garland MT, Burton G. Preparation and cytotoxicity toward cancer cells of mono(arylimino) derivatives of beta-lapachone. J Med Chem. 2001 Jul 19;44(15):2486–9.
179. Krishnan P, Bastow KF. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives-eleutherin, alpha lapachone, and beta lapachone. Biochem Pharmacol. 2000;60(9):1367–79.
180. Krishnan P, Bastow KF. Novel mechanism of cellular DNA topoisomerase II inhibition by the pyranonaphthoquinone derivatives α -lapachone and β -lapachone. Cancer Chemother Pharmacol. 2001 Mar 19;47(3):187–98.
181. Salustiano EJS, Netto CD, Fernandes RF, Da Silva a. JM, Bacelar TS, Castro CP, et al. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, α -lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. Invest New Drugs. 2010;28(2):139–44.
182. Ferreira SB. Síntese e atividades farmacológicas de novos 1,2,3-triazóis glicoconjugados e naftoquinonas. Universida Federal do Rio de Janeiro; 2008.
183. Pereira MXG. Identificação e Caracterização do Mecanismo de Ação de Derivados de Naftoquinonas na Inibição das DNA Topoisomerases I e II α Humana. Fundação Oswaldo Cruz; 2011.
184. Stahl HD, Seidl B, Hubner B, Altrichter S, Pfeiffer R, Pustowoit B, et al. High incidence of parvovirus B19 DNA in synovial tissue of patients with undifferentiated mono- and oligoarthritis. Clin Rheumatol. 2000;19(4):281–6.
185. Thorn C, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein T, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. Pharmacogenet Genomics. 2012;21(7):440–6.
186. Liaol JJ, Duanz F, Meng Y, Zhaol Q. Selecting an Appropriate Dose-Response Curve in Bioassay Development. In: Atta-ur Rahman M,

- Choudhary I, editors. *Frontiers in Drug Design and Discovery*. Bentham Science Publishers; 2010.
187. Ma X, Wang Z. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. *Drug Discov Today*. 2009 Dec;14(23-24):1136–42.
 188. Safra T, Menczer J, Bernstein R, Shpigel S, Inbar MJ, Grisaru D, et al. Efficacy and toxicity of weekly topotecan in recurrent epithelial ovarian and primary peritoneal cancer. *Gynecol Oncol*. 2007 Apr;105(1):205–10.
 189. Hasima N, Aggarwal BB. Cancer-linked targets modulated by curcumin. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012 Jan;3(4):328–51.
 190. Chau Y-P, Shiah S-G, Don M-J, Kuo M-L. Involvement of Hydrogen Peroxide in Topoisomerase Inhibitor β -lapachone-Induced Apoptosis and Differentiation in Human Leukemia Cells. *Free Radic Biol Med*. 1998;24(4):660–70.
 191. Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. Nature Publishing Group; 2011;10(3):221–37.
 192. Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(3):231–7.
 193. Borra RC, Lotufo MA, Gaglioti SM, Barros FDM, Andrade PM. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz Oral Res*. 2009;23(3):255–62.
 194. Waring P, Lambert D, Sjaarda a, Hurne a, Beaver J. Increased cell surface exposure of phosphatidylserine on propidium iodide negative thymocytes undergoing death by necrosis. *Cell Death Differ*. 1999;6(7):624–37.
 195. Wesselborg S, Engels IH, Rossmann E, Los M, Schulze-Osthoff K. Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood*. 1999;93(9):3053–63.
 196. Gamen S, Anel A, Lasierra P, Alava M a., Martinez-Lorenzo MJ, Piñeiro A, et al. Doxorubicin-induced apoptosis in human T-cell leukemia is mediated by caspase-3 activation in a Fas-independent way. *FEBS Lett*. 1997;417(3):360–4.
 197. Wang S, Konorev E a., Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms: Intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2004;279(24):25535–43.

198. Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kojima M, Kawanishi S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci.* 2005;76(13):1439–53.
199. Looi CY, Arya A, Cheah FK, Muharram B, Leong KH, Mohamad K, et al. Induction of Apoptosis in Human Breast Cancer Cells via Caspase Pathway by Vernodalin Isolated from *Centratherum anthelminticum* (L.) Seeds. *PLoS One.* 2013;8(2).
200. Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Doxorubicin induces apoptosis in Jurkat cells by mitochondria-dependent and mitochondria-independent mechanisms under normoxic and hypoxic conditions. *Anticancer Drugs.* 2015;1.
201. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene.* 1998 Dec 24;17(25):3225–36.
202. Rebutti M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol.* Elsevier Inc.; 2013 May 1;85(9):1219–26.
203. Kischkel FC, Lawrence D a., Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, et al. Death Receptor Recruitment of Endogenous Caspase-10 and Apoptosis Initiation in the Absence of Caspase-8. *J Biol Chem.* 2001;276(49):46639–46.
204. Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand M a., Walczak H. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.* 2002;21(17):4520–30.
205. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(24):13884–8.
206. Milhas D, Cuvillier O, Therville N, Clavé P, Thomsen M, Levade T, et al. Caspase-10 triggers bid cleavage and caspase cascade activation in fasL-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2005;280(20):19836–42.
207. Kaufmann T, Strasser a, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ.* Nature Publishing Group; 2012;19(1):42–50.
208. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger a, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol.* 2000;1(6):489–95.
209. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol.* 2012;226(2):352–64.

210. Hong J-Y, Chung H-J, Lee H-J, Park HJ, Lee SK. Growth inhibition of human lung cancer cells via down-regulation of epidermal growth factor receptor signaling by yuanhuadine, a daphnane diterpene from *Daphne genkwa*. *J Nat Prod*. 2011 Oct 28;74(10):2102–8.
211. Diaz-Moralli S, Tarrado-Castellarnau M, Miranda A, Cascante M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther*. Elsevier Inc.; 2013;138(2):255–71.
212. Aytac U, Sato K, Yamochi T, Yamochi T, Ohnuma K, Mills GB, et al. Effect of CD26/dipeptidyl peptidase IV on Jurkat sensitivity to G2/M arrest induced by topoisomerase II inhibitors. *Br J Cancer*. 2003;88(3):455–62.
213. Sugimoto K, Sasaki M, Isobe Y, Tsutsui M, Suto H, Ando J, et al. Hsp90-inhibitor geldanamycin abrogates G2 arrest in p53-negative leukemia cell lines through the depletion of Chk1. *Oncogene*. 2008;27(22):3091–101.
214. Żuryń A, Litwiniec A, Gackowska L, Pawlik A, Grzanka AA, Grzanka A. Expression of cyclin A, B1 and D1 after induction of cell cycle arrest in the Jurkat cell line exposed to doxorubicin. *Cell Biol Int*. 2012;36(12):1129–35.
215. Aytac U, Claret F, Ho L, Sato K, Ohnuma K, Mills GB, et al. Expression of CD26 and Its Associated Dipeptidyl Peptidase IV Enzyme Activity Enhances Sensitivity to Doxorubicin-induced Cell Cycle Arrest at the G 2 / M Checkpoint Expression of CD26 and Its Associated Dipeptidyl Peptidase IV Enzyme Activity Enhances Se. 2001;7204–10.
216. Galderisi U, Jori FP, Giordano A. Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene*. 2003;22(33):5208–19.
217. Wang X, Song Y, Ren J, Qu X. Knocking-down cyclin A2 by siRNA suppresses apoptosis and switches differentiation pathways in K562 cells upon administration with doxorubicin. *PLoS One*. 2009;4(8).