

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS CÂMPUS
DE ARARAQUARA**

**ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE PERÓXIDO
DE HIDROGÊNIO POR NAFTOQUINONAS EM
ASSOCIAÇÃO COM ÁCIDO ASCÓRBICO: APLICAÇÕES
COMO AGENTES CITOTÓXICOS EM LINHAGEM DE
CÉLULAS NORMAL E TUMORAL**

Fernanda Silva Graciani

ARARAQUARA – SP

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS CÂMPUS
DE ARARAQUARA**

**ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE PERÓXIDO
DE HIDROGÊNIO POR NAFTOQUINONAS EM
ASSOCIAÇÃO COM ÁCIDO ASCÓRBICO: APLICAÇÕES
COMO AGENTES CITOTÓXICOS EM LINHAGEM DE
CÉLULA NORMAL E TUMORAL**

Fernanda Silva Graciani

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração: Exploração funcional e diagnóstica de biomoléculas e xenobióticos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

ORIENTADOR: PROF. DR. VALDECIR FARIAS XIENNES

ARARAQUARA – SP

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Graciani, Fernanda Silva

G731e Estudo da eficiência de produção de peróxido de hidrogênio por naftoquinonas em associação com ácido ascórbico: aplicações como agentes citotóxicos em linhagem de células normal e tumoral / Fernanda Silva Graciani. – Araraquara, 2013

143 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Valdecir Farias Ximenes

1. Menadiona. 2. 2-bromo-1,4 naftoquinona. 3. Câncer. 4. Espécies reativas de oxigênio. I. Ximenes, Valdecir Farias, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

APRESENTAÇÃO

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
Se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas os auxiliam muito.”*

(Chico Xavier)

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica da Universidade de Ciências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus de Bauru - SP, sendo a parte biológica realizada no laboratório de Mutagênese do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus de Araraquara-SP.

DEDICATÓRIA

*“E se por acaso a dor chegar
Ao teu lado vão estar
Pra te acolher e te amparar
Pois não há nada como um lar”*

(trecho da música Tua Família – Anjos de Resgate)

*Aos meus pais, **Domingos e Cecília**, por me dar a graça da vida, e me permitir que eu realize meus sonhos na presença do Senhor.*

Obrigada pelos esforços, paciência, dedicação e compreensão nos momentos mais difíceis.

Obrigada por fazer o impossível para que eu conseguisse concluir todos os caminhos da minha vida com suas mãos de proteção. MINHA VIDA!

*Aos meus irmãos, **Alexandre e Eduardo**, que sempre foram espelhos como pessoas e profissionais competentes, AMO VOCÊS!*

*Às minhas amigas e cunhadas, **Ana Paula e Josi**, que com grande amor participaram das conquistas e torceram por mim com palavras de otimismo, sempre me lembrando do objetivo principal. AMIGAS!*

*Ao meu Anjo e sempre **Gabriel**, pela paciência, compreensão, incentivo, companhia, confiança, sempre me protegendo de maus pensamentos e me fazendo enxergar que as coisas são simples que só basta enxergarmos assim. Quando olho para trás me dá cada vez mais vontade de continuar para frente, pois estou ao lado de uma pessoa forte. Vejo que todo meu trabalho também foi seu. AMOR DA MINHA VIDA!*

Cláudio, Marilene, Gugu, Gus, Natália, Paulo, Nat e Indaiá, todos falam que não escolhemos família, mas eu os escolheria, dentro de todas nossas imperfeições vocês são perfeitos. Obrigada por acreditar e vibrar com cada conquista minha. COMPANHEIROS!

À minha querida sobrinha Laura, que me fez enxergar ainda mais que a vida é muito além do que imaginamos. ESPERANÇA!

AGRADECIMENTOS

ESPECIAIS

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um “não”. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.”

(Augusto Cury)

Ao Senhor DEUS, que me iluminou em todos os momentos...

*“Vem limparas minhas mãos purificar meu coração que eu ande
em tudo que tu tens para mim”*

*“Meus momentos e os dias meus, meu respirar e meu viver que
seja todos para ti oh DEUS”*

*Pois nada é meu “tudo é do Pai, toda honra e toda glória é Dele a
vitória alcançada em minha vida”*

***“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”
(Cora Coralina)***

Ao Professor VALDECIR FARIAS XIMENES, meu orientador, por ter acreditado. Obrigada pelo conhecimento compartilhado sobre ciência e sobre vida. Obrigada por ensinar que críticas sempre são construtivas, dependendo apenas de como às vemos. Obrigada por sempre me incentivar a buscar meios para eu atingir meus objetivos na vida profissional e pessoal. Obrigada pela paciência nos momentos mais difíceis para mim, pela confiança. Foi muito gratificante ser sua aluna por esses momentos!

AGRADECIMENTOS

“Há pessoas que nos falam e nem as escutamos; há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam. Mas há pessoas que, simplesmente, aparecem em nossa vida e que marcam para sempre.”

(Cecília Meireles)

*À todos aqueles que participaram não somente desta fase, mas de todas que trilharam o caminho para estar aqui, em primeiro lugar professor **Godinho e Alaor**, a minha base é de vocês;*

*Aos meus amigos de sempre **Kátia, Mariana, Luíza, Camila, Michele, Adriano, Malu, Maria Cecília, Mike, Carol, Ana Carolinha, Luana, Giovana**. Pelo convívio, risadas e aprendizados;*

*À professora **Eliana Varanda** pela disponibilidade e conhecimentos, me aceitando como se fosse sua aluna;*

*Aos **professores** da FCFar-UNESP pelos conhecimentos acadêmicos, técnicos e científicos aprendidos durante as disciplinas;*

*Um agradecimento imenso á **Mariana Santoro**, que não somente me ajudou, foi amiga e preocupada com meu trabalho. Obrigada pelos conhecimentos repassados, dicas, conversas e companhia. Você é um exemplo de pessoa que precisamos ter em um grupo, uma pessoa sem intenções de receber gratidão de volta. **OBRIGADA!** Sem você as coisas ficariam muito mais difíceis.*

*À todos os funcionários da pós, em especial **Claúdia, Daniela e Fátia** que sempre se mostrou disponível para todas as dúvidas. Obrigada pela compreensão!*

OBRIGADA A TODOS!!!!!!

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

·OH	Radical Hidroxila
¹ O ₂	Oxigênio Singlete
AA	Ácido Ascórbico
ANOVA	Análise de Variância
AP	Palmitato de ascorbila
AP-1	Fator ter transcrição ativador da proteína 1
ATO	Trióxido de Arsênio
ATP	Adenosina Trifosfato
ATV	Solução de tripsina/versene
BrQ	2-bromo-1,4-naftoquinona
BrQ/VC	Associação BrQ + VC
C+	Controle Positivo
C -	Controle Negativo
CAT	Catalase
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CS	Controle de Solvente
DMEM	<i>Dulbecco's Modification of Eagle's Médium</i>
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Admnistration</i>

GLUTs	Receptores de glicose/Transporte facilitador de Glicose
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine)
GSSG	Glutathione oxidized
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HIF-1	Fator 1 induzível por hipóxia
HK-II	Hexokinase II
HOCl	Ácido Hipocloroso
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monohidratado
LCQ	<i>Fleet Ion Trap Mass Spectrometer</i>
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama
MCF-7 BUS	Linhagem celular de câncer de mama responsiva ao estrogênio
MCF-10A	Linhagem celular de mama normal
MMP	Metaloproteinases
MQ	2-metoxi-1,4-naftoquinona
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamide e adenine
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sódio monohidratado
NEM	N-ethylmaleimide
NF κ B	Fator Nuclear kappa B
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Ânion Radical Superóxido

O ₃	Ozônio
OPA	Orto-Ftalaldeído
p53	Proteína responsável pelo controle do ciclo celular
P450	Citocromo P450 - Família de proteínas responsáveis pela oxidação no processo de biotransformação
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	Potencial de hidrogênio
PKM2	Piruvato Quinase II
PMN	Células Polimorfonucleares
Q-SG	Produto de conjugação naftoquinona/GSH
SOD	Superóxido Dismutase
SOD1	Superoxido dismutase [Cu-Zn] - citosólica
SOD2	Superoxido dismutase (Mn-SOD) – mitocondrial
SRB	Sulforodamina B
USP	Universidade de São Paulo
VC	Vitamina C
VK ₃	Vitamina K ₃ (menadiona)
VK ₃ /VC	Associação VK ₃ + VC
VKs	Vitaminas K
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde - OMS)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Relação do nível de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a resposta celular. Adaptado Lopéz-Lazaro (2007)..... 37
- Figura 2.** Ilustração do provável comportamento em células normais e cancerígenas frente à concentrações adicionais de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)..... 38
- Figura 3.** Variações nas estruturas químicas de alguns componentes da família de vitaminas Ks existentes.* número de isoprenóides presentes. Adaptado de Chen et al (2012)..... 40
- Figura 4.** Representação de uma das vias de biotransformação da menadiona. Produção de espécies reativas de oxigênio durante a redução de um elétron do radical semiquinona. Modificado de Parkinson (2013)..... 41
- Figura 5.** Ciclo de oxi-redução que ocorre com a associação entre ácido ascórbico e a menadiona: (1) ácido ascórbico (AA ou VC), (2) naftoquinona, (3) naftosemiquinona, (4) deidroascorbato, (5) oxigênio molecular, (6) ânion superóxido e (7) peróxido de hidrogênio..... 42
- Figura 6.** Metabolismo redox da vitamina C. A oxidação de um elétron do ácido ascórbico (AA) gera o radical ascorbil, a ocorrência de mais uma oxidação dá origem ao ácido dehidroascorbato (DHA). Modificado Duarte e Lunec (2005)..... 43
- Figura 7.** Esquema de organização das unidades experimentais empregadas no teste de microplacas para avaliação de citotoxicidade pelos compostos VC, VK₃ e BrQ e suas associações..... 55
- Figura 8.** Estrutura básica de uma 1,4-naftoquinona e naftoquinonas relacionadas..... 58
- Figura 9.** Cinética do consumo de oxigênio dissolvido monitorado por 30 minutos. Mistura de naftoquinonas (2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃, 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ ou 2-metoxi-1,4-naftoquinona - MQ - 10 μ M), ácido ascórbico (VC - 500 μ M) em PBS pH 7,4 à 37°C..... 59
- Figura 10.** Cinética do consumo de oxigênio dissolvido monitorado por 30 minutos. Mistura de naftoquinonas (2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃, 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ ou 2-metoxi-1,4-naftoquinona - MQ - 10 μ M), ácido ascórbico (VC - 500 μ M) em PBS pH 7,4 à 37°C..... 59
- Figura 11.** Aparelho YSI 5300A Oxygen Monitor (Yellow Spring USA). (A) O consumo de oxigênio molecular durante a reação constituída por ácido ascórbico 500 μ M e naftoquinona 10 μ M em de tampão PBS 10 mM, pH 7,4 a 37°C. (B) Em detalhe o sistema de reação fechado pelo eletrodo..... 60

- Figura 12.** Consumo de oxigênio dissolvido. Proporção de depleção (%/ minuto). Os controles e misturas de reação foram constituídos naftoquinonas (2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃, 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ ou 2-metoxi-1,4-naftoquinona - MQ - 10 μM), ácido ascórbico (VC - 500 μM) em PBS pH 7,4 à 37°C. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos diferentes. Barras verticais representam o erro padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,01). Teste de variância ANOVA com pós-teste Tukey, com múltipla comparação..... 60
- Figura 13.** Consumo de oxigênio dissolvido (%/minuto). Efeito de concentrações de 2-bromo,1-4 naftoquinona (BrQ) na depleção de oxigênio em associação com a vitamina C em comparação a reação contendo 2-metil-1,4-naftoquinona (VK₃). A mistura de reação foi constituída VK₃ (10 μM), BrQ (10, 1, 0,1 e 0,01 μM) e vitamina C (VC 500 μM) em PBS pH 7,4 à 37°C. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos diferentes..... 62
- Figura 14.** Representação da molécula do Palmitato de ácido ascórbico (AP)..... 63
- Figura 15.** Cinética do consumo de oxigênio dissolvido em reação. Palmitato de ascorbila - AP (500 μM) e naftoquinonas (2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃ ou 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ) (10 μM)..... 63
- Figura 16.** Cinética do consumo de oxigênio dissolvido em reação. Palmitato de ascorbila - AP/2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ em comparação com ácido ascórbico - VC/ BrQ. As reações foram compostas de AP ou VC (500 μM) e BrQ (10 μM)..... 64
- Figura 17.** Curva de calibração do aparelho TBR 4100/1025. (A) Imagem retirada do programa vinculado ao aparelho TBR 4100/1025 após o acréscimo das concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), concentrações acrescidas de 17,4 μM. (B) Representação da curva de calibração (r² 0,999) para a obtenção da concentração real de H₂O₂ presente na solução..... 65
- Figura 18.** Produção de H₂O₂. Perfil cinético da produção de H₂O₂ durante as reações ciclo-redox. Misturas de 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ ou 2-metil-1,4-naftoquinona -VK₃ (10 μM) e ácido ascórbico - VC (500 μM) em PBS, pH 7,4 à 37°C. Reação monitorada por 600 segundos..... 66
- Figura 19.** Produção de H₂O₂. Taxa de produção de H₂O₂ (μM/minuto). As reações foram compostas por associação com naftoquinonas (2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃, 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ ou 2-metoxi-1,4-naftoquinona - MQ (10 μM)/ácido ascórbico -VC (500 μM). Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,01), one way ANOVA com pós-teste Tukey, com múltipla comparação..... 67

- Figura 20.** Produção de H₂O₂. Perfil cinético da produção de H₂O₂ durante as reações ciclo-redox. As misturas de reação foram constituídas por 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ (10 μM) e ácido ascórbico - VC (100, 200 400 μM) em PBS, pH 7,4 à 37°C. Reação monitorada por 350 segundos..... 68
- Figura 21.** Principais enzimas que biotransformam EROs. Superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx) e catalase (CAT)..... 68
- Figura 22.** Evidências da formação de H₂O₂ pela catalase. A mistura de reação foi 2-bromo-1,4-naftoquinona (10 μM)/ácido ascórbico -VC (500 μM) e catalase 3 mg/mL..... 69
- Figura 23.** Influência da enzima superóxido dismutase (SOD) na produção de H₂O₂. Perfil cinético da produção de H₂O₂ durante as reações ciclo-redox. (A) 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/ ácido ascórbico – VC. (B) 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/VC. As misturas de reação foram constituídas por naftoquinonas (10 μM), VC (500 μM) e SOD (2 mg/mL) em PBS, pH 7,4 à 37°C. Reação monitorada por 600 segundos..... 70
- Figura 24.** Perfil cinético da redução do citocromo c por radicais ânion superóxido durante a reação de ciclo-redox por 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/vitamina C – VC (10/500 μM). Concentração de citocromo c foi de (100 μM) em PBS, pH 7,4 à 37°C. O monitoramento foi realizado por 5 minutos com intervalo de de leitura de 30 segundos..... 71
- Figura 25.** Consumo de naftoquinonas durante a reação de ciclo-redox. (A, a) Padrão 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ; (A, b) reação de BrQ/vitamina C – VC. (B, a) Padrão 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃; (B, b) reação de VK₃/VC. As misturas reacionais foram constituídas por naftoquinonas (10 μM) e VC (500 μM) em PBS a 37 ° C e a concentração restante de naftoquinonas medidos após 5 minutos de reação..... 72
- Figura 26.** Consumo de GSH e produção de GSSG. (A) Padrão GSH (100 μM); (B) Presença de GSSG em padrão de GSH; (C) GSH remanescente após reação ciclo-redox: 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/vitamina C - VC; (D) Produção de GSSG após a reação ciclo-redox BrQ/VC; (E) GSH remanescente após reação ciclo-redox: 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/VC; (F) Produção de GSSG após a reação ciclo-redox VK₃/VC. A condição de reação foram naftoquinonas (10 μM), VC (500 μM) e GSH (100 μM) em PBS pH 7,4 a 37 °C. Após 3 min, alíquotas das misturas de reação foram removidos e submetidos a derivatização e análise..... 74
- Figura 27.** Curva de calibração. (A) GSH (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μM). (B) GSSG (200, 100, 50 e 25 μM) Representação da curva de calibração (r² 0,999) para a obtenção da concentração real GSH e GSSG presente na solução..... 75
- Figura 28.** Consumo de naftoquinonas e formação de produto de conjugação com GSH. (A) Padrão 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃. (B) Consumo do VK₃ e produção de produto de conjugação (Q-SG) em reação de VK₃/GSH. (C) Padrão 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ. (D) Consumo do BrQ e produção de Q-SG em reação de BrQ/GSH. As condições de reação foram de (10 μM) para naftoquinonas e (100 μM) para GSH incubado durante 3 min. em PBS a 37 °C..... 76

Figura 29. Identificação do produto de conjugação (Q-SG) entre 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ e GSH. (A, a) Padrão BrQ; (A, b) consumo de BrQ e produção de Q-SG. (B) Espectro de Massa de Q-SG. A condição das reações foram para BrQ (10 μ M) e GSH (100 μ M) durante 3 minutos em PBS a 37 °C..... 77

Figura 30. O consumo de oxigênio molecular dissolvido no meio pelo Q-SG. A naftoquinona 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ e GSH foram previamente incubados durante 25 minutos. A condição de reação foi BrQ (10 μ M) e GSH (100 μ M) em PBS pH 7,4 a 37°C. A vitamina C (500 μ M) foi adicionado no tempo indicado (25 minutos). Resultado representativo de três experime..... 78

Figura 31. Representação geral do processo bioquímico e de citotoxicidade pelo Apatone[®] (LIQUID CRYSTAL PHARMACEUTICALS, 2008)..... 79

Figura 32. Influência do NADH na reciclagem do ácido ascórbico. (A) Espectro da oxidação do ácido ascórbico - VC com banda em 270 nm, reação composta por 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/VC. (B) Redução da oxidação de VC na presença de NADH, reação composta de BrQ/VC/NADH. (C) Perfil cinético do consumo de VC em reações contendo ou não NADH. As misturas reacionais foram constituídas por BrQ (10 μ M) e VC (500 μ M) em PBS a 37 ° C na presença ou ausência de NADH (100 μ M)..... 80

Figura 33. Oxidação do NADH durante a reação ciclo-redox. Oxidação do NADH monitorada à 340 nm. As misturas reacionais foram constituídas por 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ (10 μ M) e vitamina C - VC (500 μ M) em PBS a 37 ° C na presença ou ausência de NADH (100 μ M)..... 81

Figura 34. Vias propostas para 2-bromo-1,4-naftoquinona BrQ/vitamina C - VC em reação ciclo-redox na presença ou ausência de GSH ou NADH. Os compostos que foram medidos pelo seu consumo são marcados em vermelho..... 82

Figura 35. Morte celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento (10⁴ células/orifício) de grupos com concentrações diferentes entre a associação 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/vitamina C- VC e seus controles. O controle positivo (C+, 40% de DMSO), controle de solvente (CS). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), VK₃ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,01), One way (ANOVA) com pós-teste Tukey, com múltipla comparação..... 84

Figura 36. Morte celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento (10⁴ células/orifício) de grupos com concentrações diferentes entre a associação 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/Vitamina C – VC. O controle positivo (C+, 40% de DMSO). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), VK₃ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,01), one way ANOVA com pós-teste Tukey, com múltipla comparação..... 85

Figura 37. Morte celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento (10^4 células/orifício) de grupos com concentrações diferentes entre a associação 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ /vitamina C - VC e seus controles. O controle positivo (C+, 40% de DMSO), controle de solvente (CS). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), *one way* (ANOVA) com pós-teste Tukey, com múltipla comparação..... 87

Figura 38. Morte celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento (10^4 células/orifício) de grupos com concentrações diferentes de 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/Vitamina C - VC. O controle positivo (C+, 40% de DMSO). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), *one way* ANOVA com pós-teste Tukey, com múltipla comparação..... 88

Figura 39. Comparação da morte celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento em diferentes concentrações das associações 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/Vitamina C- VC *versus* 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/VC. A condição de experimentação foram VC (1 mM, 500 e 250 μ M), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Teste *t de students*..... 90

Figura 40. Comparação da morte celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento em diferentes concentrações das associações 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/Vitamina C- VC e 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/VC. A condição de experimentação foram VC (1 mM, 500 e 250 μ M), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o erro padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$). Teste *One way* (ANOVA), com pós-teste Tukey, com múltipla comparação..... 92

Figura 41. Morte celular em células CHO após 24 horas de tratamento (10^4 células/orifício) de grupos com concentrações diferentes entre a associação 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ /vitamina C - VC e seus controles. O controle positivo (C+, 40% de DMSO), controle de solvente (CS). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), *One way* (ANOVA) com pós-teste Tukey, com múltipla comparação..... 93

Figura 42. Morte celular em células CHO após 24 horas de tratamento (10^4 células/orifício) de grupos com concentrações diferentes entre a associação 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃ /Vitamina C – VC. O controle positivo (C+, 40% de DMSO). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), VK₃ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), one way ANOVA com pós-teste Tukey, com múltipla comparação..... 94

Figura 43. Morte celular em células CHO após 24 horas de tratamento (10^4 células/orifício) de grupos com concentrações diferentes entre a associação 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ /vitamina C - VC e seus controles. O controle positivo (C+, 40% de DMSO), controle de solvente (CS). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), one way (ANOVA) com pós-teste Tukey, com múltipla comparação..... 96

Figura 44. Morte celular em células CHO após 24 horas de tratamento (10^4 células/orifício) de grupos com concentrações diferentes de 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/Vitamina C - VC. O controle positivo (C+, 40% de DMSO). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), one way ANOVA com pós-teste Tukey, com múltipla comparação..... 97

Figura 45. Comparação da morte celular em células CHO após 24 horas de tratamento em diferentes concentrações das associações 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/Vitamina C- VC *versus* 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/VC. A condição de experimentação foram VC (1 mM, 500 e 250 μ M), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Teste *t de students*..... 99

Figura 46. Comparação da morte celular em células CHO após 24 horas de tratamento em diferentes concentrações das associações 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/Vitamina C- VC e 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/VC. A condição de experimentação foram VC (1 mM, 500 e 250 μ M), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o erro padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$). Teste one way (ANOVA), com pós-teste Tukey, com múltipla comparação..... 101

Figura 47. Comparação da morte celular em células CHO *versus* MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento em diferentes concentrações das associações 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/Vitamina C- VC. A condição de experimentação foram VC (1 mM, 500 e 250 μ M), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Teste *t de students*..... 102

Figura 48. Comparação da morte celular em células CHO *versus* MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento em diferentes concentrações das associações 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/VC. A condição de experimentação foram VC (1 mM, 500 e 250 μ M), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Teste *t de students*..... 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Representação de algumas EROs e ERNs.....	33
Tabela 2. Concentração do consumo de oxigênio dissolvido nos grupos de substâncias isoladas (controle) e associações com naftoquinonas (2-metil-1,4-naftoquinona - VK ₃ , 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ ou 2-metoxi-1,4-naftoquinona – MQ (10 µM) e ácido ascórbico -VC (500 µM).....	61
Tabela 3. Produção de H ₂ O ₂ nos grupos de substâncias isoladas (controle) e associações com naftoquinonas (2-metil-1,4-naftoquinona - VK ₃ , 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ ou 2-metoxi-1,4-naftoquinona – MQ (10 µM) e ácido ascórbico -VC (500 µM).....	66
Tabela 4. Citotoxicidade em células MCF-7 BUS (%), pela exposição de compostos isolados (controles) e associação de 2-metil-1,4-naftoquinona - VK ₃ / vitamina C- VC (10 ⁴ células/orifício). Condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 µM), VK ₃ (10, 5 e 2,5 µM) e suas associações em meio DMEM.....	86
Tabela 5. Citotoxicidade em células MCF-7 BUS (%), pela exposição de compostos isolados (controles) e associação de 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/ vitamina C- VC (10 ⁴ células/orifício). Condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 µM), BrQ (10, 5 e 2,5 µM) e suas associações em meio DEMEM.....	89
Tabela 6. Comparação morte celular em células MCF-7 BUS (%) após 24 horas de tratamento (10 ⁴ células/orifício) entre 2-metil-1,4-naftoquinona - VK ₃ / vitamina C- VC <i>versus</i> 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/Vitamina C- VC. Condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 µM), VK ₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 µM).....	91
Tabela 7. Citotoxicidade em células CHO (%), pela exposição de compostos isolados (controles) e associação de 2-metil-1,4-naftoquinona - VK ₃ / vitamina C- VC (10 ⁴ células/orifício). Condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 µM), VK ₃ (10, 5 e 2,5 µM) e suas associações em meio DMEM.....	95
Tabela 8. Citotoxicidade em células CHO (%), pela exposição de compostos isolados (controles) e associação de 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/ vitamina C- VC (10 ⁴ células/orifício). Condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 µM), BrQ (10, 5 e 2,5 µM) e suas associações em meio DMEM.....	98
Tabela 9. Comparação morte celular em células CHO (%) após 24 horas de tratamento (10 ⁴ células/orifício) entre 2-metil-1,4-naftoquinona - VK ₃ / vitamina C- VC <i>versus</i> 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/Vitamina C- VC. Condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 µM), VK ₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 µM)...	100
Tabela 10. Comparação morte celular em linhagem de célula normal (CHO) <i>versus</i> célula tumoral (MCF-7 BUS) (%) após 24 horas de tratamento (10 ⁴ células/orifício) com 2-metil-1,4-naftoquinona - VK ₃ / vitamina C- VC e 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/Vitamina C- VC. Condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 µM), VK ₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 µM).....	104

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	26
RESUMO	27
ABSTRACT	28
1. INTRODUÇÃO	29
1.1. Câncer	30
1.2. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs) e Estresse Oxidativo	32
1.3. Relação entre a bioquímica de células neoplásicas e EROs	34
1.4. Câncer e Quinonas	39
1.5. A associação: naftoquinona e ácido ascórbico	41
2. OBJETIVOS	46
3. MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1. Materiais	49
3.1.1. Drogas e Reagentes	49
3.1.2. Linhagens Célulares	49
3.1.2.1. Meio de cultura e reagentes	49
3.2. Métodos	50
3.2.1. Estudos químicos e bioquímicos	50

3.2.1.1. Monitoramento do consumo de oxigênio (O ₂)	50
3.2.1.2. Monitoramento da formação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	50
3.2.1.3. Análise da produção de ânion superóxido (O ₂ ^{•-})	51
3.2.1.4. Avaliação do consumo de naftoquinonas	51
3.2.1.5. Identificação de produto de conjugação ao GSH (Q-SG) ...	51
3.2.1.6. Avaliação do consumo de GSH e produção de GSSG	52
3.2.1.7. Avaliação do efeito da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) no consumo de ácido ascórbico	53
3.3. Estudos Celulares	53
3.3.1. Descongelamento dos estoques celulares	53
3.3.2. Preparo das substâncias-teste	53
3.3.3. Tripsinização das culturas celulares	54
3.3.4. Ensaio de citotoxicidade	54
3.4. Análise dos resultados	56
4. RESULTADOS	57
4.1. Ensaio químicos e bioquímicos	58
4.1.1. Monitoramento do consumo de oxigênio (O ₂)	58
4.1.2. Análise da produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	64
4.1.3. Análise da produção de ânion superóxido (O ₂ ^{•-})	71
4.1.4. Avaliação do consumo de naftoquinonas	72
4.1.5. Avaliação do consumo de GSH e produção de GSSG	73

4.1.6. Identificação de produto de conjugação ao GSH (Q-SG)	75
4.1.7. Consumo de oxigênio pelo produto de conjugação GSH/BrQ (Q-SG) na presença de VC	77
4.1.8. Avaliação do efeito de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) no consumo de ácido ascórbico	78
4.1.9. Vias propostas para BrQ/VC em reação ciclo-redox	82
4.2. Ensaios biológicos	82
4.2.1. Citotoxicidade em célula tumoral MCF-7 BUS	83
4.2.1.1. Citotoxicidade de células MCF-7 BUS expostas à associação VK ₃ /VC	83
4.2.1.2. Citotoxicidade de células MCF-7 BUS expostas à associação BrQ/VC	86
4.2.1.3. Comparação da citotoxicidade em células MCF-7 BUS entre os grupos VK ₃ /VC <i>versus</i> BrQ/VC	89
4.2.2. Citotoxicidade em célula normal CHO	92
4.2.2.1. Citotoxicidade de células CHO expostas à associação VK ₃ /VC	92
4.2.2.2. Citotoxicidade de células CHO expostas à associação BrQ/VC	95
4.2.2.3. Comparação da citotoxicidade em células CHO entre os grupos VK ₃ /VC <i>versus</i> BrQ/VC	98
4.2.2.4. Comparação da citotoxicidade pela associação VK ₃ /VC e BrQ/VC entre linhagem de célula normal (CHO) <i>versus</i> linhagem de célula tumoral (MCF-7 BUS)	101

5. DISCUSSÃO	105
6. CONCLUSÕES	114
7. REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS.....	116

CAPÍTULO II

“2-Bromo-1,4-naphthoquinone: a potentially improved substitute of menadione in Apatone™ therapy.”	135
--	------------

CAPÍTULO I

*"Só uma coisa torna um sonho impossível: o medo de fracassar."
(Paulo Coelho)*

RESUMO

GRACIANI, Fernanda Silva. “Estudo da eficiência de produção de peróxido de hidrogênio por naftoquinonas em associação com ácido ascórbico: aplicações como agentes citotóxicos em linhagem de célula normal e tumoral.”. Defesa (Doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, SP.

O câncer é considerado como uma das principais causas de morte no mundo. A compreensão das diferenças biológicas entre células cancerígenas e normais é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, buscando sempre a maior seletividade em alvos que sejam críticos para células cancerígenas se comparado às células normais, sendo uma das características apresentadas em células cancerígenas o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs). O objetivo deste estudo consiste em estudar a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por meio da associação ácido ascórbico/naftoquinona e sua aplicação em modelos de citotoxicidade, além de verificação de possível seletividade entre células normais e tumorais. Foram utilizados os métodos de avaliação do consumo de oxigênio, determinação da produção de H_2O_2 , avaliação da ocorrência de ciclo redox por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e interação destas drogas com glutathione (GSH) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH). O ensaio de citotoxicidade foi determinado pelo método da sulforodamina B em células câncer de mama (MCF-7 BUS) e células normais de ovário de hamster chinês (CHO). Foi descoberto que a presença de um grupo retirador de elétrons na molécula de naftoquinona teve um efeito direto sobre a eficiência da produção de H_2O_2 . O composto 2-bromo-1,4-naftoquinona (BrQ), em que o átomo de bromo substituído no grupo metil na molécula 2-metil-1,4-naftoquinona (VK₃), foi aproximadamente 10 a 19 vezes mais eficiente do que VK₃ em termos de consumo de oxigênio e produção de H_2O_2 , respectivamente. A proporção $[H_2O_2] \mu M/min_{produzido}/[naftoquinona] \mu M/min_{consumido}$ foi 68 ± 11 and 5.8 ± 0.2 para BrQ e VK₃, respectivamente, que revelou a maior eficácia de BrQ como um catalisador para a oxidação de ácido ascórbico (VC). Ambos VK₃ e BrQ reagiram com GSH, mas BrQ foi o substrato mais eficaz. Parte do GSH foi incorporado na naftoquinona, dando origem a um produto de substituição nucleofílica (Q-SG). O esgotamento da BrQ por GSH não impediu sua capacidade de redox, isto porque Q-SG também foi capaz de catalisar a produção de EROs. Em ensaios de citotoxicidade o par VC/BrQ apresentou maior proporção de morte para as células cancerígenas MCF-7 BUS e menor morte para linhagem normal CHO, mesmo em doses mais baixas. Mostrando uma razão (BrQ:VK) de 2,3 e 1,4 para células MCF-7 BUS e CHO respectivamente. As associações de drogas mostraram seletividade em relação a linhagens cancerígena e normal: MCF-7 BUS:CHO; 2,9 e 1,4 para BrQ/VC e VK₃/VC, respectivamente. Podemos concluir que a associação BrQ/VC foi superior em todos os resultados químicos e biológicos, configurando neste último uma maior seletividades com relação as células testadas, promovendo maior proporção de morte celular às células de linhagem cancerígena.

Palavras-chave: menadiona, 2-bromo-1,4 naftoquinona, câncer, espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

GRACIANI, Fernanda Silva. “Study of the efficiency of production of hydrogen peroxide by naphthoquinones in combination with ascorbic acid: cytotoxic agents in applications such as cell line normal and tumor.”. Defesa (Doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, SP.

Cancer is considered as one of the leading causes of death worldwide. Understanding the biological differences between normal cells and cancer cells is critical for the development of new therapeutic strategies, always seeking greater selectivity at targets that are critical for cancer cells compared to normal cells, one of the features shown in cancer cells is the increase reactive oxygen species (ROS). The aim of this study is to investigate the generation of hydrogen peroxide (H_2O_2) through association naphthoquinone/ascorbic acid and its application in models of cytotoxicity, and check possible selectivity between normal cells and tumor cells. Methods were used to evaluate the oxygen consumption, determination of H_2O_2 production, assessing the occurrence of redox cycle by HPLC and interaction of these drugs in combination with glutathione (GSH) or reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). The cytotoxicity assay was determined by the sulforhodamine B in breast cancer cell (MCF-7 BUS) and chinese hamster ovary (CHO). It has been discovered that the presence of an electron withdrawing group in the naphthoquinone had a direct effect on the efficiency of production of H_2O_2 . The compound 2-bromo-1,4-naphthoquinone (BrQ) in which the bromine atom substituted the methyl group in the molecule 2-methyl -1,4- naphthoquinone (VK₃) was approximately 10 to 19 times more efficient that VK₃ in terms of oxygen consumption and the production of H_2O_2 , respectively. The ratio $[H_2O_2] \mu M / \min_{produced} / [naphthoquinone] \mu M / \min_{consumed}$ was 68 ± 5.8 and 11 ± 0.2 for BrQ and VK₃, respectively, which showed the greatest efficacy BrQ as a catalyst for the oxidation of ascorbic acid (VC). Both VK₃ and BrQ reacted with GSH, but the substrate was BrQ more effective. Part of GSH was incorporated into naphthoquinone, giving rise to a nucleophilic substitution product (Q-SG). The depletion of GSH by BrQ did not prevent the redox ability, because Q-SG was also able to catalyze the production of ROS. In the cellular studies, BrQ/VC was more cytotoxic than VK₃/VC even at lower doses, showing the ratio (BrQ:VK₃) of 2.3 and 1.4 to MCF-7 BUS and CHO, respectively. The drug combinations showed selectivity in relation to the cancer cells and normal cells: MCF-7 BUS:CHO; 2,9 and 1,4 for BrQ/VC and VK₃/VC, respectively. We conclude that the association BrQ/VC was superior in all chemical and biological results, the latter setting a higher selectivity and promoting greater proportion of cell death to cancer cell lineage.

Keywords: menadione, 2-bromo-1,4-naphthoquinone, cancer, reactive oxygen species.

1. INTRODUÇÃO

*“Todas as substâncias são venenos,
não existe nenhuma que não seja um veneno.
A dose certa diferencia o veneno do remédio”.*

(Phillipus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim – Paracelso)

1.1. Câncer

O funcionamento normal de um organismo multicelular é gerido por uma perfeita comunicação bioquímica e molecular através de interações com estruturas proteicas complexas. Assim se mantêm um ser complexo com mecanismos para realização de funções fisiológicas controladas por comandos genéticos, tais como metabolismo, síntese de hormônios, proliferação celular, o reparo de alguns erros nos processos envolvidos na replicação do DNA ou até mesmo morte programada, quando necessário. Todos os processos são minuciosamente controlados por sistemas de sinalização celular que envolvem moléculas específicas à cada via bioquímica. Quando há uma desarmonia em tais processos a eminência de instalação de uma patologia é grande (PELICANO, CARNEY; HUANG, 2004).

O câncer não é uma doença nova. Apesar de na antiguidade ser considerada rara, já havia indícios de sua presença. O documento mais antigo encontrado dentre os 48 relatos médicos de Imhotep, sacerdote egípcio 2500 a.C, de número 45, traz as seguintes palavras “massa protuberante no seio”, sendo Hipócrates a primeira pessoa, até onde se sabe, a relacionar a doença como conhecemos nos dias de hoje. Segundo este grego, nomeado como “pai da medicina”, a imagem de um tumor foi relacionada como uma espécie de caranguejo enterrado sob a pele. As veias sanguíneas ao redor do tumor seriam similares às pontas da carapaça e as patas do animal, o que hoje podemos chamar de metástase. Derivado do latim *cancru*, relacionando ao caranguejo, a doença há algum tempo é conhecida como câncer (SIDDHARTHA MUKHERJEE, 2011).

Apesar dos avanços em pesquisas, hoje ainda existem lacunas não preenchidas sobre o conhecimento exato dos processos moleculares que levam ao surgimento de uma massa tumoral.

O câncer caracteriza-se como um termo abrangente, utilizado para designar um grande conjunto de doenças. Segundo Boveri (2008) o câncer representa um conceito básico dito como “doença do genoma”, sendo assim, ocasionado por um processo microevolutivo composto por múltiplas etapas e que pode afetar qualquer parte do nosso organismo. Estas modificações se iniciam por acidentes genéticos que por terem falha em processos de reparo influenciam vias bioquímicas e de sinalização molecular, evoluindo a vários estágios até se tornar uma célula cancerosa. Ou seja, processos celulares alterados inerentes à célula cancerosa darão origem a várias células, por rápida multiplicação e

invasão à tecidos adjacentes, sendo esta uma característica definidora do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011; EMONS; GHADIMI; GRADE, 2013).

Considerado como uma das principais causas de morte no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, cerca de 13%, de todas as mortes em 2008, e estima-se que este número continue crescendo chegando a 13,1 milhões em 2030 (WHO, 2013).

A mais de 50 anos as terapias têm sido utilizadas com sucesso no tratamento de neoplasias (ROOSEBOOM et al., 2004). Muitas doenças relatadas em textos antigos ainda são encontradas nos dias de hoje com certa frequência, o que não acontecia com o câncer. A grande questão do número de mortes e incidência de câncer no mundo está diretamente ligada à longevidade, as pessoas não viviam o suficiente para que esta se manifestasse. Quanto mais vivemos, maiores são os riscos de surgimento da doença (SIDDHARTHA MUKHERJEE, 2011).

Existem vários mecanismos clínicos para atacar células de tumor, que vão desde a interferência física, como as radioterapias, até intervenções químicas e cirúrgicas, sendo muito comum, quando o indivíduo está em um estágio avançado da doença, a associação de terapias (ROOSEBOOM et al., 2004).

A maioria dos quimioterápicos surgiu de forma empírica, sem algum conhecimento prévio do mecanismo bioquímico de ação, mas, recentemente, com o aumento desta problemática, terapias racionais têm sido utilizadas, as quais se baseiam em alvos moleculares para transformar ou matar aquela célula. Mesmo assim, muitas são ainda ineficazes para pacientes, principalmente quando se fala da baixa seletividade, causando assim, efeitos adversos por destruírem também células saudáveis (ROOSEBOOM et al., 2004). Visto isso, destaca-se a importância de maiores conhecimentos sobre o metabolismo de células cancerígenas.

A terapia do câncer pode incorporar várias características comuns, como: ligação ao DNA (alquilação, complexação, intercalação) (KOVACIC; OSUNA, 2000); inibição de tirosina-kinase (THIENELT; GREEN; BOWLES, 2012), inibição de topoisomerase I e II (KOVACIC; OSUNA, 2000; MOUKHARSKAYA; VERSCHRAEGEN, 2012), ativação de DNAses (TAPER, 2008), existência de transferência de elétrons presente em fármacos propriamente ditos ou metabólitos; formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelularmente ou nas proximidades do DNA, além de terapias com hormônios (KOVACIC; OSUNA, 2000; TSANG et al., 2003) .

Fármacos como cisplatina (MIYAJIMA et al., 1997), bleomicina (HUG et al., 1997), trióxido de arsênio (ATO) (MILLER, 2002) e antraciclinas como a doxorubicina (TSANG et al., 2003), são usadas no tratamento contra as neoplasias através de mecanismos que causam a geração adicional de EROs.

1.2 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs) e Estresse Oxidativo

O oxigênio (O₂) é a fonte de sobrevivência de toda a humanidade na Terra por participar de maneira relevante no ciclo energético dos seres vivos, sendo essencial na respiração celular dos organismos aeróbicos.

Contudo, por muito tempo se desconfiava da importância do O₂ em relação a geração de radicais livres no organismo, mas isso ficou obscuro por muitos anos, inclusive a aceitação do termo “radical livre”, átomo ou molécula na qual possui elétrons desemparelhados (VALKO, 2007; ANDRINTSITOHAINA et al., 2012). Rebeca Gerschman foi pioneira publicando na revista *Science* que o O₂ é tóxico aos organismos vivos como mostrava seus experimentos quando o relacionava com raios X, segundo suas conclusões:

“Dos experimentos descritos e das considerações apresentadas, parece que a irradiação e envenenamento por oxigênio produzem alguns de seus efeitos letais, através de pelo menos um mecanismo comum, possivelmente a formação de radicais livres oxidantes”

(GERSCHMAN et al., 1954)

A questão sobre a presença de radicais livres em sistemas biológicos foi explorada por Denham Harman que foi o primeiro cientista a relacionar em seus experimentos o papel dos radicais livres quanto ao envelhecimento (HARMAN, 1956), sendo realmente comprovada a existência e importância destas moléculas radicalares com a descoberta da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) (Mc CORD; FRIDOVICH 1969).

Atualmente muito se sabe sobre a existência e características de tais moléculas no meio biológico, as quais são hoje melhor nomeadas como espécies reativas de oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs) (GILBERT; COLTON, 2002).

Espécies Reativas, sejam elas de oxigênio ou nitrogênio, receberam este nome por posteriormente serem descobertas moléculas não necessariamente radicalares. Portanto, há presença de moléculas radicalares e não radicalares, sendo que esta última promovia o mesmo efeito oxidante no micro ambiente biológico. As espécies reativas podem ser divididas em: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxigênio singlete (1O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$) e moléculas não radicalares como o ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ozônio (O_3) (PELICANO, CARNEY; HUANG, 2004).

Tabela 1. Representação de algumas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs).

EROs	NOME	ERNs	NOME
$O_2^{\cdot-}$	Ânion radical superóxido	NO^{\cdot}	Óxido nítrico
OH^{\cdot}	Radical hidroxila	$ONOO^{\cdot}$	Ânion Peróxinitrito
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio		

Em sistemas biológicos, as EROs são constantemente geradas através de uma variedade de vias, incluindo reações enzimáticas. Dentre elas podemos citar: NADPH oxidase, xantina oxidase, incompleta síntese endotelial de óxido nítrico (eNO sintase) e as enzimas do citocromo P450 (P450 ou CYP). Mas a mitocôndria é a principal estrutura responsável pela geração de EROs e ocorre pelo “escape” de elétrons durante o processo de fosforilação oxidativa, especialmente nos complexo I e III. Neste processo, a redução uni-eletrônica do oxigênio molecular (O_2) leva a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (SAYBASILI et al., 2001; KANG; HAMASAKI, 2003; HILEMAN et al., 2004; MULLER et al., 2004; MURPHY, 2009; ANDRINTSITOHAINA et al., 2012; TATARKOVA et al., 2012), estimando-se que cerca de 0,15 e 2% do consumo de O_2 resulta na formação de $O_2^{\cdot-}$ (TANHARA; NAVARETE; KOWALTOWSKI, 2009). Mesmo assim, há evidências de produção de EROs em outras vias mitocondriais como no ciclo do ácido cítrico (STARKOV et al., 2004). O ânion superóxido é a EROs produzida em maior escala no metabolismo aeróbio, servindo como precursor de outras EROs, e dessa forma, podendo

desempenhar um papel importante em uma variedade de afecções (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004).

As Espécies Reativas são moléculas oxidantes instáveis, que quando não inativadas por antioxidantes, são capazes de iniciar e/ou propagar a degradação de macromoléculas biológicas que é um processo deletério a lipídio, proteínas, ácidos nucleicos, conduzindo, desta forma, danos em estruturas celulares e alterações em vias metabólicas (HILEMAN et al., 2004).

Não obstante, é importante ressaltar que níveis moderados de EROs possuem um certo papel fisiológico como moléculas sinalizadoras como vias envolvidas no crescimento e diferenciação celular. A maioria de tipos celulares possuem um pequeno *burst* oxidativo para a geração de pequenas concentrações de EROs quando estimulados por citocinas, fatores de crescimento e hormônios como algumas interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF- α) dentre outros (THANNICKAL; FANBURG, 2000).

O estresse oxidativo é uma manifestação caracterizada por um desequilíbrio no estado redox da célula que pode ser causado tanto pela produção excessiva de EROs e/ou ERNs como pela diminuição e ou alteração de sistemas antioxidantes, principalmente endógenos (PELICANO et al., 2004; VALKO et al. 2007; ANDRINTSITOHAINA, 2012), podendo causar várias doenças, dentre elas, a hipertensão e a aterosclerose (GROTE, et al., 2006; CAVE, et al., 2005), artrite reumatóide, isquemia tecidual, doenças renais (EL-BENNA, et al., 2005), incluindo o câncer (VALKO et al. 2007).

1.3. Relação entre a bioquímica de células neoplásicas e EROs

A compreensão das diferenças entre células cancerígenas e células normais é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, buscando sempre, maior seletividade no tratamento com ataques em alvos que sejam críticos para as células cancerígenas e não para as células normais.

Cada vez mais aparecem evidências que sugerem que células cancerígenas também desencadeiam a produção de EROs, sendo provavelmente uma característica em seu metabolismo que às deixa sob uma condição de estresse oxidativo. Segundo Szatrowski e Nathan (1991), várias linhagens de células cancerígenas testadas mostraram presença de H₂O₂ em uma proporção equivalente às geradas por células polimorfonucleares (PMN), acima de 0,5 nmol/10⁴ células/h. Alguns autores mostram o aumento significativo de

espécies radicalares em células malignas, analisando células leucêmicas isoladas de pacientes apresentando formas variadas da doença, em comparação a linfócitos (DAVI et al., 2000; ZHOU et al., 2003; HILEMAN et al., 2004)

A presença de um estresse oxidativo de forma persistente pode ser a explicação, em parte, das características peculiares da fisiopatologia de uma neoplasia exacerbando vias de comunicação. As EROs atuam como segundo mensageiro em vias que alteram a transdução de sinal, sendo desta forma, um instrumento para a promoção da carcinogênese (TOYOKUNI et al., 1995).

A partir dos anos 80 quando os primeiros oncogenes e genes supressores de tumor foram descobertos, se iniciou a relação direta com mutações nestes locais e desenvolvimento de câncer (REDDY et al., 1982; PARADA et al., 1982; GOLDFARB et al., 1982; BISHOP, 1987; STANBRIDGE, 1990), o que hoje nos parece óbvio. Portanto, provavelmente ocorre um aumento da proliferação celular através da ativação de receptores da classe tirosina quinase, ativação de citosinas que por sua vez ativam fatores de transcrição tais como AP-1 (HIROTA et al., 1997; GERALD et al., 2004; KAVITHA et al., 2012), HIF-1 (HIROTA et al., 1997; SEMENZA, 2004; GERALD et al., 2004; LOPEZ-LAZARO, 2006), NF- κ B (HIROTA et al., 1997; GERALD et al., 2004; AMIRI; RICHMOND, 2005; ORANGE; LEVY; GEHA, 2005) e interferem em genes que promovem a supressão de tumor como p53 (HOLLSTEIN et al., 1991; BENSAAAD; VOUSDEN, 2004). Outros eventos relacionados com a sinalização de H₂O₂ envolvem a indução da expressão de proto-oncogenes, tais como c-fos, c-jun e c-myc, contribuindo assim para a expressão de genes relacionados com proteínas do ciclo celular que promovem a proliferação celular persistente (MAKI et al., 1992; TOYOKUNI et al., 1995) o que provavelmente deve interferir na inibição da apoptose (STORZ, 2005) e a promoção da metástases (AMIRI; RICHMOND, 2005; TRIPALDI; STUPPIA; ALBERTI, 2013).

Além disso, em 1926, Otto Heinrich Warburg foi o primeiro a reportar que células cancerosas possuem uma singularidade em seu metabolismo energético, produzindo ATP por via glicolítica dentro de condições aeróbicas, e não por fosforização oxidativa como ocorre em células normais. Segundo suas próprias palavras:

Câncer, acima de todas as outras doenças, tem inúmeras causas secundárias. Mas, mesmo para o câncer, há apenas uma causa principal. Resumida em poucas palavras, a principal causa do câncer é a substituição da respiração de oxigênio nas células normais do corpo por uma fermentação do açúcar.

(WARBURG, 1956)

Desta forma, a partir desde dado, tal processo começou a ser conhecido como “Efeito Warburg”. A princípio, Warburg reconheceu este fenômeno, utilização da via glicolítica, como uma característica universal de todas as células malignas devido à presença de uma respiração mitocondrial defeituosa por conta da própria doença (WARBURG, 1956; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010), sendo que um ciclo vicioso faz parte deste processo, que se inicia com - hipóxia, um dos fatores desencadeantes por provável metabolismo acelerado destas células, impulsionando à produção de EROs, que por sua vez, causa mutação do DNA mitocondrial e malformação da cadeia respiratória na mitocôndria, que assim, fornece condições para maior formação de EROs, mantendo este ciclo (GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010).

Ademais, todo esse processo bioquímico modificado de células cancerígenas pode envolver alterações em outras moléculas, como maior expressão de piruvato quinase II (PKM2) (WALLACE, 2012), hexoquinase II (HK-II), além de outros, também a superexpressão de receptores de glicose (GLUTs) (CAMERON; PAULING, 1979). Todos por consequência da utilização da via glicolítica, a qual representa um dos 10 marcos listado por Hanahan e Weinberg (2011) em sua revisão.

Portanto, o estresse oxidativo inerente às células cancerígenas pode ser devido ao aumento no metabolismo e/ou uma disfunção mitocondrial (HILEMAN et al., 2004).

Contudo, nosso organismo conta com um sofisticado sistema de defesa composto por moléculas, chamadas de forma generalizada de antioxidantes, que serão importantes para a prevenção e desintoxicação de moléculas que podem causar possíveis prejuízos causados por uma cascata oxidativa.

Dentre estas moléculas temos: superóxido dismutase (SOD), responsável por catalisar a dismutação de $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , onde a isoforma SOD1 (Cu/ZnSOD) gera na matriz mitocondrial e a SOD2 (MnSOD) gera no espaço intermembrana por consequência do complexo III da cadeia de elétrons (WALLACE, 2010), existem também, a catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH) que convertem H_2O_2 em água (H_2O), todas utilizando

enzimas e cofatores característicos para sua reação (SUN et al., 1989; OBERLEY; OBERLEY, 1997; NICCO et al., 2005).

Tais moléculas são importantes na preservação da homeostase do organismo impedindo o aparecimento de quadros clínicos que apresentem alterações fisiológicas.

A presença da enzima SOD vem sendo reportada por estar presente em altas concentrações em células malignas (DAVI et al., 2000; CHUNG-MAN et al., 2001; HILLEMANN, 2004), mostrando que a sua presença pode estar ligada à adaptação celular ao estresse oxidativo intrínseco, sugerindo, desta forma, que tais células dependeriam fortemente de alta expressão da SOD para manutenção de EROs em proporções dentro de toleráveis (HILLEMANN, 2004). Altos níveis da atividade da enzima SOD podem estar relacionados ao retardo do crescimento de tumores, mas também ao aumento do processo invasivo de células de câncer nos tecidos, cujo processo está associado à ativação de enzimas zinco dependentes da família das metaloproteinases (MMP) (VALKO et al, 2006).

Entretanto, há indícios que o estresse oxidativo permanente utilize toda a capacidade antioxidante presente no meio celular, sendo suposto, portanto, que uma exposição destas células a agentes capazes de gerar presença adicional de EROs, podem depletar totalmente as reservas antioxidantes e elevar os níveis de EROs a um limiar no qual conduz a morte celular, principalmente quando associado à um inibidor da atividade antioxidante (KONG; LILLEHEI, 1998; KONG et al., 2000)

Portanto, apesar do H_2O_2 estar estreitamente relacionado ao desenvolvimento de neoplasias, o aumento em nível celular desta substância pode ser um eficiente caminho para a morte de células das mesmas (Figura 1) (LÓPES-LÁZARO, 2007).



Figura 1. Relação do nível de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a resposta celular. Adaptado Lopez-Lazaro (2007).

Células cancerosas com aumento de EROs endógeno, provavelmente são mais sensíveis a drogas anti-câncer do que células normais, sendo demonstrado por Huang et al. (2000).

López-Lázaro (2007), trás a discussão sobre a dubiedade do papel do H_2O_2 em altas concentrações em células malignas (Figura 2). Há muitas evidências com relação a estes radicais atuarem promovendo a formação de células cancerosas, mas também muitos relatos mostrando a importância de geração adicional destas espécies reativas como nova terapia, o que já tem sido comprovado por fármacos presentes na clínica (paclitaxel, cisplatina, trióxido de arsênio, etoposide, dentre outros a doxorubicina) possuindo como características de seu mecanismo farmacológico a produção de H_2O_2 (Figura 2). Apesar da presença de diversos efeitos tóxicos em pacientes, pela restrição de tratamentos devido à gravidade e complexidade da doença, ainda é o que temos.

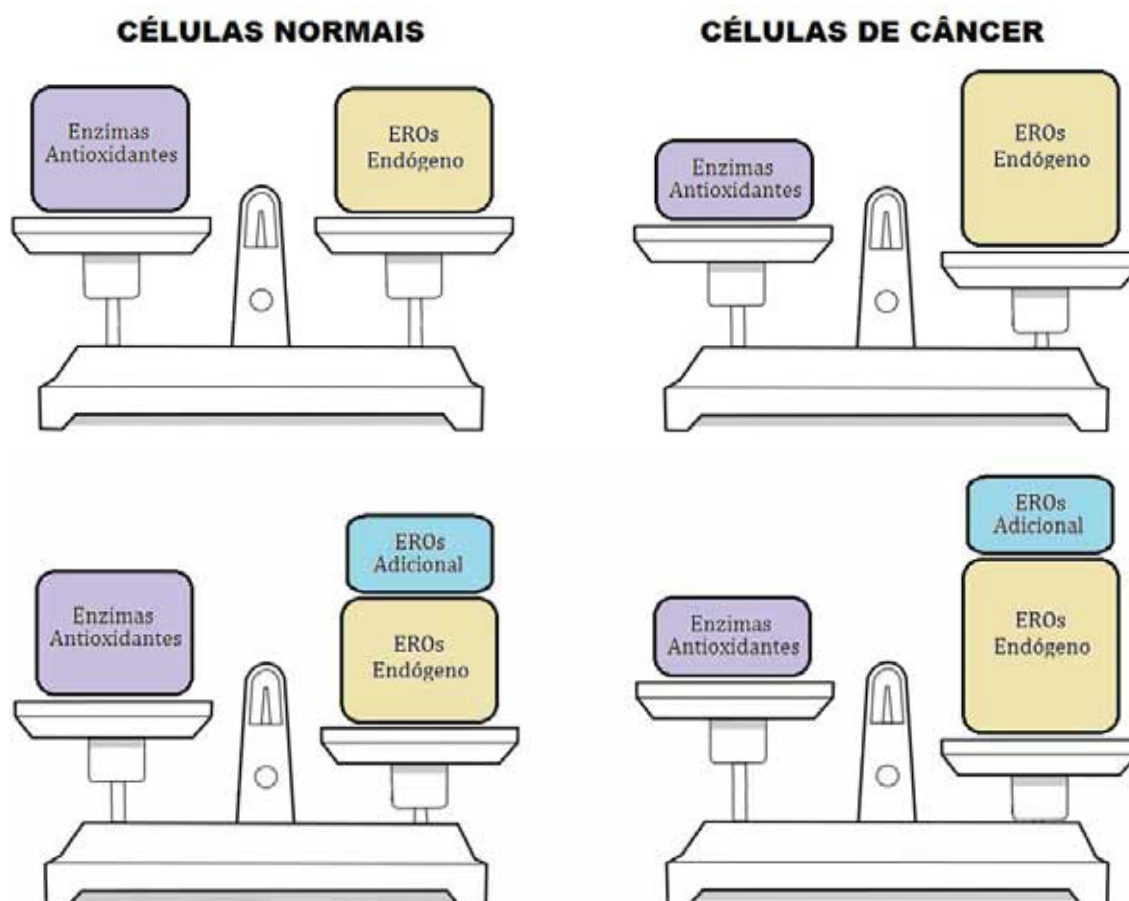


Figura 2. Ilustração do provável comportamento em células normais e cancerígenas frente à concentrações adicionais de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Adaptado de López-Lázaro (2007).

Como já mencionado, as EROs são responsáveis por desencadear vários tipos de efeitos, desde funções fisiológicas, como citado no tópico 1.2 como afecções, incluindo câncer, e de forma paradoxal, este estresse oxidativo presente intrinsecamente nas células cancerosas, pode ser explorado de forma inteligente objetivando terapias mais eficazes.

1.4. Câncer e Quinonas

O Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos tem identificado que a maioria das quinonas possui um grupo farmacofórico de grande importância para a sua atividade citotóxica, que permite usá-los como agente antitumor (PÉREZ-SACAU et al., 2007).

A vitamina K₃ (VK₃, 2-metil-1,4-naftoquinona ou menadiona) é uma naftoquinona que faz parte de uma família de características lipossolúveis (HEY, 2003; ARIS et al., 2005) que possui mais dois compostos, vitamina K₁ (filoquinona ou somente K, encontradas em algas e plantas superiores) e K₂ (menaquinona ou MK-n/ “n” significa número de isoprenóides ali presentes, encontrada em várias espécies de bactérias, sendo que recente descoberta mostra que ela pode ser produzida por animais, incluindo o homem, pela conversão de outras formas da vitamina K). Ao contrário destas, a vitamina K₃ não é considerada de origem natural, mas sim uma análoga sintética que age como uma pró-vitamina. Todas possuem um anel naftaleno com carbonilas nas posições 1 e 4 deste anel e dependendo dos substituintes em outras posições as vitaminas podem se diferenciar (LAMSON; PLAZA, 2003).

Chen et al (2012) apresenta a família de vitaminas K como (VKs), já que existe uma variedade de vitaminas K sendo as mais estudadas como anticâncer as vitaminas K₁, K₂, K₃ e K₅ (Figura 3).

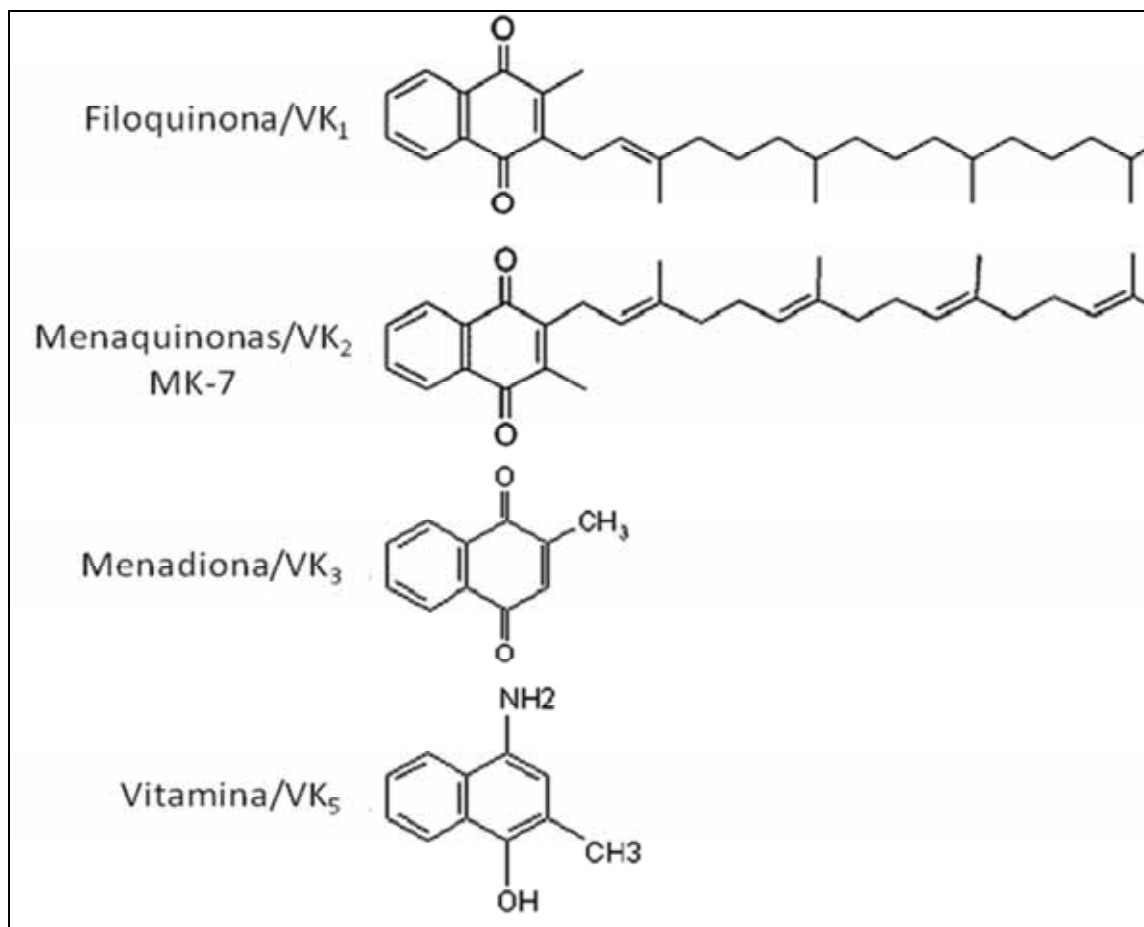


Figura 3. Variações nas estruturas químicas de alguns componentes da família de vitaminas Ks existentes. Adaptado de Chen et al (2012).

Segundo Jiang et al. (2013), a vitamina K₄ também tem sido muito promissora, em consideração aos seus estudos com linhagem de células de próstata humana (PC-3), a vitamina K₄ caracterizou-se como dose dependente com características de fragmentação do DNA e liberação de citocromo c.

A Menadiona tem sido investigada como agente antitumoral desde 1947 (MITCHELL; SIMON-REUS, 1947; MITCHELL, 1948).

A biotransformação das naftoquinonas pode ter várias vias, mas uma em especial está relacionada com sua investigação como promotor de citotoxicidade. Esta via na qual se inicia com a ajuda do citocromo P450 (P450) leva a formação de uma semiquinona e esta, por sua vez, se utiliza de oxigênio para se tornar na forma oxidada, assim há formação de EROs (Figura 4) (PARKINSON, 2013), provável via de exploração racional da VK₃ como agente tumoral.

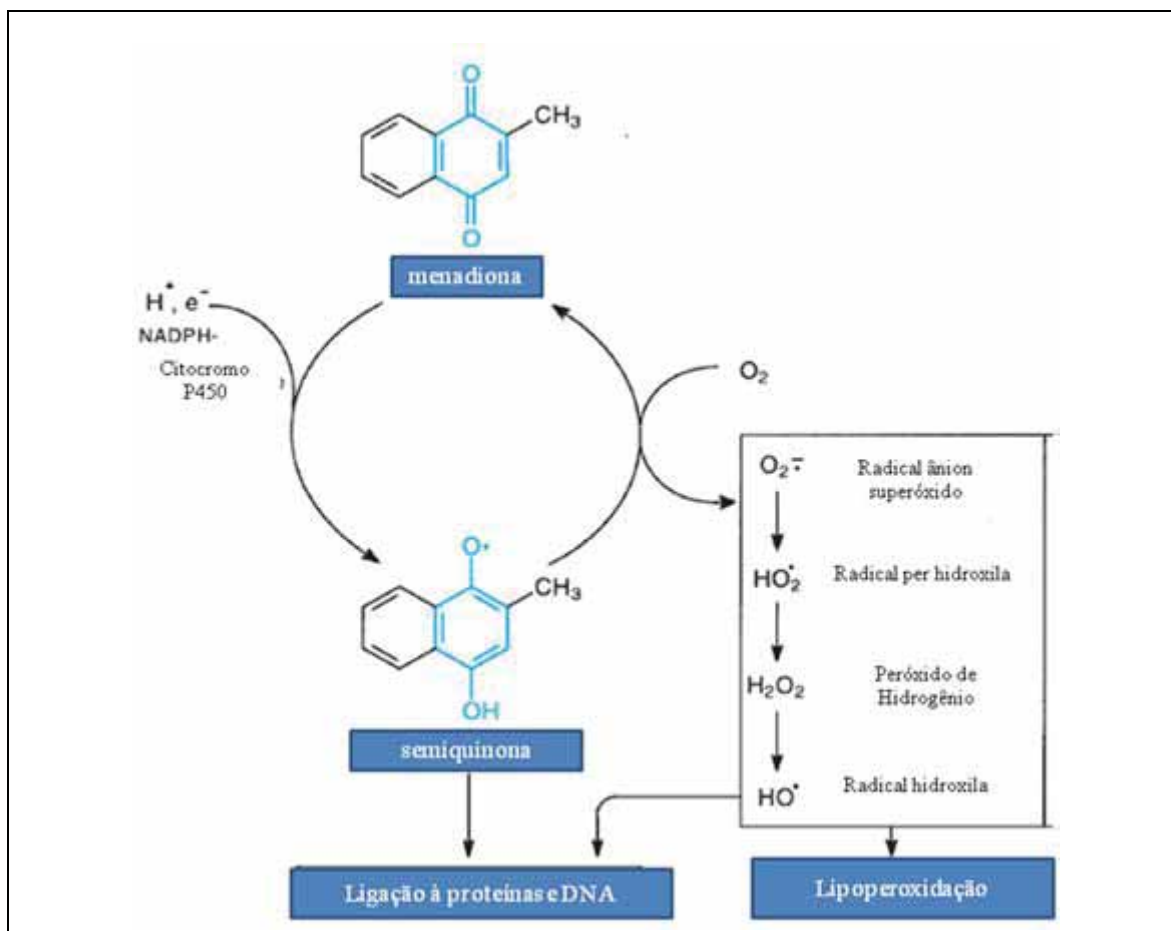


Figura 4. Representação de uma das vias de biotransformação da menadiona. Produção de espécies reativas de oxigênio durante a redução de um elétron do radical semiquinona. Modificado de Parkinson (2013).

Sua investigação tem ocorrido principalmente em associação com outras substâncias, as quais possuem indícios de atuarem de forma potencializadora à sua citotoxicidade, como a associação com: 5-fluorouracil, bleomicina, cisplatina, decarbazina, doxorubicina, mitomicina C, metotrexato e dentre outros o trióxido de arsênio (PELICANO et al., 2004).

1.5. A associação: naftoquinona e ácido ascórbico

A substância que atualmente tem despertado maior interesse em associação com a menadiona é a vitamina C (ácido ascórbico, AA ou VC). Vários estudos *in vitro* (NOTO et al., 1989; VENUGOPAL et al., 1996; ZHANG et al., 2001; VERRAX et al., 2003, 2004; CASTRO et al., 2008; CHEN et al., 2012) e *in vivo* (TAPER et al., 1992, 2001, 2004;

VERRAX et al., 2005, 2006; CHEN et al., 2011) tem comprovado e aprovado essa associação.

Além disso, alguns destes estudos demonstram que além de necrose e apoptose, um novo tipo de morte celular chamada por Gilloteaux, et al (1998), de “autoschizis”, que parece ser intermediária a apoptose e necrose, está em maior prevalência nesta associação.

Recentemente, estudos clínicos de fase I e II aprovado pela FDA por uma nova terapia patentiada como Apatone™, cujo é caracterizado pela administração de vitamina C/vitamina K₃ na proporção 100:1 utilizada em indivíduos com câncer de próstata por 12 semanas e que não responderam a tratamentos convencionais (TAREEN et al., 2008).

Acredita-se que o principal fator responsável pela eficácia na combinação entre a menadiona e a vitamina C contra o câncer se deve pela potencialização do estresse oxidativo que ocorre pelo aumento do ciclo oxido-redução da quinona (Figura 4), gerando ainda mais EROs (GANT et al., 1988). Portanto, a menadiona é reduzida não enzimaticamente pelo ascorbato para formar o deidroascorbato e o radical livre semiquinona, esta é rapidamente reoxidada na presença de (O₂) para sua forma quinona, gerando assim os EROs, sendo que o H₂O₂ é provavelmente o principal produto responsável pelo processo citotóxico (NOTO et al., 1989; CALDERON et al., 2002; VERRAX et al., 2004, 2005, 2006) (Figura 5).

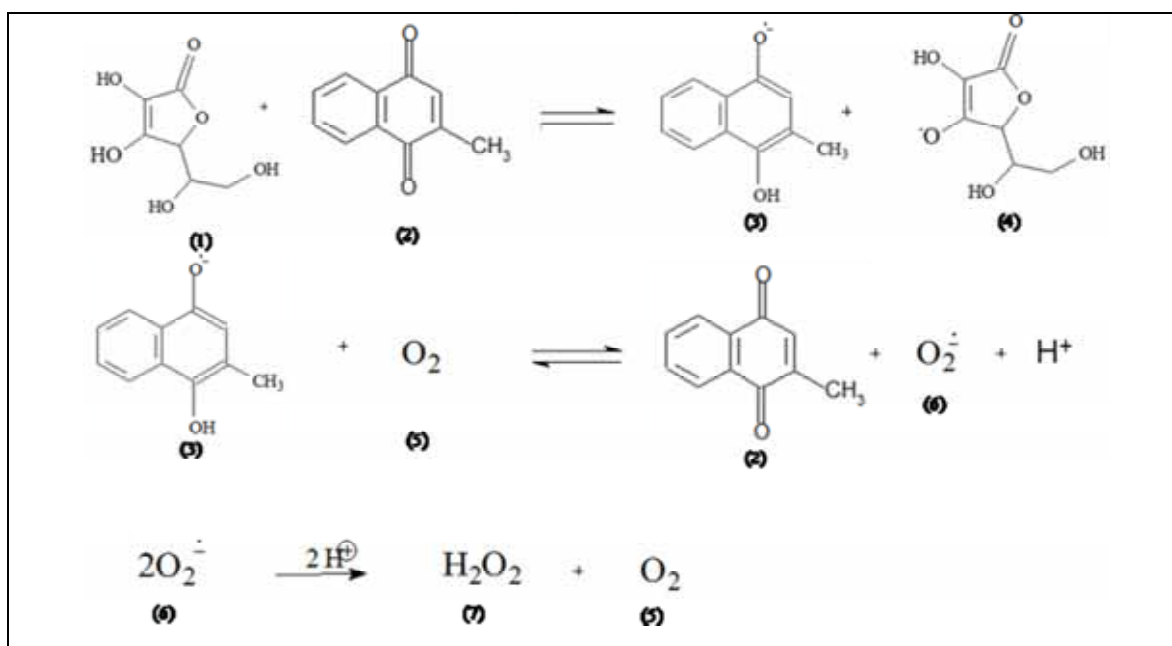


Figura 5. Ciclo de oxidação-redução que ocorre com a associação entre ácido ascórbico e a menadiona: (1) ácido ascórbico (AA ou VC), (2) naftoquinona, (3) naftosemiquinona, (4) semideidroascorbato, (5) oxigênio molecular, (6) ânion superóxido e (7) peróxido de hidrogênio.

O que muito se tem explorado nesta associação é a maior vulnerabilidade de células cancerígenas em comparação com as células normais na presença de ascorbato e menadiona juntos (ZHANG et al., 2001; VERRAX et al., 2005). Isto se deve pelo aumento do estresse oxidativo tanto pelo aumento de EROs como também deficiência de moléculas antioxidantes (VENUGOPAL et al., 1996) como o glutathiona (γ -glutamilcisteinilglicina ou GSH) e também moléculas de adenosina trifosfato (ATP), que tem demonstrado uma deficiência em torno de 70 e 50% respectivamente (VERRAX et al., 2005).

Além da vitamina K₃, estudos já vêm sendo feitos com a associação de outras naftoquinonas com o ácido ascórbico, mostrando sempre a potencialização do ácido ascórbico sobre a naftoquinona (KITAGAWA et al., 2008; CHEN et al., 2012).

O desequilíbrio redox gerado pela associação das vitaminas, além disso, contribui para que algumas características da VC prevaleçam potencializando o efeito por outros caminhos.

A vitamina C é um micronutriente hidrossolúvel essencial ao metabolismo das células vivas, com inúmeras propriedades fisiológicas é de grande preocupação para humanos e primatas, já que nós não a sintetizamos como outros animais, portanto, devemos obtê-la através da alimentação. Esta vitamina está presente no organismo em duas formas predominantes, a reduzida e a oxidada (Figura 6). Dentre outras funções que a vitamina C pode desempenhar está a de antioxidante, principalmente quando se fala da forma reduzida, onde esta irá neutralizar radicais livres, promovendo assim, uma ação anticancerígena. Contudo, esta atua também como pró-oxidante, contribuindo para a formação de EROs (DUARTE; LUNEC, 2005).

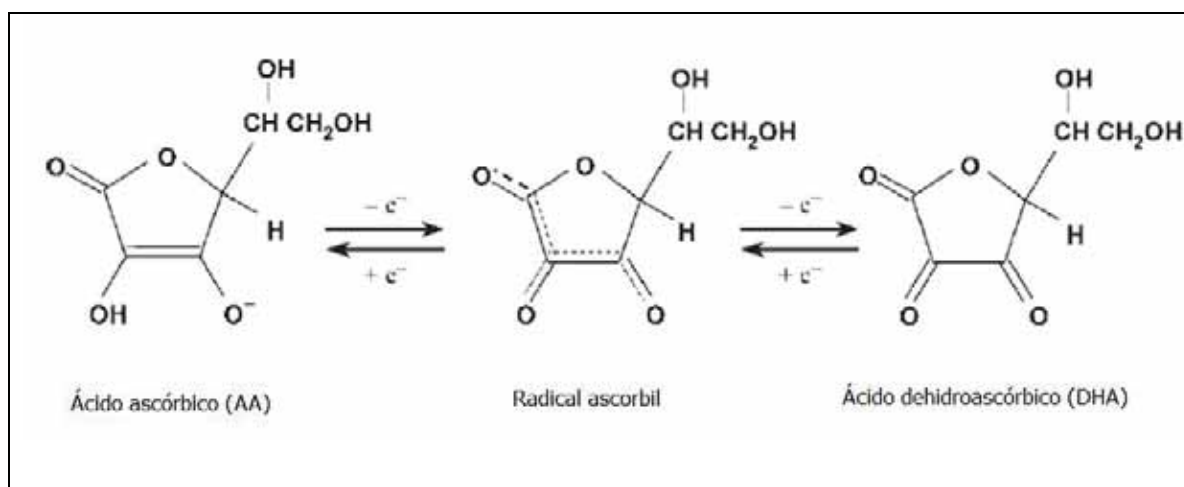


Figura 6. Metabolismo redox da vitamina C. A oxidação de um elétron do ácido ascórbico (AA) gera o radical ascorbil, a ocorrência de mais uma oxidação dá origem ao ácido dehidroascorbato (DHA). Modificado Duarte e Lunec (2005).

Cameron e Pauling, (1976, 1978) reportaram uma melhora em pacientes portadores de câncer por administração de vitamina C 10g/dia tanto intravenosamente, por 10 dias, quanto oralmente, por um período mais prolongado. Estudo realizado por Padayatty et al, (2004), onde o objetivo principal era a compreensão da farmacocinética do ácido ascórbico, demonstrou a importância da via intravenosa para o sucesso de um possível tratamento contra o câncer com altos níveis plasmáticos da vitamina C, em comparação com a via oral, mostrando, assim, o interesse de autores pela possível ação do ácido ascórbico contra células malignas.

O nível sérico do ácido ascórbico pode chegar a 50-100 μM . Com este aumento, poderá acontecer também uma melhora dos níveis intracelulares, mas não de forma dose-dependente, por conta de saturação, sendo estes níveis modificados dependendo da dieta, suplementação (DUARTE; LUNEC, 2005) ou estado patológico, isto porque, há alguns anos foi demonstrado que pacientes portadores de alguma neoplasia possuíam baixas reservas de ascorbato, que foi explicado pelo estado avançado da doença. Hoje é aceito que este baixo nível é por conta da alta utilização desta vitamina por células com algum tipo de desordem seja ela um câncer, inflamação (BARTON; ROATH, 1976) ou processos traumáticos como em cirurgias (CRANDON; MIKAL; LANDEAU, 1953, 1961).

Em contrapartida, uma revisão sobre o ácido ascórbico, Camaron; Pouling e Leibovitz, (1979), trazem várias referências de autores que em suas pesquisas demonstram uma maior concentração de ascorbato em células cancerosas e uma depleção presente em tecido normal.

Concordando com estes dados, Bodansky; Wroblewski e Makardt, (1951) e Loyd et al, (1972), Langemann et al, (1989) mostram que o ascorbato é tomado principalmente por células cancerígenas em comparação a células normais.

O transporte celular da vitamina C pode ocorrer por dois mecanismos distintos. O ácido ascórbico entra nas células por meio de uma família de proteínas transportadoras a qual depende do gradiente de concentração de sódio (Na^+) (SVCT1 e SVCT2) (TSUKAGUCHI et al., 1999). Mais rápido do que a forma reduzida, a forma oxidada DHA é transportada para dentro das células por difusão facilitada por várias isoformas do transportador de glicose. Agus; Vera e Golde, (1999) propõem que a Vitamina C é melhor captada por células cancerígenas depois de ser oxidada a ácido deidroascorbato no microambiente do tumor pelo ânion superóxido, e assim carregada para a célula cancerígena pelo seu transportador GLUTs (Transporte facilitador de Glicose), onde já

intracelularmente seria reduzida á Vitamina C novamente, processo que promove um acúmulo de ácido ascórbico em milimolar contra um gradiente de concentração.

Tal fato evidencia a necessidade de maior aprofundamento e investigação sobre a captação de vitamina C por células cancerosas, o que provavelmente facilitaria a atuação do ciclo redox entre as duas vitaminas (C e K₃) preferencialmente em células neoplásicas, configurando certa seletividade à terapia.

Alguns passos devem ser percorridos para total elucidação do metabolismo e mecanismo de ação relacionada à terapia de neoplasias, visto que, a menadiona, ou em geral as naftoquinonas, possuem certas características químicas que as tornam instrumento interessante para o estudo e desenvolvimento de novas terapias contra o câncer. Visto isso, destacamos a fundamental importância de se dedicar esforços ao estudo racional de moléculas semelhantes que possam fornecer novos subsídios à terapia contra neoplasias.

2. OBJETIVOS

*“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível,
e de repente você estará fazendo o impossível”
(São Francisco de Assis)*

O objetivo geral do trabalho consiste em estudar a geração de peróxido de hidrogênio por meio da associação naftoquinonas/ácido ascórbico e sua aplicação em modelos de citotoxicidade.

Objetivos específicos:

Estudos químicos e bioquímicos:

- Estudar e comparar naftoquinonas correlatas à menadiona no que diz respeito as suas características químicas em processos redox por meio de sua interação com a vitamina C, entre eles:
 - Avaliação na produção de ânion superóxido;
 - Eficiência na produção de peróxido de hidrogênio;
 - Avaliação do consumo de naftoquinonas;
 - Potencial de redução das naftoquinonas e sua relação com a produção de peróxido de hidrogênio;
 - Eficiência de conjugação das naftoquinonas com glutatona (GSH);
 - Formação de produto de oxidação do GSH, GSSG;
 - Oxidação do NADH durante o ciclo-redox;

Estudos celulares

- Aplicar os pares naftoquinonas/vitamina C mais efetivos como geradores de EROs em modelos celulares buscando:
 - Estudos de citotoxicidade em célula tumoral e normal;
 - Verificação de seletividade em relação às linhagens de células tumoral de mama (MCF-7 BUS) e normal de ovário de hamster chinês (CHO).

3. MATERIAL E MÉTODOS

“Quem conhece a sua ignorância revela a mais profunda sapiência.

Quem ignora a sua ignorância vive na mais profunda ilusão.”

(Lao-Tsé)

3.1. Materiais

3.1.1. Drogas e Reagentes

Ácido ascórbico (vitamina C – VC - AA), 2-metil-1,4-naftoquinona (menadiona ou Vitamina K₃ - VK₃), 2-bromo-1,4-naftoquinona (BrQ), 2-metoxi-1,4-naftoquinona (MQ) e superóxido dismutase (SOD), dimetilsulfoxido (DMSO), orto-ftalaldeído (OPA), N-etilmaleimida (NEM) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St, Louis, MO, USA). Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi preparado por diluição de uma solução concentrada (30%) sua concentração calculada por sua absorção a 240nm ($\epsilon=43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Todos os reagentes utilizados para as soluções tampão e fases móveis foram de grau analítico. Os reagentes utilizados exclusivamente em ensaios com cultura de células serão descritas em seus tópicos específicos.

3.1.2. Linhagens Celulares

Células MCF-7 BUS

A linhagem MCF-7 BUS foi gentilmente cedida pela Dra. Marieta Fernandez da Universidade de Granada (Espanha), é derivada de câncer de mama humano e responsiva à estrogênio. A linhagem MCF-7 BUS encontra-se estocada em nitrogênio líquido (-195°C), em alíquotas em torno de 1×10^6 células/mL em uma solução de congelamento composta 50% de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modification of Eagle's médium* - Sigma-Aldrich), 40% de soro bovino fetal (Gibco) e 10% de DMSO.

Células CHO

A linhagem CHO foi gentilmente cedida pela Dra. Catarina Takahashi do laboratório de citogenética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Estas células derivadas de ovário de hamster chinês– (Chinese hamster ovary - CHO)

3.1.2.1. Meio de cultura e reagentes

Para ambas as linhagens celulares foi utilizado o meio DMEM, o qual foi preparado utilizando: DMEM, tampão NaHCO₃, HEPES, suspensão de antibiótico e antimicótico (100x) 10 mL em 1 L de água destilada. Foi preparado também uma versão do meio sem vermelho de fenol para o momento da realização das reações no ensaio de citotoxicidade.

O pH foi ajustado a pH a 7,2 a 7,4, com ácido clorídrico 1N (88,2% v/v) ácido clorídrico em água destilada) ou hidróxido de sódio 1N (4% m/v) hidróxido de sódio em água destilada). O meio de cultura foi esterilizado em sistema de filtração à vácuo, com membrana de poros de 0,22 µm de diâmetro (Corning Incorporated, Acton MA, USA) e aliquotado para ser estocado sob congelamento (-20°C) até o momento de uso. Para a sua utilização foi acrescido a este meio 10% de soro fetal bovino (Nutricell).

O preparo do PBS para a utilização no meio de cultura foi feita a mistura dos sais: NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ para 1 L de água destilada, com ajuste de pH para 7,2 a 7,4. Após isso o PBS foi aliquotado e autoclavado (121°C, 15 minutos). As alíquotas que não estavam sendo usadas foram preservadas congeladas (-20°C) até o momento de uso.

3.2. Métodos

3.2.1. Estudos químicos e bioquímicos

3.2.1.1. Monitoramento do consumo de oxigênio (O₂)

O consumo de oxigênio molecular durante a reação foi monitorado usando o aparelho YSI 5300A Oxygen Monitor (Yellow Spring USA). O meio de reação foi constituído por ácido ascórbico 500 µM e naftoquinona 10 µM em Salina Tampão Fosfato (PBS) 10 mM, pH 7,4 a 37°C. Antes de iniciar a reação, o meio contendo PBS e naftoquinonas foi estabilizado para atingir saturação de oxigênio, desta forma, a reação foi disparada pela adição de ácido ascórbico e o consumo foi monitorado por 60 segundos a 37°C. Os controles foram realizados com as drogas na forma isolada.

3.2.1.2. Monitoramento da formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A produção de H₂O₂ foi monitorada usando um detector amperométrico com sensor específico para H₂O₂ (TBR 4100, World Precision Instruments, USA). Inicialmente, o aparelho foi calibrado com padrões de H₂O₂ nas concentrações entre 17,4 a 226,2 µM. As reações foram realizadas com ácido ascórbico 500 µM e depois de alguns segundos adicionado das naftoquinonas 10 µM em PBS 10 mM, pH 7,4 a 37°C. Para a comprovação da ausência de H₂O₂ em solução contendo a adição de somente ácido ascórbico,

adicionamos 20 µL de SOD a 2 mg/mL e para confirmarmos a presença de peróxido foi adicionado 20 µL 3 mg/mL de catalase após 6 minutos de reação.

3.2.1.3. Análise da produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

A geração de ânion superóxido foi monitorado pela adição de 100 µM de citocromo c á mistura de reação contendo 10 µM de naftoquinona e 50 µM de ácido ascórbico em PBS, pH 7,4. O branco para as medidas de absorbância foi constituído de citocromo c e naftoquinonas em PBS. Para este experimento foi utilizado um espectrofotômetro de arranjo de fotodiodos HP8452 (Agilent,USA). A reação foi iniciada pela adição de VC. A reação foi monitorada por 5 minutos com intervalos de leituras de 30 segundos em 550 nm.

3.2.1.4. Avaliação do consumo de naftoquinonas

O consumo de naftoquinona foi monitorado por cromatografia líquida. A mistura de reação foi constituída por naftoquinonas 10 µM e ácido ascórbico 500 ou naftoquinonas 10 µM e GSH (100 µM) em PBS 10 mM, pH 7,4 a 37°C a qual foi incubada por 5 minutos. A concentração remanescente de naftoquinonas foi mensurada por HPLC acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos fixado em 265 nm (Jasco, Easton, MD, USA). A análise cromatográfica foi realizada em modo isocrático em coluna de fase-reversa Luna C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) com fase móvel composta de 0,1% ácido fórmico:metanol (40:60 v/v) e vazão de 1 mL/minuto.

3.2.1.5. Identificação de produto de conjugação ao GSH (Q-SG)

Após a realização da técnica descrita no ponto acima (3.2.1.4), foi realizado a separação do produto de conjugação detectado na reação entre BrQ (10 µM) e GSH (100 µM), este foi coletado e concentrado para análise por injeção direta em espectrômetro de massa operando em modo de íons negativos (LCQ Fleet Armadilha de íons Espectrofotometro de Massas, Thermo Scientific, USA).

3.2.1.6. Avaliação do consumo de GSH e produção de GSSG

A depleção de GSH e produção de GSSG foram medidos usando OPA como um reagente fluorescente para derivação e posterior análise em CLAE foi realizado com adaptações do método previamente descrito com adaptação (KAND'ÁR et al., 2007).

Ensaio para GSH

Após a incubação da mistura de reação composta por naftoquinona (10 μM) e GSH (100 μM) na presença e ausência de ácido ascórbico por 15 minutos, uma alíquota de 50 μL foi removido e adicionado a 500 μL de uma solução de 0,1% EDTA em 0,1 M Na_2HPO_4 pH 8,0. À uma alíquota de 20 μL desta solução adicionou-se 300 μL da solução de 0,1 M Na_2HPO_4 pH 8,0 e 20 μL de uma solução metanólica de OPA(%). A mistura foi incubada à 25 °C por 15 minutos no escuro. Por fim 20 μL desta mistura foi injetado em CLAE.

Ensaio para GSSG

Posteriormente, 200 μL da mesma reação usada para análise de GSH, foram incubadas a 25°C com 200 μL de NEM por 25 minutos na ausência de luz para interagir com o GSH presente na amostra. Na sequência a esta mistura adicionou-se 750 μL de 0,1 M NaOH. O meio alcalino tem por objetivo facilitar a interação entre GSSG e OPA, desta forma, 20 μL desta solução final foi utilizada para análise conforme o procedimento para análise de GSH como descrita anteriormente, mas trocando a solução constituída de 300 mL da solução de 0,1 M Na_2HPO_4 pH 8,0 por 300 μL de 0,1 M NaOH.

Análise em CLAE

As análises foram conduzidas em coluna de fase-reversa Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μm) em modo isocrático. A fase móvel foi constituída por metanol: Na_2HPO_4 25 mM pH 6,0 (15:85 v/v) com vazão de 1 mL/minuto. A detecção foi observada por fluorescência em 350 nm de excitação e 420 nm de emissão.

3.2.1.7. Avaliação do efeito da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) no consumo de ácido ascórbico

A mistura de reação foi composta de 100 μM de NADH, 10 μM de naftoquinona e 50 μM de VC em PBS, pH 7,4. O branco para as medidas de absorbância consistiu de naftoquinonas em PBS. Um espectrofotômetro de arranjo de fotodiodos HP8452 (Agilent, USA) foi utilizado neste experimento para mensurar a variação de absorbância. A reação foi iniciada pela adição de VC. A reação foi monitorada por 10 minutos com intervalos de leituras de 30 segundos. O monitoramento foi realizado através das bandas em 270 nm e 340 nm para VC e oxidação do NADH respectivamente.

3.3. Estudos Celulares

3.3.1. Descongelamento dos estoques celulares

O vial criogênico retirado do nitrogênio líquido permaneceu em temperatura ambiente até que seu conteúdo estivesse completamente descongelado. Este conteúdo foi colocado em um tubo de centrifuga estéril (Corning Incorporated, Acton MA, USA - 15 mL) contendo 5 mL de meio de cultura (DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino) e submetido à centrifugação por 3 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, ao *pellet*, foi acrescentado 2 mL de meio de cultura suplementado. A suspensão celular foi transferida em um frascos de cultura de 25 cm^2 (Corning Incorporated, Acton MA, USA) contendo 5 mL de meio de cultura suplementado, e submetidas às condições padronizadas de incubação (37°C, em atmosfera com 5% de CO_2 e 95% de saturação de umidade).

3.3.2. Preparo das substâncias-teste

Foi preparado uma solução estoque dos compostos (VK₃ e BrQ) de 10 mM em DMSO sendo estes estocadas à 4°C. A partir da solução estoque foram feitas diluições em meio de cultura, DMEM sem vermelho de fenol para a obtenção das concentrações de trabalho: 10, 5 e 2,5 μM .

A concentração máxima de DMSO na cultura celular não excedeu a 0,1%, uma concentração conhecida que não provoca efeito sobre a viabilidade celular (SCHILIRÒ et al., 2011).

A solução de ácido ascórbico foi preparada no momento do ensaio, não havendo solução estoque, na concentração de 10 mM em PBS, este foi filtrado e diluído em meio de cultura, DMEM sem vermelho de fenol, para a obtenção das concentrações de trabalho: 1000, 500 e 250 μ M.

3.3.3. Tripsinização das culturas celulares

Para o início do ensaio foi realizado o processo de tripsinização da cultura celular. Após remoção do meio de cultura, as células foram lavadas usando-se PBS e desprendidas da superfície interna do frasco de cultura utilizando-se 0,5 mL de ATV (solução de tripsina 0,2% + versene 0,2%, Instituto Adolfo Lutz) diluída 1:1 com PBS. Após o desprendimento das células, 1,5 mL de meio de cultura suplementado foi adicionado ao frasco para a inativação do ATV, e assim, homogeneizado. Após a retirada da quantidade necessária de células para o experimento, uma pequena quantidade de células foi, então, colocada em cultivo em novos frascos de cultura de 25 cm² (Corning Incorporated, Acton MA, USA) contendo 5 mL de meio de cultura completo, e submetidas às condições padronizadas de incubação (37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de saturação de umidade) até a preparação da próxima subcultura ou realização de um novo experimento.

3.3.4. Ensaio de citotoxicidade

As células foram tripsinizadas, submetidas à contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) e semeadas em placas de 96 poços (Corning), a uma concentração inicial de 1×10^4 células/ poço, em 200 μ L de meio de cultura. A aderência das células à placa ocorreu durante 24 horas e após esse período, o meio de cultura foi removido. As células foram lavadas com 200 μ L de PBS. Após isso foram distribuídos os grupos em suas respectivas concentrações (controle VC; controle VK₃, controle BrQ; associação VK₃/VC, associação BrQ/VC; controle negativo C-; controle solvente CS e controle positivo C+) (Figura 7).

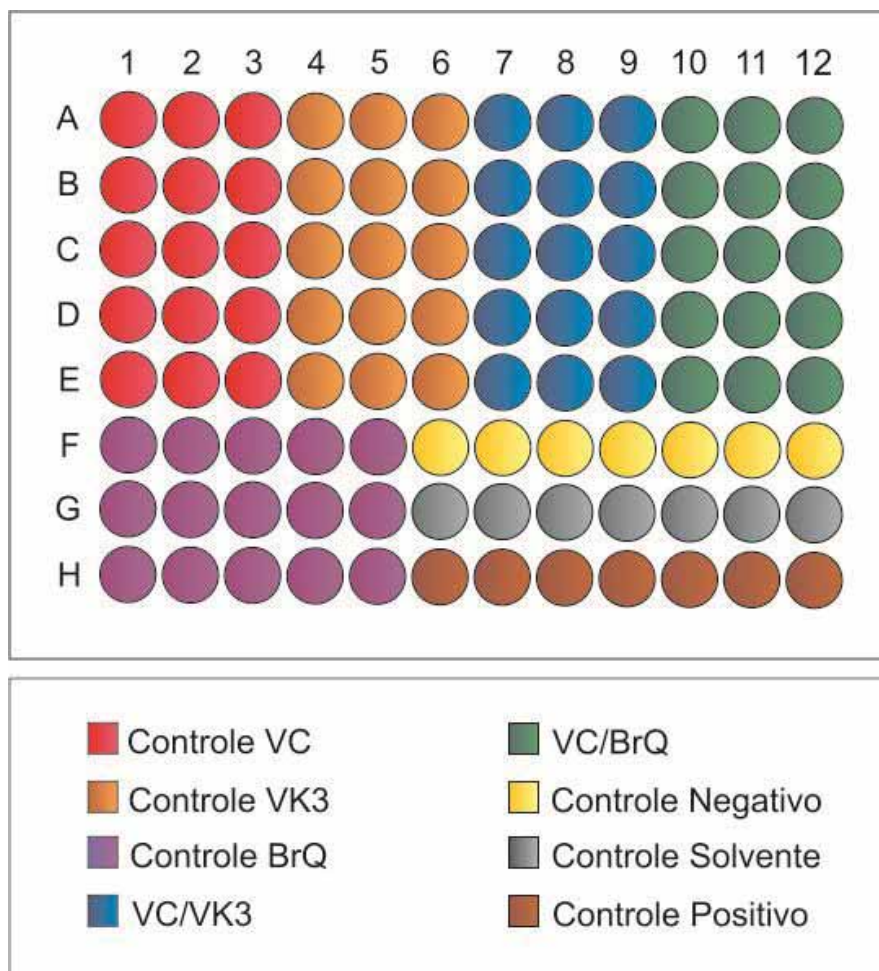


Figura 7. Esquema de organização das unidades experimentais empregadas no teste de microplacas para avaliação de citotoxicidade pelos compostos VC, VK₃ e BrQ e suas associações.

O controle negativo consistiu em meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro bovino para células para ambas as linhagens de células, o controle positivo foi constituído de DMSO 40% e o controle solvente (máximo de 0,1% DMSO), respeitando a diluição dos reagentes). Foram realizados 3 experimentos independentes, com 15 replicatas para cada grupo.

A morte celular foi avaliada após 24 horas de tratamento, usando o ensaio colorimétrico da sulforodamina B (SRB) (SKEHAN et al., 1990, RASMUSSEN; NIELSEN, 2002). Portanto, após 24h, as células foram fixadas com ácido tricloroacético 10% e incubadas a 4 °C por 30 minutos, em seguida, lavadas com água de torneira gelada e tratadas com 200 µL de uma solução de SRB a 0,4% em ácido acético 1%, incubando-se por 30 minutos a 4 °C na ausência de luz. Posteriormente foi realizada a lavagem com ácido acético 1% (quatro vezes) para a retirada do excesso de SRB, a placa foi deixada em

repouso, em temperatura ambiente, para secagem. O corante que liga às proteínas das células foi solubilizado com 200 μ L de Tris base 10 mM (pH = 10,5) durante 30 minutos. Finalmente, a intensidade do corante foi lida em um leitor de microplacas em 492 nm.

3.4. Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram submetidos ao programa estatístico Graph Pad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) à análise de variância ANOVA (assumindo $p < 0,01$) seguida pelo pós-teste de Tukey, para comparação múltipla; pós-teste Danett's para comparação de todos os grupos em relação ao VK₃; teste t de *students* para comparação em pares.

4. RESULTADOS

*“Aquele que obtém uma vitória sobre outros homens é forte,
mas aquele que obtém uma vitória sobre si próprio é poderoso”.*

(Lao-tzé)

As naftoquinonas utilizadas neste presente trabalho estão representadas na figura abaixo (Figura 8).

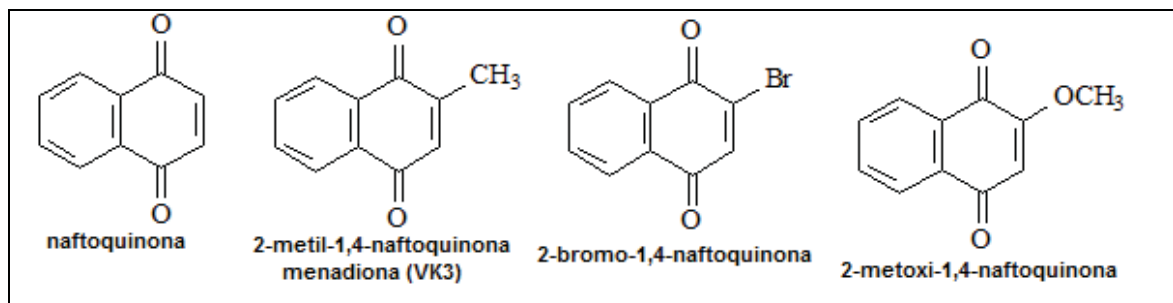


Figura 8. Estrutura básica de uma 1,4-naftoquinona e naftoquinonas relacionadas.

Tal escolha foi baseada no fato de que naftoquinonas têm se mostrado como substâncias de reconhecida atividade citotóxicas (PÉREZ-SACAU et al., 2007). Adiciona-se a isto o fato de que o potencial de redução destes compostos aromáticos são sensíveis a presença de grupos substituintes no anel (MARCH, 2002), assim, poderíamos alterá-lo e, dessa maneira, a capacidade dos mesmos em gerar H₂O₂ quando associado ao ácido ascórbico. Sendo assim, a escolha das naftoquinonas foi realizada tendo como referência a presença dos grupos substituintes

4.1. Ensaios químicos e bioquímicos

4.1.1. Monitoramento do consumo de oxigênio (O₂)

A concentração de ácido ascórbico e naftoquinonas foram escolhidas para confirmar os efeitos catalíticos desta última, sendo tais concentrações na mesma proporção daquela usada na técnica ApatoneTM (TARREN et al., 2008). A presença de um grupo retirador de elétrons (Br-) (Figura 7) na porção da naftoquinona, provocou um significativo aumento no consumo de oxigênio comparado-se à menadiona ou ao derivado metóxi (Figura 9).

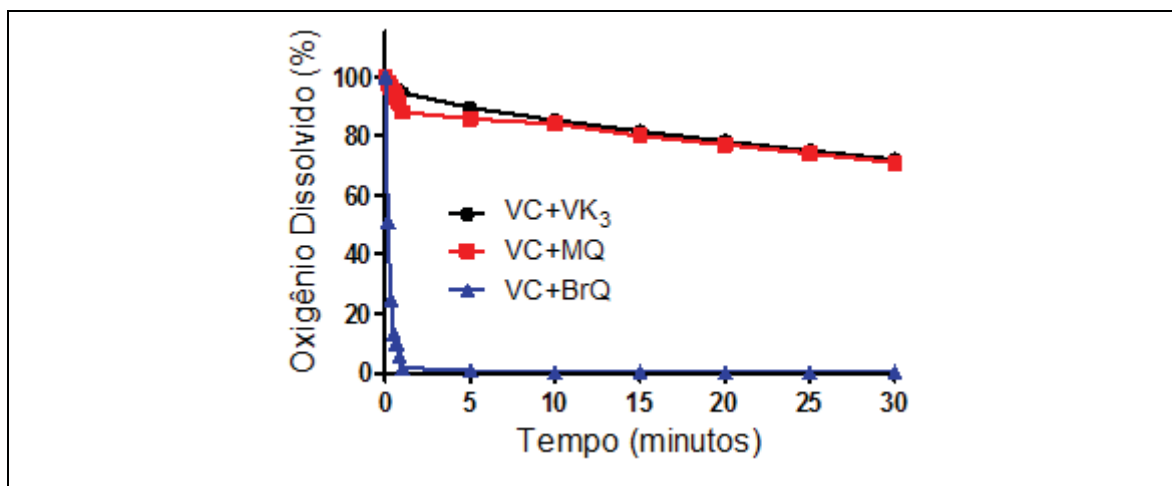


Figura 9. Cinética do consumo de oxigênio dissolvido monitorado por 30 minutos. Mistura de reação foi constituída por naftoquinonas (2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃, 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ ou 2-metoxi-1,4-naftoquinona - MQ - 10 μ M), ácido ascórbico (VC - 500 μ M) em PBS pH 7,4 à 37°C. Barras verticais representam o desvio padrão.

Como pode ser observado na Figura 9, em 30 minutos as reações de VC com as naftoquinonas VK₃ e MQ não apresentaram consumo do O₂ significativo se comparado com BrQ. Os mesmos componentes foram monitorados por um tempo menor com a intenção de entender melhor as diferenças entre as reações (Figura 9). Sendo assim, aproximadamente 75% do oxigênio molecular dissolvido foi consumido dentro de 1 minuto de reação usando BrQ, comparado com somente 5% usando VK₃ ou 7% MQ (Figura 10).

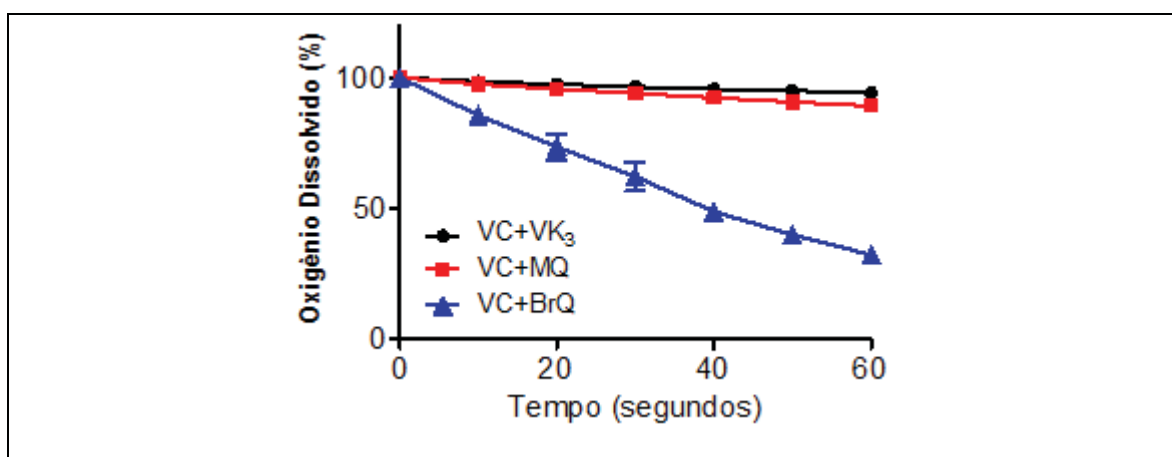


Figura 10. Cinética do consumo de oxigênio dissolvido monitorado por 30 minutos. A mistura de reação foi constituída por naftoquinonas (2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃, 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ ou 2-metoxi-1,4-naftoquinona - MQ - 10 μ M), ácido ascórbico (VC - 500 μ M) em PBS pH 7,4 à 37°C. Barras verticais representam o desvio padrão.

Nestes experimentos, o meio de reação PBS foi equilibrado previamente a 37°C de modo a saturar-se com o oxigênio presente no ar e então o sistema foi fechado com o próprio eletrodo, como mostra a Figura 11. Após adição das naftoquinonas e estabilização do aparelho, o mesmo foi ajustado em seu visor para 100% e a reação disparada pela injeção de VC.



Figura 11. Aparelho YSI 5300A Oxygen Monitor (Yellow Spring USA). (A) O consumo de oxigênio molecular durante a reação constituída por ácido ascórbico 500 μ M e naftoquinona 10 μ M em de tampão PBS 10 mM, pH 7,4 a 37°C. (B) Em detalhe o sistema de reação fechado pelo eletrodo.

Os resultados apresentados na Figura 12 mostram o consumo de oxigênio em função do tempo para todas as combinações de drogas e seus controles.

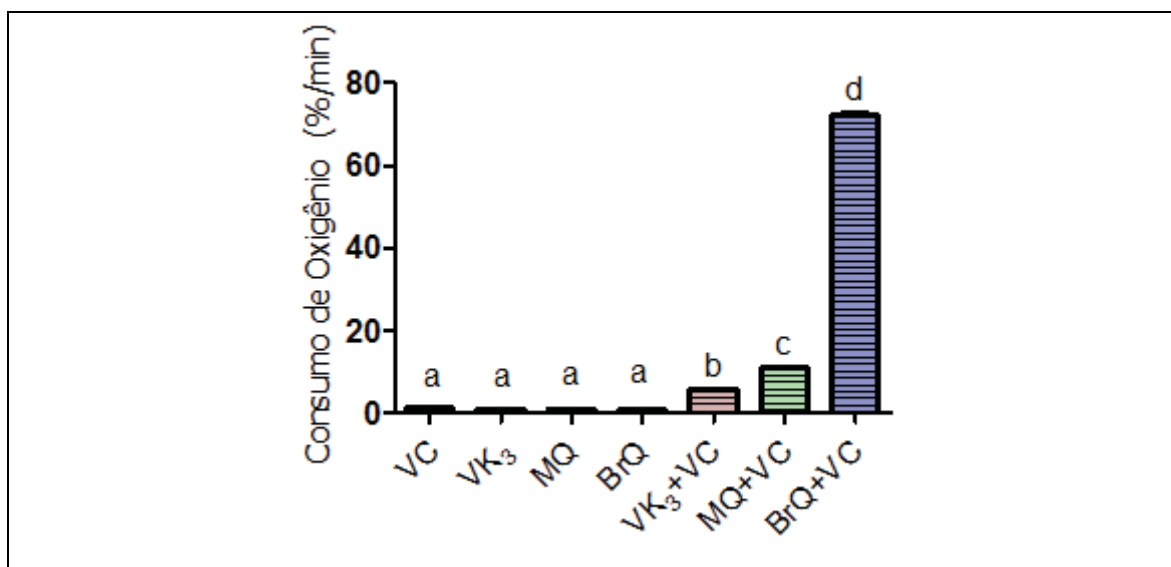


Figura 12. Consumo de oxigênio dissolvido. Proporção de depleção (%/ minuto). Os controles e misturas de reação foram constituídos naftoquinonas (2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃, 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ ou 2-metoxi-1,4-naftoquinona - MQ - 10 μ M), ácido ascórbico (VC - 500 μ M) em PBS pH 7,4 à 37°C. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos diferentes. Barras verticais representam o erro padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$). Teste de variância ANOVA com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

A concentração relativa de 100% de O₂, quando o sistema foi fechado, é equivalente a aproximadamente 200 µM de oxigênio dissolvido em PBS (YSI model 53 Biological Oxygen Monitor). Considerando que somente 10 µM de BrQ foi adicionada à mistura de reação, que este valor é significativamente menor se comparado ao VC (500 µM), e que o consumo de oxigênio de cerca de 140 µM (Tabela 2), fica evidente que BrQ atuou de forma catalítica neste ciclo redox.

Tabela 2. Concentração do consumo de oxigênio dissolvido nos grupos de substâncias isoladas (controle) e associações com naftoquinonas (2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃, 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ ou 2-metoxi-1,4-naftoquinona – MQ (10 µM) e ácido ascórbico -VC (500 µM).

Substâncias isoladas e Associações	Concentração de O ₂ consumido (µM)
VC	2,4±0,6 a
VK ₃	1,7±0,3 a
MQ	1,4±0,4 a
BrQ	1,5±0,3 a
VC/ VK ₃	11,3±0,7 b
VC/MQ	22±2,0 c
VC/BrQ	144±4,0 d
PBS com saturação de O ₂	200

Dados apresentados como média ± desvio padrão.

Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,01). Teste de variância ANOVA com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

A alta eficiência do ciclo redox apresentado pelo composto BrQ em associação ao VC sugere que poderíamos utilizar uma concentração ainda menor dessa naftoquinona, o que poderia ser interessante do ponto de vista de sua eventual toxicidade. Portanto, procuramos encontrar a menor concentração de BrQ que produziria o mesmo resultado observado para o VK₃. A Figura 13 mostra que mesmo em uma concentração 100 vezes menor, BrQ foi tão eficiente quando VK₃ no que diz respeito ao consumo de oxigênio do meio, sendo que exceto para a concentração de 0,1 mM, todas as outras concentrações

utilizadas na reação com BrQ apresentaram significância em comparação com a reação contendo VK₃.

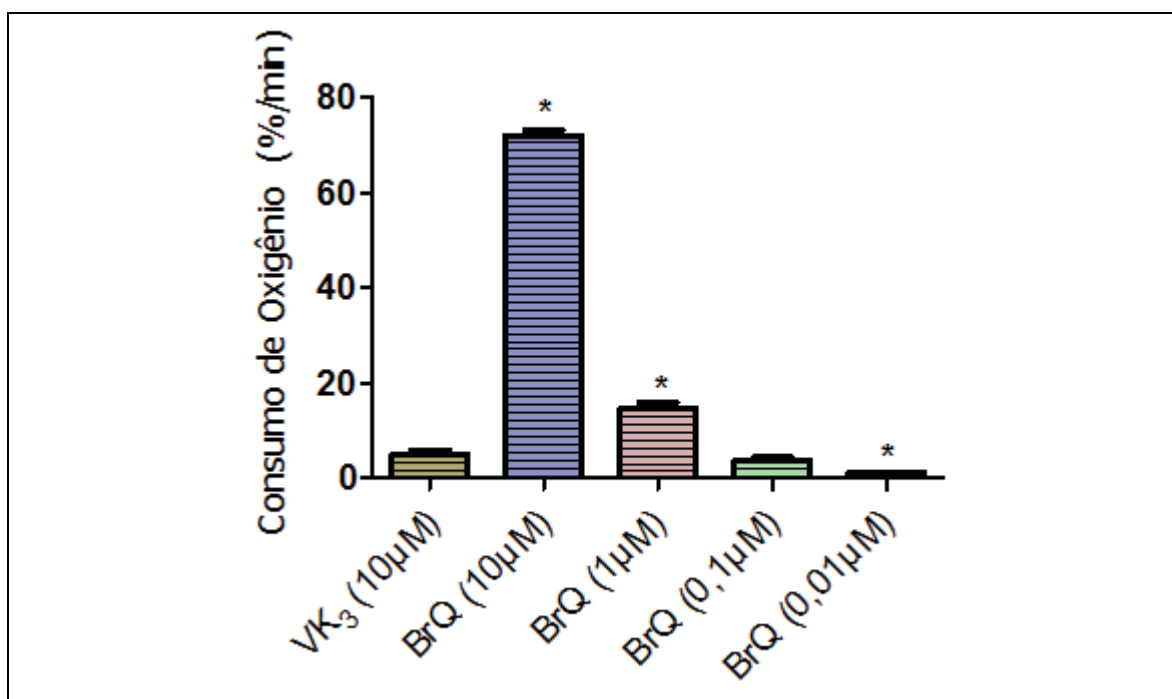


Figura 13. Consumo de oxigênio dissolvido (%/minuto). Efeito de concentrações de 2-bromo,1-4 naftoquinona (BrQ) na depleção de oxigênio em associação com a vitamina C em comparação a reação contendo 2-metil-1,4-naftoquinona (VK₃). A mistura de reação foi constituída VK₃ (10 µM), BrQ (10, 1, 0,1 e 0,01 µM) e vitamina C (VC 500 µM) em PBS pH 7,4 à 37°C. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão.

*diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), teste de variância ANOVA, pós-teste de Danett's com comparação de todas as concentrações de reação de BrQ em relação à VK₃.

Ainda na tentativa de encontrar um composto de maior eficiência, foi realizado um ensaio de consumo de oxigênio com a substituição do ácido ascórbico pela molécula de palmitato de ascorbila (AP) (Figura 14). Sendo este mais lipofílico (KIM et al., 2013), a sua acessibilidade ao meio intracelular poderia aumentar o seu efeito citotóxico.

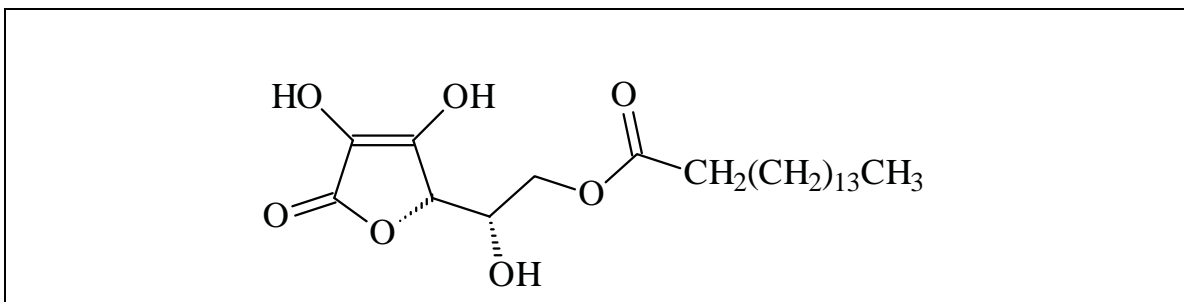


Figura 14. Representação da molécula do Palmitato de ácido ascórbico (AP).

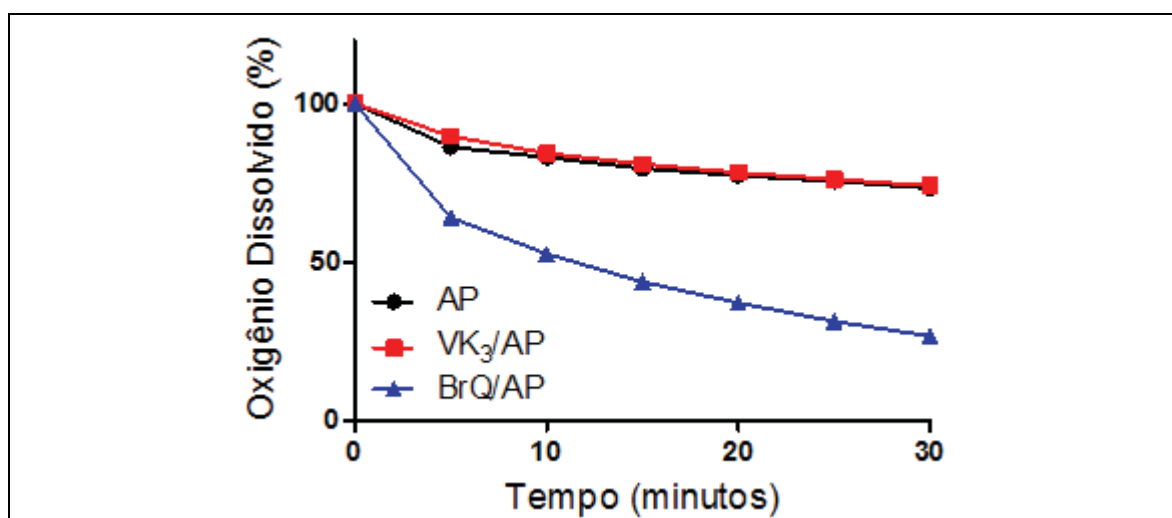


Figura15. Cinética do consumo de oxigênio dissolvido em reação. Palmitato de ascorbila – AP (500 μ M) e naftoquinonas (2-metil-1,4-naftoquinona – VK₃ ou 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ) (10 μ M). Barras verticais representam o desvio padrão.

Os resultados apresentados nas Figuras 15 e 16 mostram que o palmitato de ascorbila, embora também susceptível à oxidação pelas naftoquinonas, não foi também eficiente quanto o próprio ácido ascórbico. Observa-se ainda que BrQ foi a melhor naftoquinona, também neste caso. Como pode ser observado, a associação BrQ/AP apresentou uma depleção de O₂ de aproximadamente 45% (Figura 16). Acreditamos que mesmo sendo a associação menos eficiente do que a associação BrQ/ácido ascórbico, BrQ/AP poderá ser potencialmente útil, visto que a sua maior lipossolubilidade poderia facilitar a associação com a membrana das células tumorais.

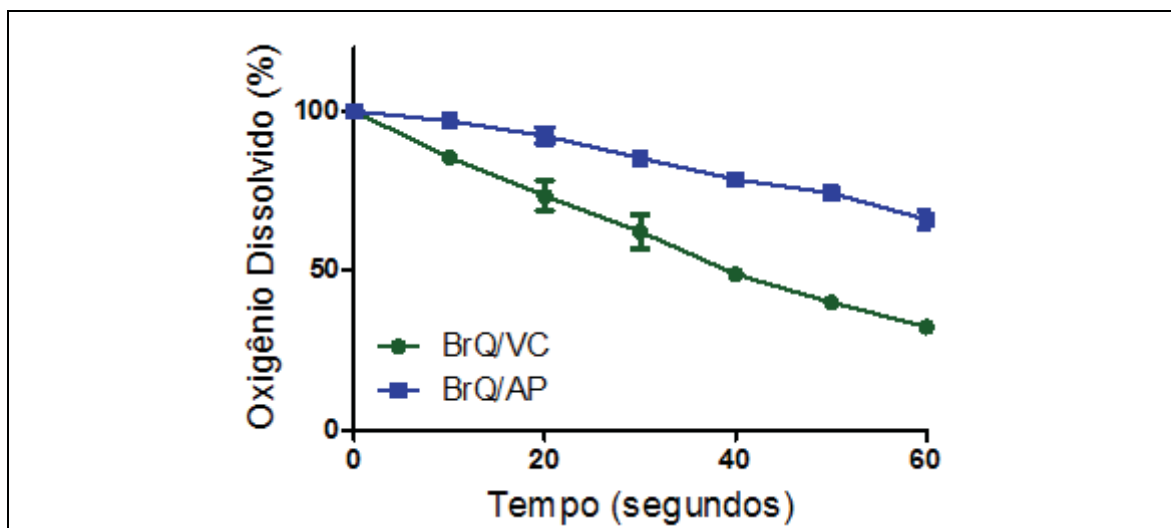


Figura 16. Cinética do consumo de oxigênio dissolvido em reação. Palmitato de ascorbila - AP/2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ em comparação com ácido ascórbico - VC/ BrQ. As reações foram compostas de AP ou VC (500 μ M) e BrQ (10 μ M). Barras verticais representam o desvio padrão.

Considerando que a melhor associação encontrada foi VC/BrQ, escolhemos a mesma para os ensaios posteriores e tendo como referência para comparação o sistema VC/VK₃ por ser amplamente utilizado.

4.1.2. Análise da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Como já mencionado e apresentado na Figura 5, a principal EROs responsável por produzir toxicidade em um ciclo redox é o H₂O₂, isto porque, o ânion superóxido, produto intermediário, não é estável, sendo dismutado à H₂O₂ rapidamente.

Para confirmar e quantificar a produção de H₂O₂ em nosso modelo experimental utilizou-se um detector amperométrico com eletrodo específico para H₂O₂. A oxidação do H₂O₂ na superfície do sensor produz uma pequena corrente em picoampere (pA) a qual é detectada pelo aparelho (Figura 17a). Para isso, o aparelho foi previamente calibrado com soluções padrão de H₂O₂ na faixa de 17,4 μ M à 330.6 μ M, perfazendo um total de 19. Por meio da curva analítica obtida, pA versus concentração de H₂O₂, pode-se quantificar a produção de peróxido de hidrogênio nos ensaios posterior (Figura 17b).

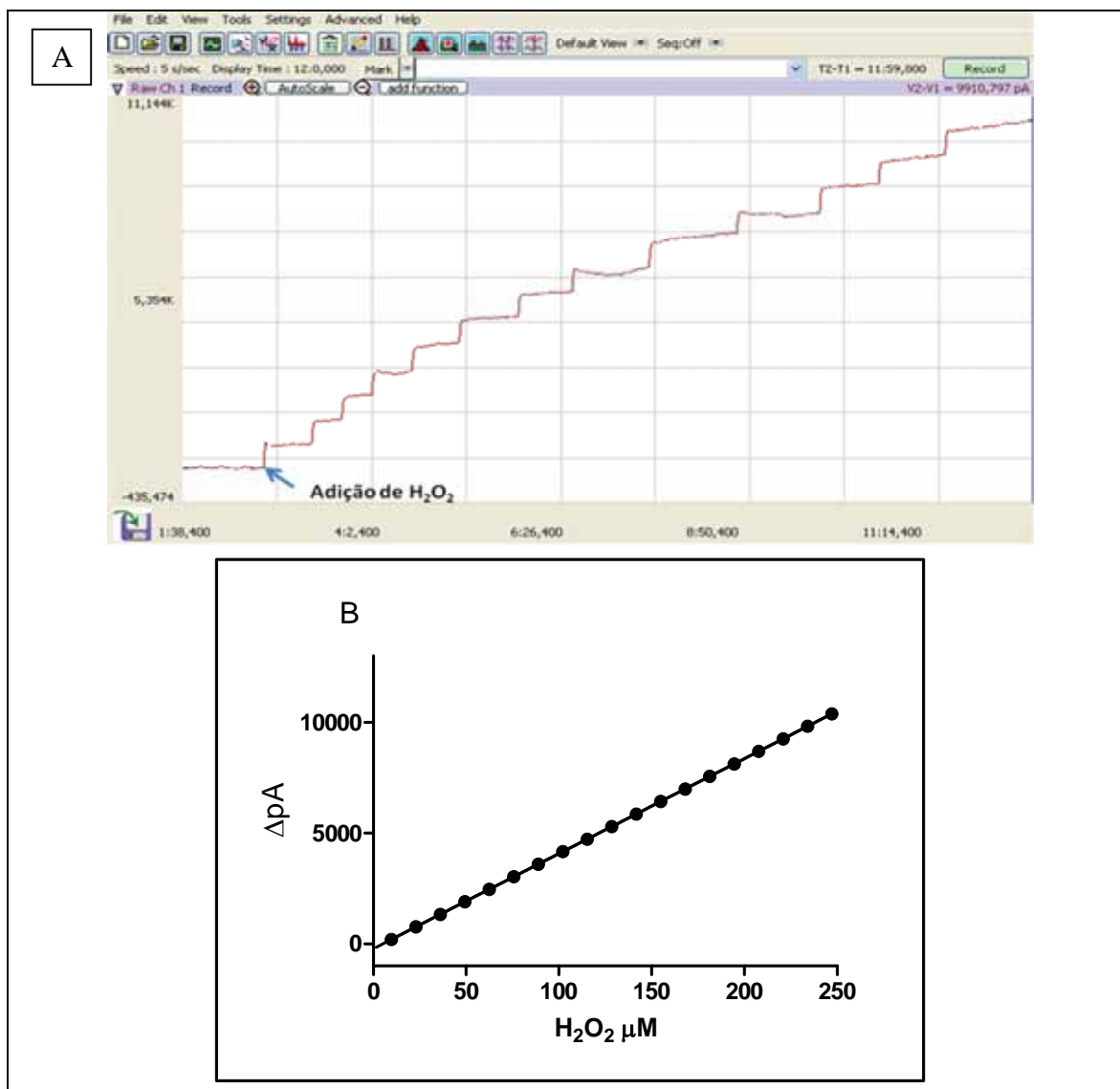


Figura 17. Curva de calibração do aparelho TBR 4100/1025. (A) Imagem retirada do programa vinculado ao aparelho TBR 4100/1025 após o acréscimo das concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), concentrações acrescidas de 17,4 μM. (B) Representação da curva de calibração (r^2 0,999) para a obtenção da concentração real de H₂O₂ presente na solução.

Os resultados mostrados nas figuras 18 e 19 confirmam o maior efeito catalítico da BrQ em comparação à VK₃ e MQ no que diz respeito à produção de H₂O₂. Para a realização deste experimento foi adicionado ao PBS, 500 μM de VC e após estabilização, adicionado as naftoquinonas de interesse. Como pode ser observado, a formação de H₂O₂ inicia-se logo após a adição das naftoquinonas e produziu, depois de 10 minutos, 306,5 μM de H₂O₂ para a mistura de reação contendo BrQ/VC em comparação com 63,4 μM para VK₃/VC (Figura 18 e Tabela 3).

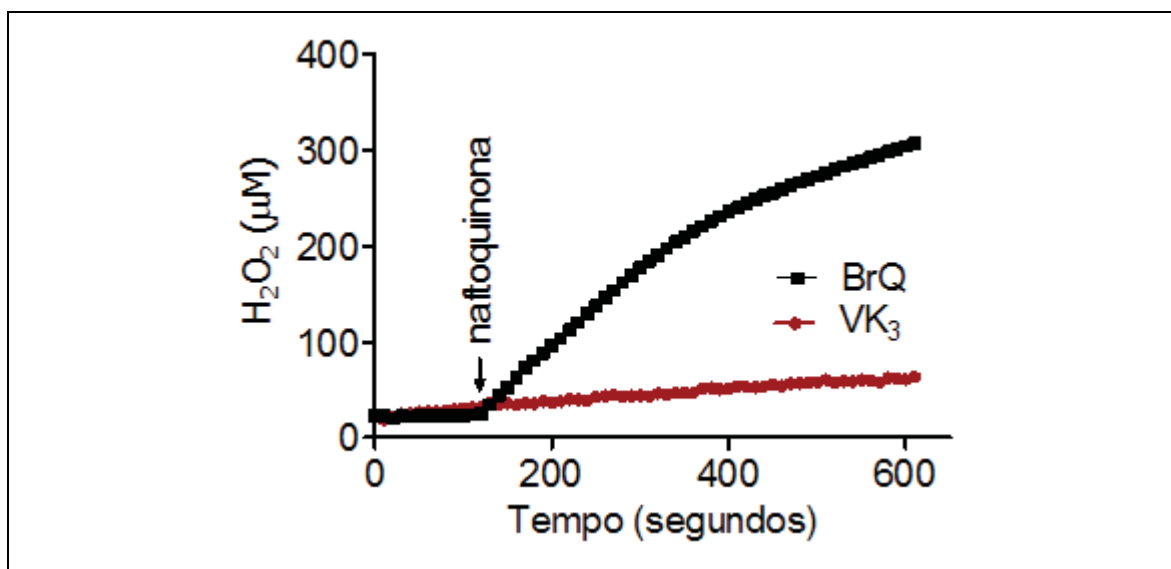


Figura 18. Produção de H₂O₂. Perfil cinético da produção de H₂O₂ durante as reações ciclo-redox. As misturas de reação foram constituídas por 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ ou 2-metil-1,4-naftoquinona -VK₃ (10 μM) e ácido ascórbico - VC (500 μM) em PBS, pH 7,4 à 37°C. Reação monitorada por 600 segundos.

Tabela 3. Produção de H₂O₂ nos grupos de substâncias isoladas (controle) e associações com naftoquinonas (2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃, 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ ou 2-metoxi-1,4-naftoquinona – MQ (10 μM) e ácido ascórbico -VC (500 μM).

Substâncias isoladas e Associações	Produção de H ₂ O ₂ (μM)
VC	Não detectado (0)
VK ₃	Não detectado (0)
MQ	Não detectado (0)
BrQ	Não detectado (0)
VC/ VK ₃	63,4±0,5 a
VC/MQ	35,0±1 a
VC/BrQ	306,5±0,6 b

Dados apresentados como média ± desvio padrão.

Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,01). Teste de variância ANOVA com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

Como não houve produção de H₂O₂ pelos controles, ou seja, as drogas isoladas, na Figura 19 estão representadas apenas as reações com as três naftoquinonas estudadas.

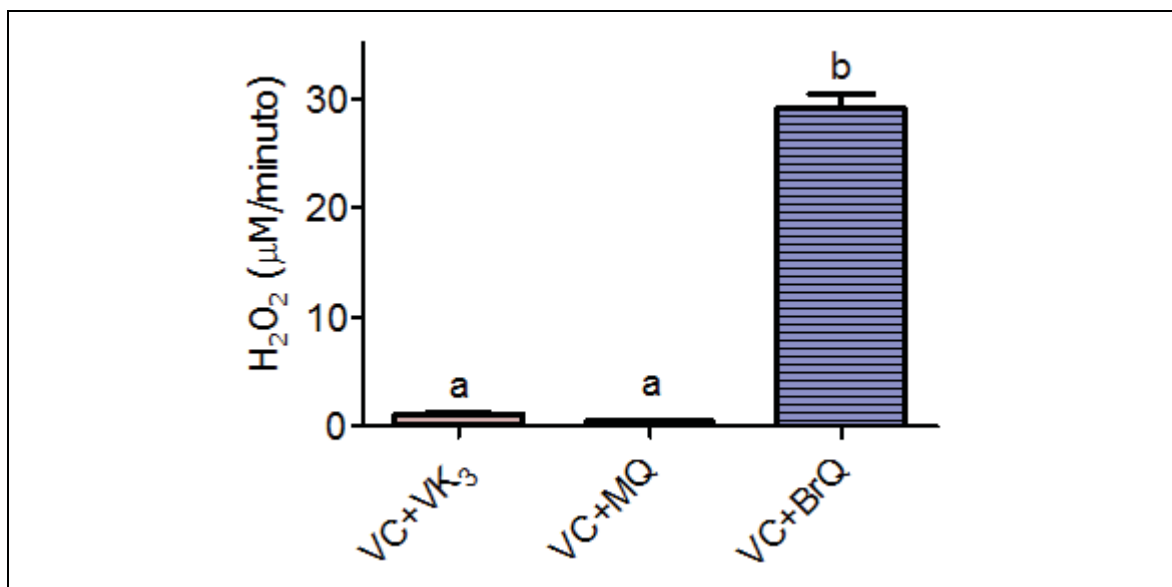


Figura 19. Produção de H₂O₂. Taxa de produção de H₂O₂ (µM/minuto). As reações foram compostas por associação com naftoquinonas (2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃, 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ ou 2-metoxi-1,4-naftoquinona – MQ (10 µM)/ácido ascórbico -VC (500 µM). Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,01), one way ANOVA com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

Com a finalidade de tentar aperfeiçoar ainda mais o processo de produção de H₂O₂, foi estudada também qual concentração de VC seria mais eficiente. Como pode ser observada, a produção de peróxido foi dependente da concentração de VC. Com isso, resolvemos manter a concentração em 500 µM, pois aumentar, além disso, poderia resultar em dificuldades posteriores nos ensaios com células.

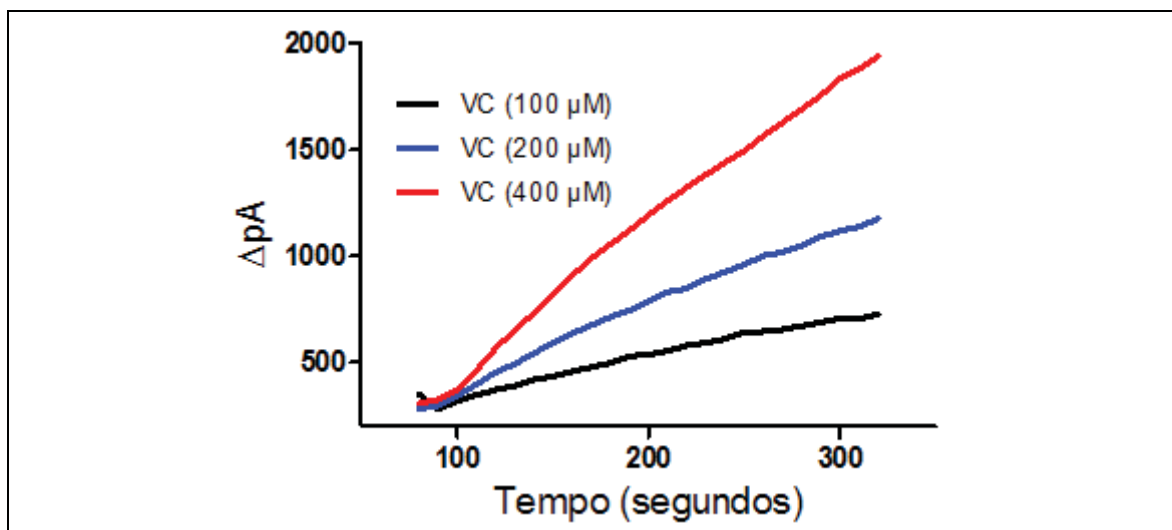


Figura 20. Produção de H_2O_2 . Perfil cinético da produção de H_2O_2 durante as reações ciclo-redox. As misturas de reação foram constituídas por 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ ($10 \mu M$) e ácido ascórbico - VC ($100, 200, 400 \mu M$) em PBS, pH 7,4 à $37^\circ C$. Reação monitorada por 350 segundos.

Apesar de termos usado um sensor específico para H_2O_2 , foi adicionado a enzima catalase ao meio de reação contendo BrQ/VC. A adição de catalase no decorrer da reação (6 minutos), enzima capaz de decompor H_2O_2 (Figura 21), confirmou que o produto de formação realmente era H_2O_2 (Figura 22).

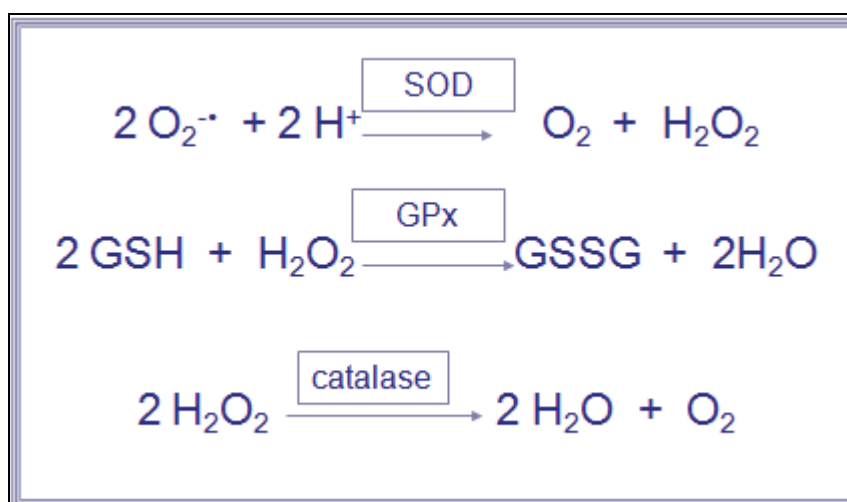


Figura 21. Principais enzimas que biotransformam Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT).

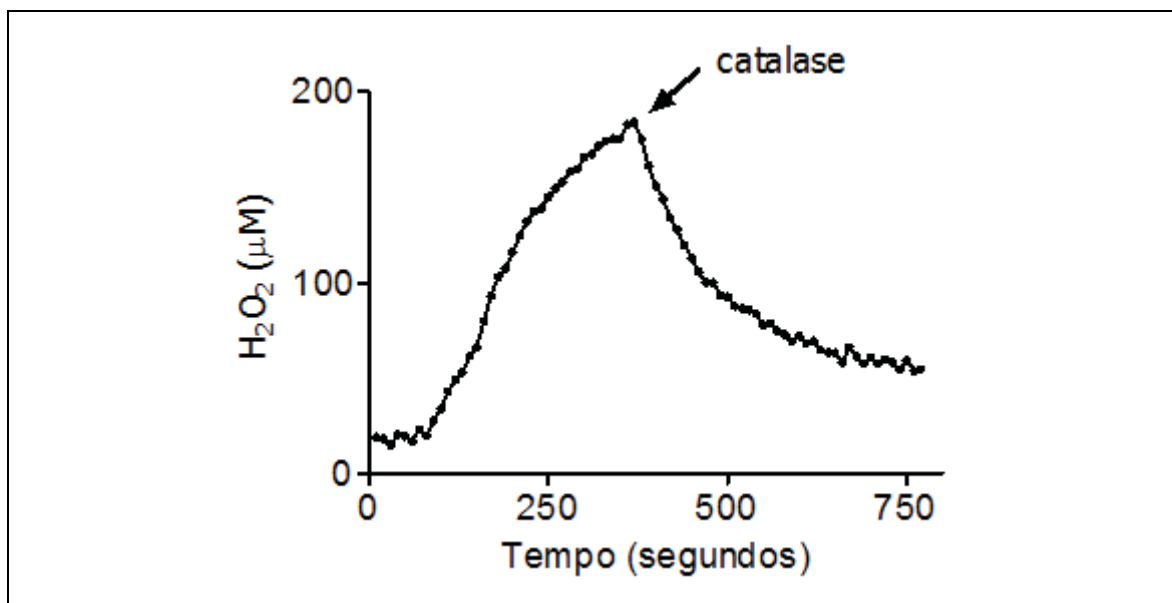


Figura 22. Evidências da formação de H₂O₂ pela catalase. A mistura de reação foi 2-bromo-1,4-naftoquinona (10 µM)/ácido ascórbico -VC (500 µM) e catalase 3 mg/mL.

Como apresentado na Figura 21 a superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que promove a dismutação do radical ânion superóxido e, assim, gera H₂O₂. Portanto, exploramos também o efeito da adição de SOD ao meio de reação. Neste caso não se obteve interferência na velocidade de formação de H₂O₂ pela SOD. Pode-se concluir que a velocidade de formação de H₂O₂ é mais lenta do que a de sua dismutação catalisada pela SOD (Figura 23 A e B). Juntos, tais experimentos demonstraram que o passo determinante para que ocorra o ciclo-redox é a interação entre VC e BrQ.

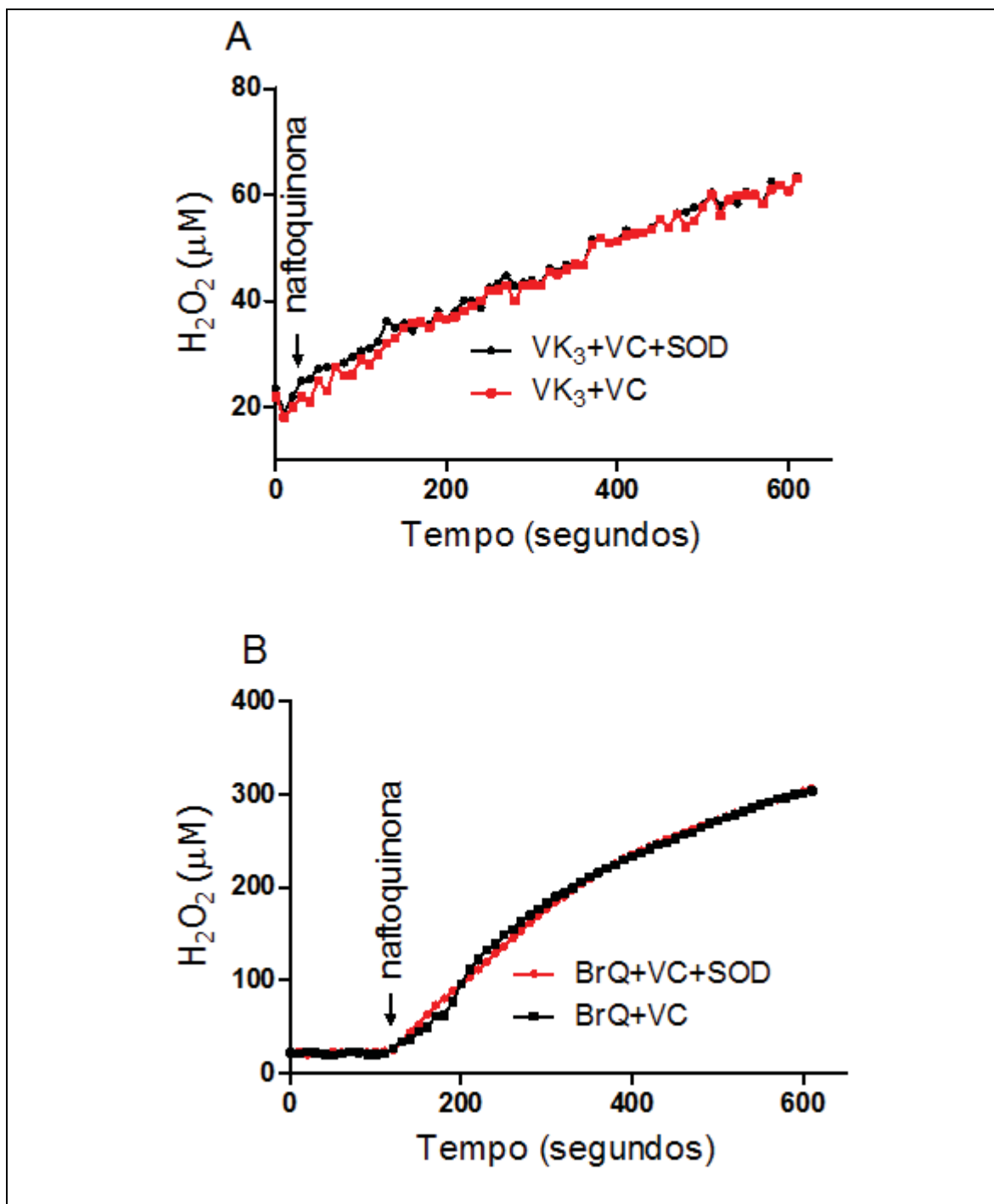


Figura 23. Influência da enzima superóxido dismutase (SOD) na produção de H₂O₂. Perfil cinético da produção de H₂O₂ durante as reações ciclo-redox. (A) 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/ ácido ascórbico - VC. (B) 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ/VC. As misturas de reação foram constituídas por naftoquinonas (10 μM), VC (500 μM) e SOD (2 mg/mL) em PBS, pH 7,4 à 37°C. Reação monitorada por 600 segundos.

Juntos, tais experimentos demonstraram que o passo determinante para que ocorra o ciclo-redox é a interação entre VC e BrQ.

4.1.3. Análise da produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

O consumo de oxigênio é consequência de sua redução a ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Figura 5). Para confirmar esta característica, em nossos estudos utilizamos a proteína citocromo c, a qual é reduzida por ânion radical superóxido levando ao aparecimento de uma banda de absorção em 550 nm, método este muito utilizado e que foi descrito pela primeira vez por McCord e Fridovich em 1969. Os espectros apresentados na Figura 25 confirmam que a formação de ânion superóxido no modelo aqui estudado. Onde a linha mais escura mostra o monitoramento sem a presença da mistura de reação. A partir do momento que a reação é disparada com VC em uma solução contendo a naftoquinona BrQ 10 μ M e citocromo c 100 μ M começa a aparecer uma banda em 550 nm, a qual foi monitorada por 5 minutos.

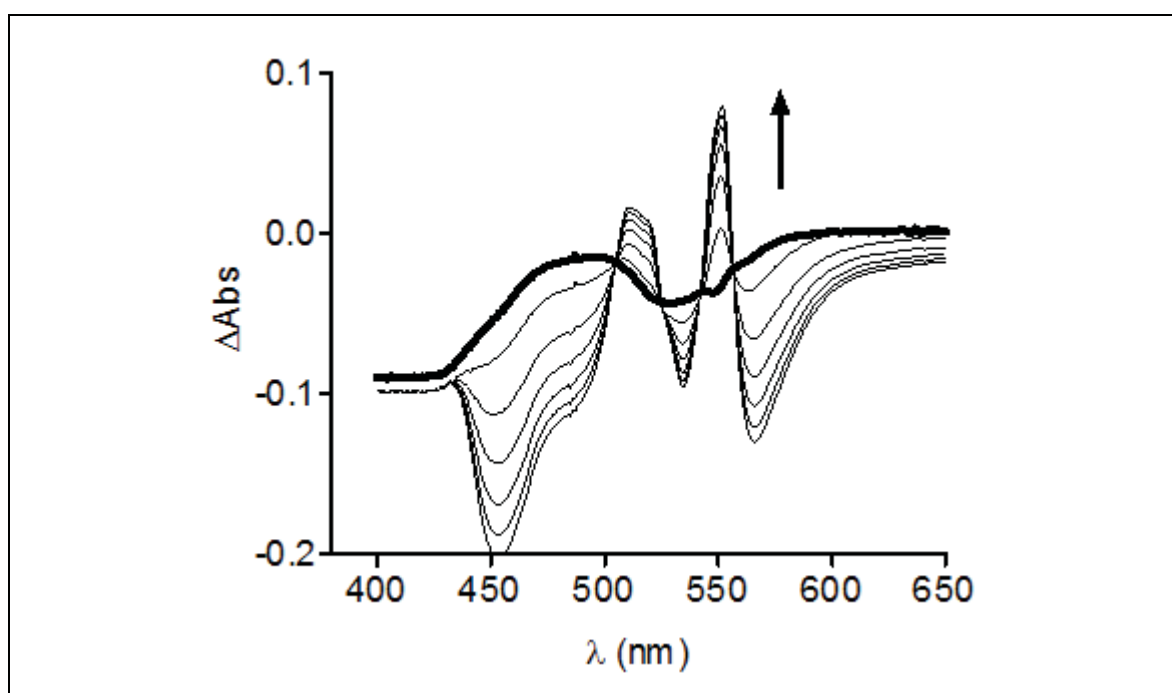


Figura 24. Perfil cinético da redução do citocromo c por radicais ânion superóxido durante a reação de ciclo-redox por 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/vitamina C – VC (10/500 μ M). Concentração de citocromo c foi de (100 μ M) em PBS, pH 7,4 à 37°C. O monitoramento foi realizado por 5 minutos com intervalo de leitura de 30 segundos.

4.1.4. Avaliação do consumo de naftoquinonas

De outro ponto de vista, parte da naftoquinona pode ser transformada em outros produtos, que conseqüentemente, poderia diminuir sua capacidade na produção de EROs. Por esta razão, foi medido o consumo das naftoquinonas estudadas neste trabalho após incubação de reação por 5 minutos. Observamos que a VK₃, em comparação ao controle, foi menos consumida do que a BrQ (Figura 25).

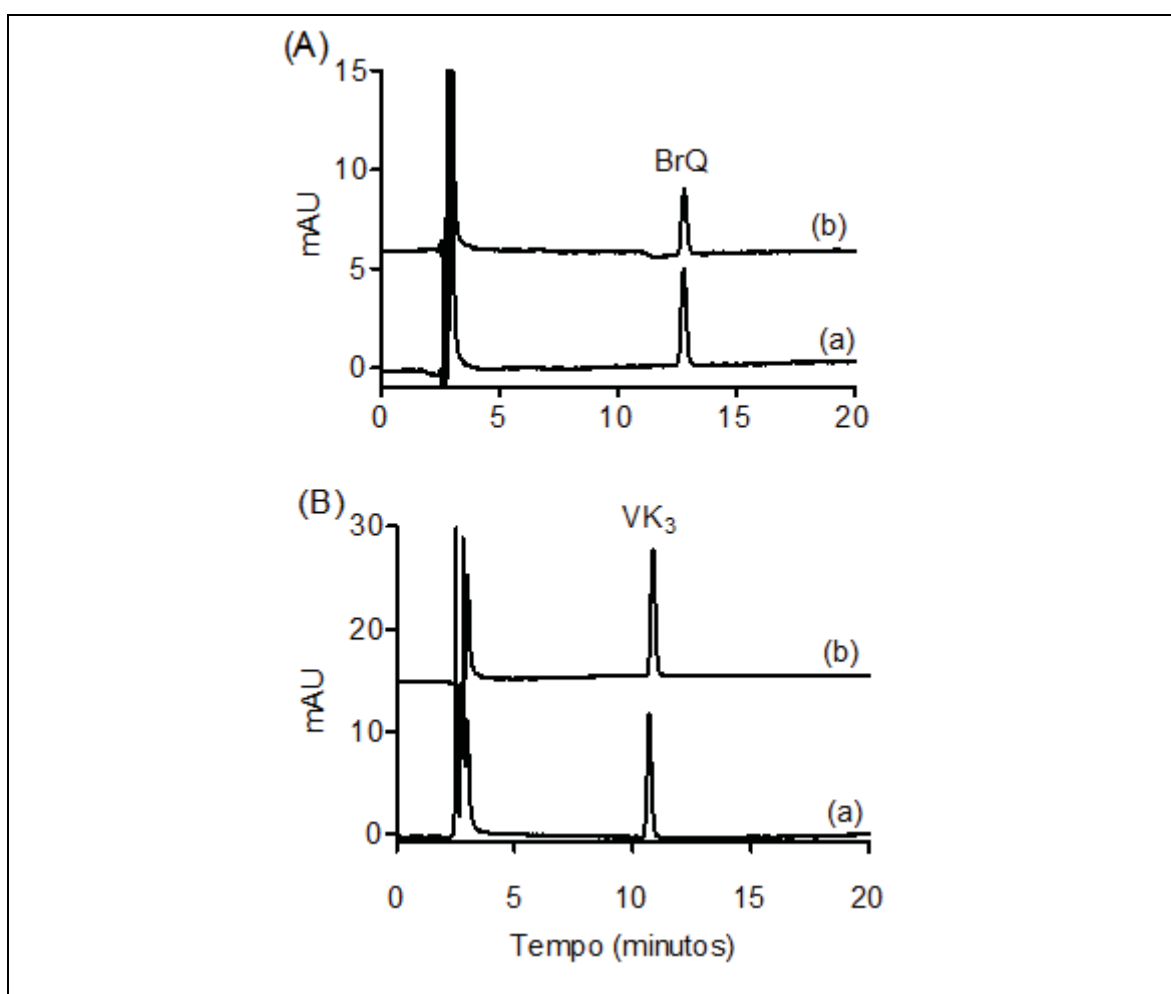


Figura 25. Consumo de naftoquinonas durante a reação de ciclo-redox. (A, a) Padrão 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ; (A, b) reação de BrQ/vitamina C – VC. (B, a) Padrão 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃; (B, b) reação de VK₃/VC. As misturas reacionais foram constituídas por naftoquinonas (10 μ M) e VC (500 μ M) em PBS a 37 ° C e a concentração restante de naftoquinonas medidos após 5 minutos de reação.

4.1.5. Avaliação do consumo de GSH e produção de GSSG

Além de agir como um catalisador e gerar H_2O_2 , a naftoquinona pode ter outros efeitos no meio celular. Ela pode agir como uma molécula eletrofílica capaz de reagir com o antioxidante e nucleofílico GSH. A consequência desta reação seria a depleção da reserva de antioxidante intracelular e formações de seus produtos como o GSSG, forma oxidada do GSH.

Para a comprovação deste fato, foi realizado um experimento onde foi necessário fazer a derivação da reação para que o GSH remanescente ou o GSSG formado pudesse ser identificado por fluorescência. Portanto, neste experimento a reação foi incubada por 15 minutos. Após isso, foi feito a derivação, a qual teve pequenas modificações para a análise, sendo para o GSH utilizado somente o OPA e para GSSG, além do OPA, utilizado o reagente NEM para a depleção de GSH remanescente na reação e posteriormente o uso do OPA, e assim uma alíquota de 20 μ L foi injetada em CLAE (figura 26). A curva de calibração foi obtida pelas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 para o GSH e 200, 100, 50 e 25 para GSSG (Figura 27).

Quando comparamos a reação de VK_3 /GSH e BrQ/GSH não há muita diferença no consumo de GSH (Figura 26, C e E), mas ambos tiveram pequena produção de GSSG, com uma leve diferença para mais com relação ao BrQ (Figura 26, D e F). Ainda fizemos um teste no padrão de GSH para verificar se o padrão não havia sido oxidado com o tempo (Figura 26, A)

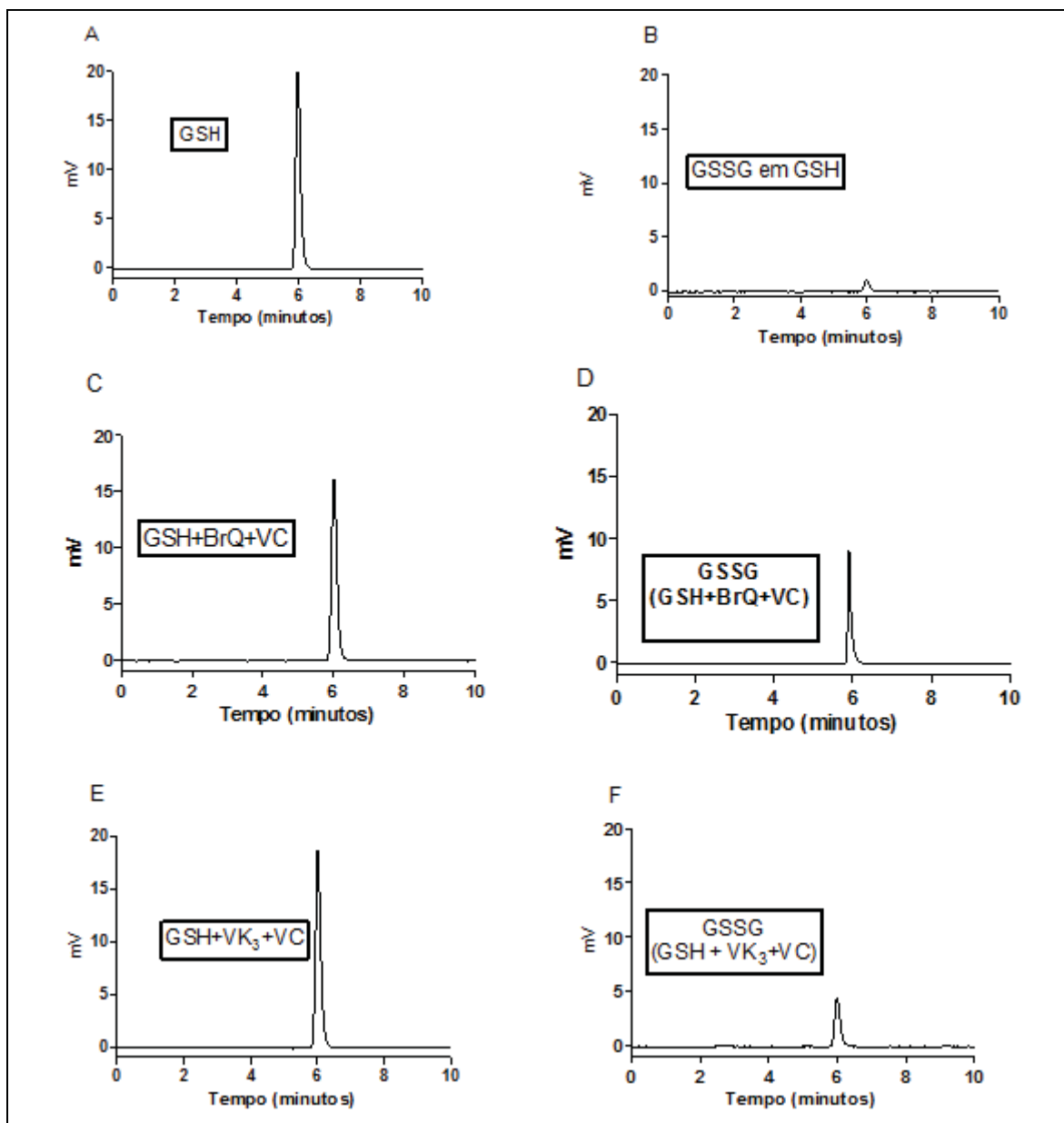


Figura 26. Consumo de GSH e produção de GSSG. (A) Padrão GSH (100 μ M); (B) Presença de GSSG em padrão de GSH; (C) GSH remanescente após reação ciclo-redox: 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/vitamina C - VC; (D) Produção de GSSG após a reação ciclo-redox BrQ/VC; (E) GSH remanescente após reação ciclo-redox: 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/VC; (F) Produção de GSSG após a reação ciclo-redox VK₃/VC. A condição de reação foram naftoquinonas (10 μ M), VC (500 μ M) e GSH (100 μ M) em PBS pH 7,4 a 37 °C. Após 3 min, alíquotas das misturas de reação foram removidas e submetidas a derivação e análise.

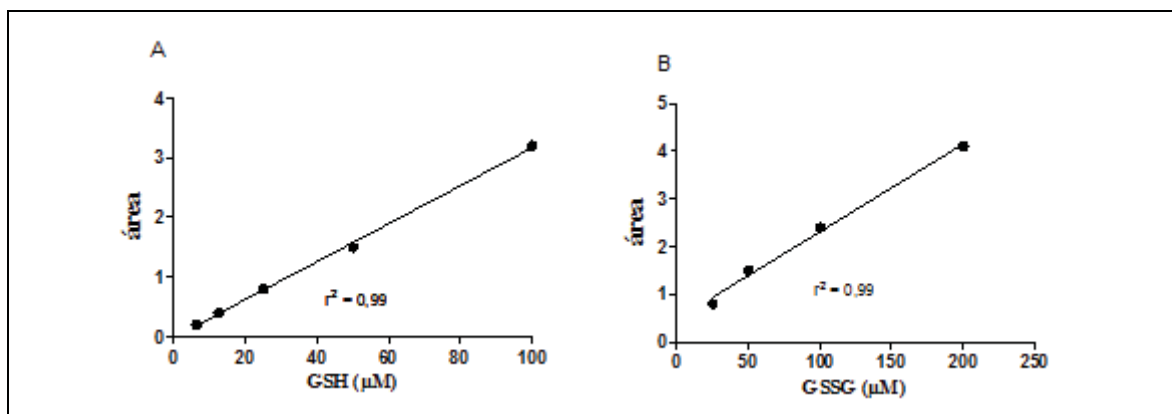


Figura 27. Curva de calibração. (A) GSH (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μM). (B) GSSG (200, 100, 50 e 25 μM) Representação da curva de calibração (r^2 0,99) para a obtenção da concentração real GSH e GSSG presente na solução.

As concentrações encontradas para GSH remanescente na reação foram de aproximadamente 82,5 μM tanto para BrQ quanto para VK₃ e a formação de GSSG foi de 39,3 e 17,5 para BrQ e VK₃ respectivamente.

4.1.6. Identificação de produto de conjugação ao GSH (Q-SG)

Apesar de uma pequena formação do produto de oxidação do GSH (GSSG), o GSH ainda pode formar produtos por conjugação com as moléculas de naftoquinonas. Para tanto, foi realizado um experimento igualmente descrito nos tópicos 3.2.1.4 e 4.1.4. Neste experimento, portanto, houve uma reação entre naftoquinonas e GSH (Figura 28).

Esta possibilidade se confirmou, pois ambos VK₃ e BrQ, reagiram com GSH, mas novamente o BrQ foi mais eficaz, sendo que parte do GSH foi incorporado na naftoquinona, produzindo desta forma, um produto de substituição nucleofílica (Q-SG) (Figura 28, B e D).

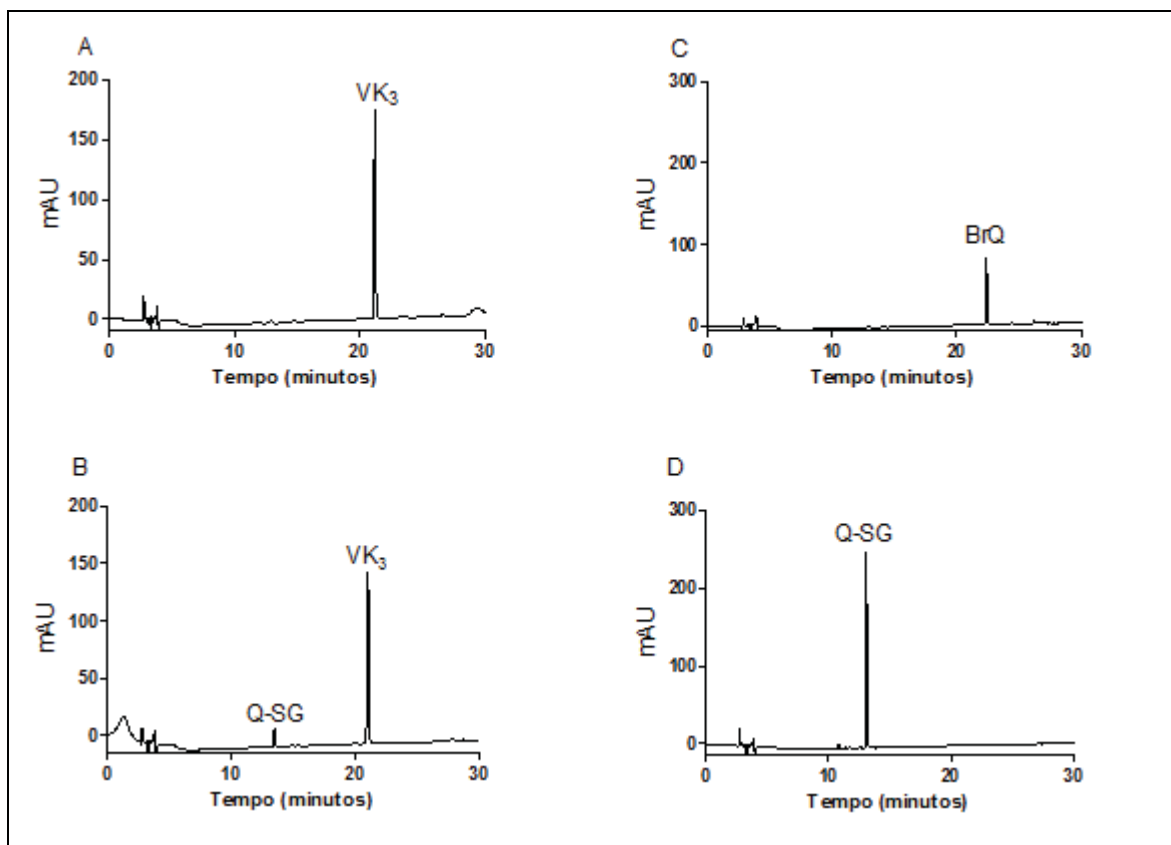


Figura 28. Consumo de naftoquinonas e formação de produto de conjugação com GSH. (A) Padrão 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃. (B) Consumo do VK₃ e produção de produto de conjugação (Q-SG) em reação de VK₃/GSH. (C) Padrão 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ. (D) Consumo do BrQ e produção de Q-SG em reação de BrQ/GSH. As condições de reação foram de (10 μM) para naftoquinonas e (100 μM) para GSH incubado durante 3 minutos em PBS a 37 °C.

Após a constatação da presença de um produto de conjugação, a reação BrQ/GSH foi realizada e uma alíquota injetada novamente e, desta forma, este produto foi coletado e analisado em por injeção direta do produto purificado em CLAE com espectrômetro de massas (Figura 29).

O pico de pseudo íon-molecular $[M - H] = 462.05$ corresponde ao produto gerado pela substituição do átomo bromo na posição 2 da naftoquinona pela ligação ao GSH, conduzindo a Q-SG (MW 463.09). Uma adicional confirmação deste produto foi o fragmento observado a 306.16, o qual corresponde a GS⁻ (Figura 30, B).

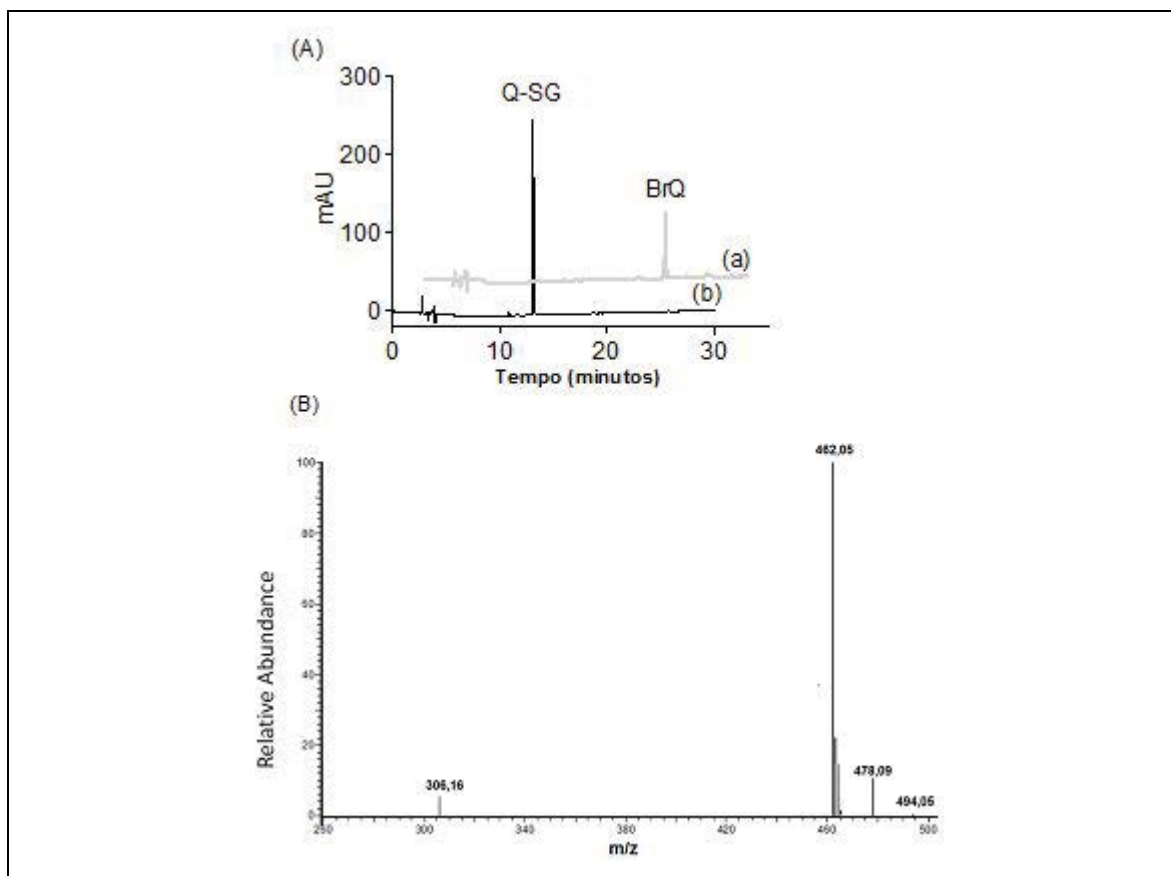


Figura 29. Identificação do produto de conjugação (Q-SG) entre 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ e GSH. (A) Repetição da figura 29 (C e D) (A, a) Padrão BrQ; (A, b) consumo de BrQ e produção de Q-SG. (B) Espectro de Massa de Q-SG. A condição das reações foram para BrQ (10 μ M) e GSH (100 μ M) durante 3 minutos em PBS a 37 °C.

4.1.7. Consumo de oxigênio pelo produto de conjugação GSH/BrQ (Q-SG) na presença de VC

A depleção de GSH ocorreu na presença e na ausência de ácido ascórbico, mas não impediu a ocorrência do ciclo-redox. Considerando-se que o consumo de BrQ por GSH poderia impedir a sua eficácia na geração de EROs, foi testada a capacidade do produto de substituição Q-SG como um catalisador para a produção de EROs na presença de ácido ascórbico. Neste caso, o BrQ e GSH foram incubadas durante 25 minutos para dar tempo para a conversão total a Q-SG. Depois disso, o ácido ascórbico foi adicionado e o consumo de oxigênio foi avaliado. Os resultados apresentados na Figura 30 mostram que a reação do ciclo-redox foi também eficaz usando Q-SG. O método usado foi o mesmo descrito para os ensaios do tópico 3.2.1.1.

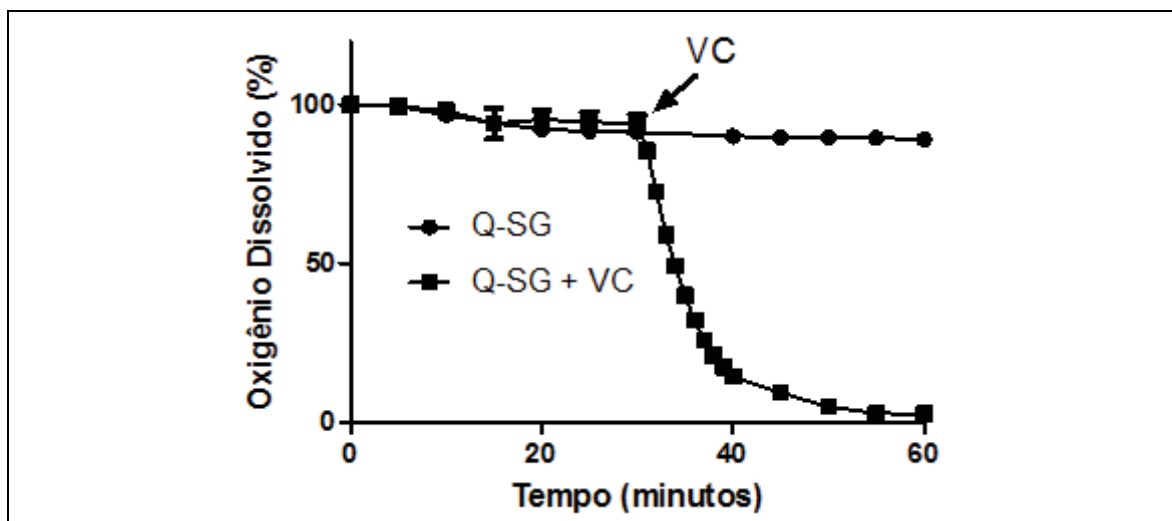


Figura 30. O consumo de oxigênio molecular dissolvido no meio pelo Q-SG. A naftoquinona 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ e GSH foram previamente incubados durante 25 minutos. A condição de reação foi BrQ (10 μ M) e GSH (100 μ M) em PBS pH 7,4 a 37°C. A vitamina C (500 μ M) foi adicionado no tempo indicado (25 minutos). Resultado representativo de três experimentos diferentes.

4.1.8. Avaliação do efeito de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) no consumo de ácido ascórbico

O efeito do NADH na reação ciclo-redox foi estudado para mensurar a proporção do consumo de ácido ascórbico na presença ou ausência desta coenzima reduzida, isto porque, outra propriedade da combinação VK₃/VC é a oxidação da coenzima NADH através da sua interação com o radical ascorbil (BECH et al., 2009) (Figura 31). Portanto foi mensurado esta propriedade com a naftoquinona BrQ somente. Neste caso, monitoramos o consumo de ácido ascórbico e o efeito da adição de NADH (Figura 32 e 33).

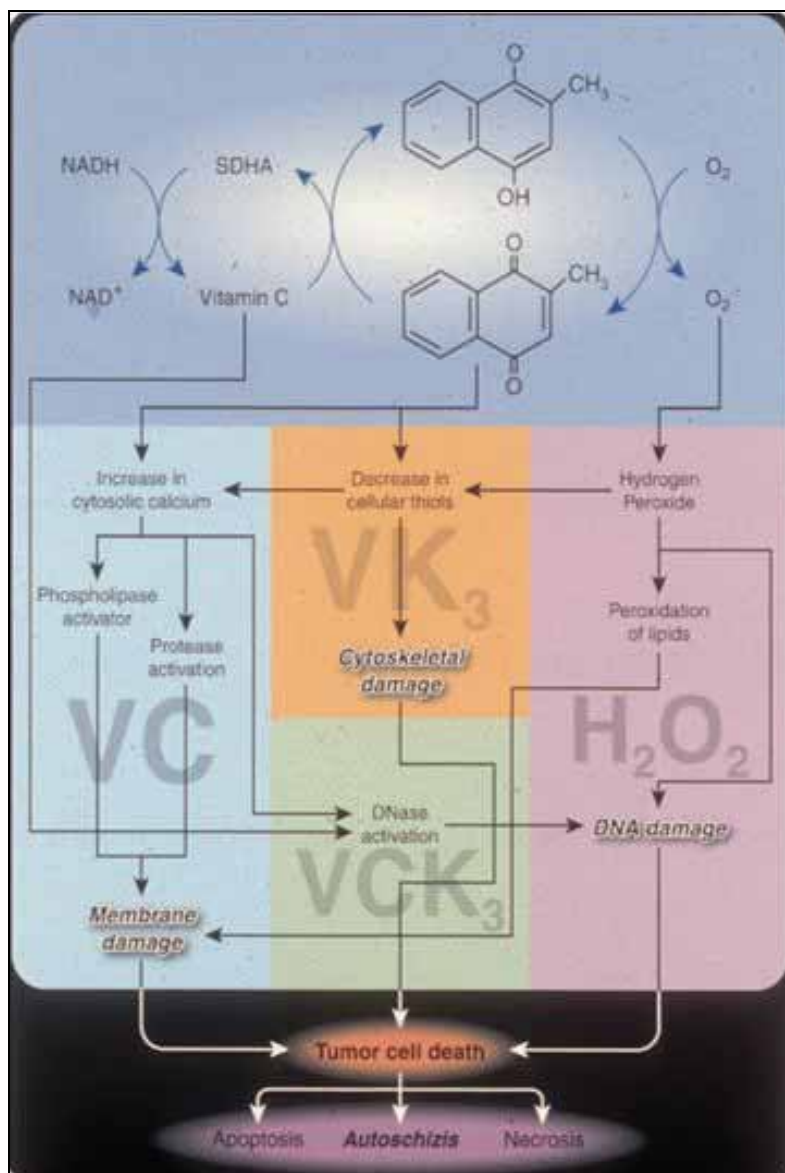


Figura 31. Representação geral do processo bioquímico e de citotoxicidade pelo Apatone® (LIQUID CRYSTAL ISTITUTE, 2008).

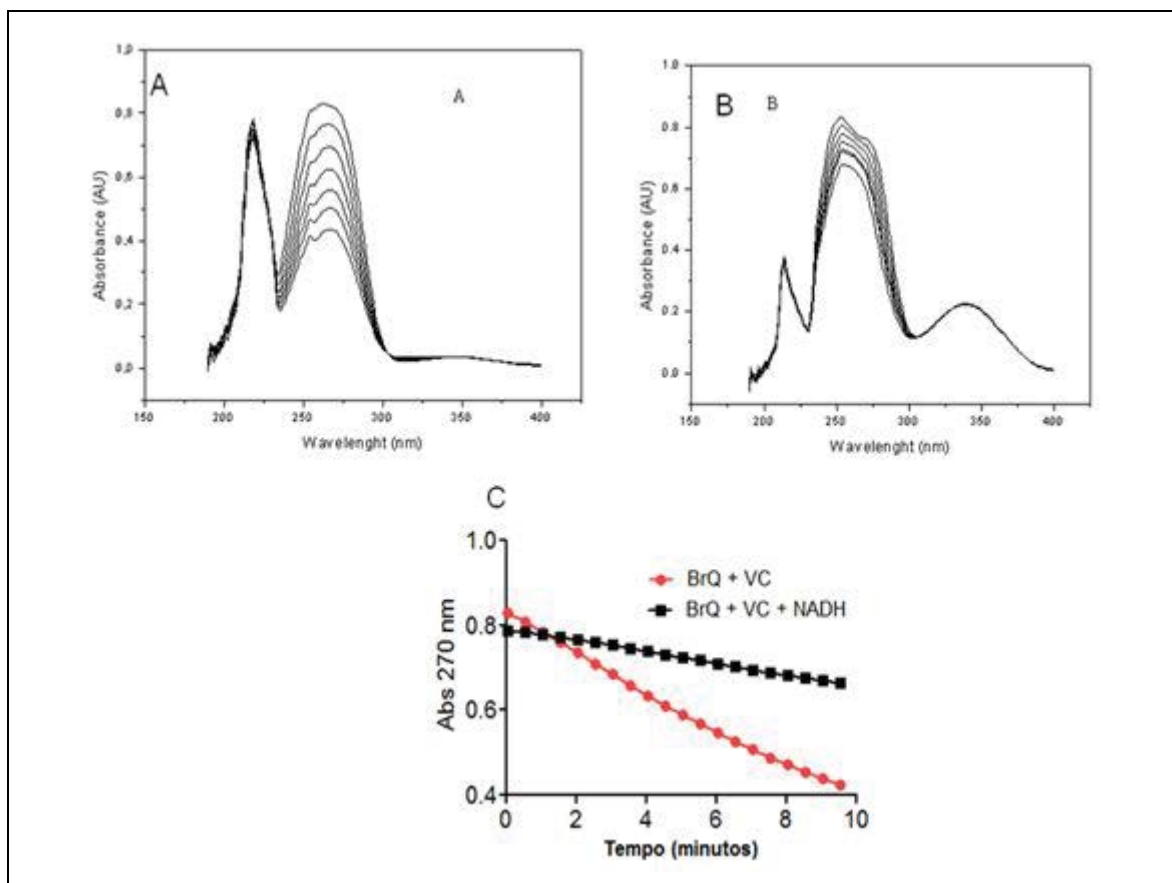


Figura 32. Influência do NADH na reciclagem do ácido ascórbico. (A) Espectro da oxidação do ácido ascórbico - VC com banda em 270 nm, reação composta por 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/VC. (B) Redução da oxidação de VC na presença de NADH, reação composta de BrQ/VC/NADH. (C) Perfil cinético do consumo de VC em reações contendo ou não NADH. As misturas reacionais foram constituídas por BrQ (10 μ M) e VC (500 μ M) em PBS a 37 ° C na presença ou ausência de NADH (100 μ M).

A adição de NADH à reação promoveu a sua oxidação e inibiu a depleção de ácido ascórbico. Mostrando grande eficiência por parte do composto BrQ.

Assim, para concluirmos esta reciclagem, monitoramos a oxidação de NADH monitorando uma banda em 340 nm. O que confirmou a reciclagem quando há presença da coenzima NADH, pois esta foi oxidada apresentando diminuição da banda em 340 nm. (Figura 33).

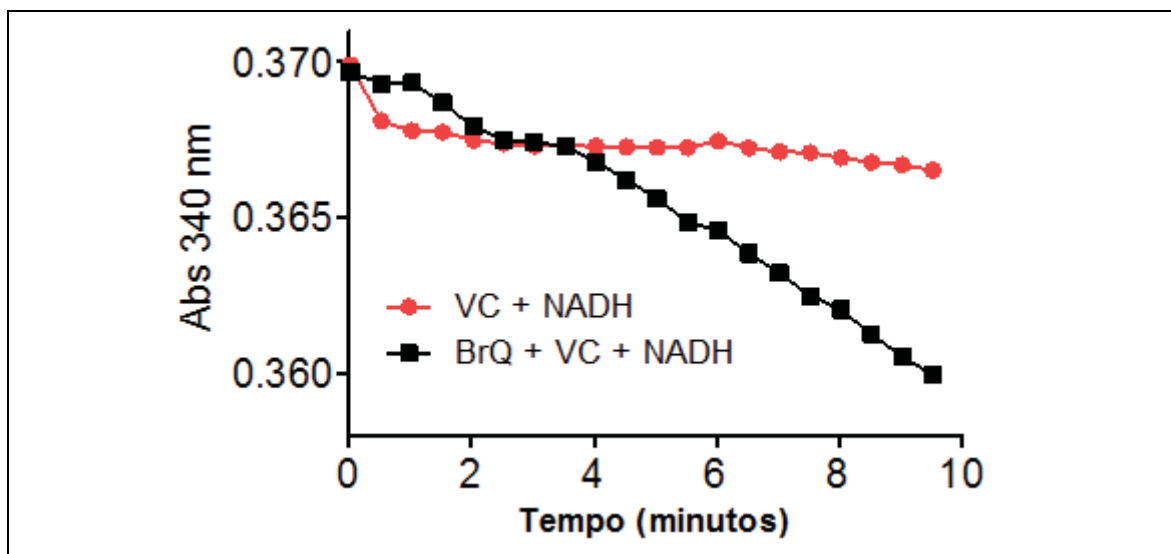


Figura 33. Oxidação do NADH durante a reação ciclo-redox. Oxidação do NADH monitorada à 340 nm. As misturas reacionais foram constituídas por 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ (10 μM) e vitamina C - VC (500 μM) em PBS a 37 ° C na presença ou ausência de NADH (100 μM).

4.1.9. Vias propostas para BrQ/VC em reação ciclo-redox

Em conjunto, os estudos anteriores mostram que o composto BrQ foi significativamente mais eficaz do que VK₃ na geração de EROs e, além disso, poderia provocar a depleção de reservas antioxidantes celulares como o GSH a coenzima NADH. Na Figura 34, resumimos todas as reações aqui estudadas.

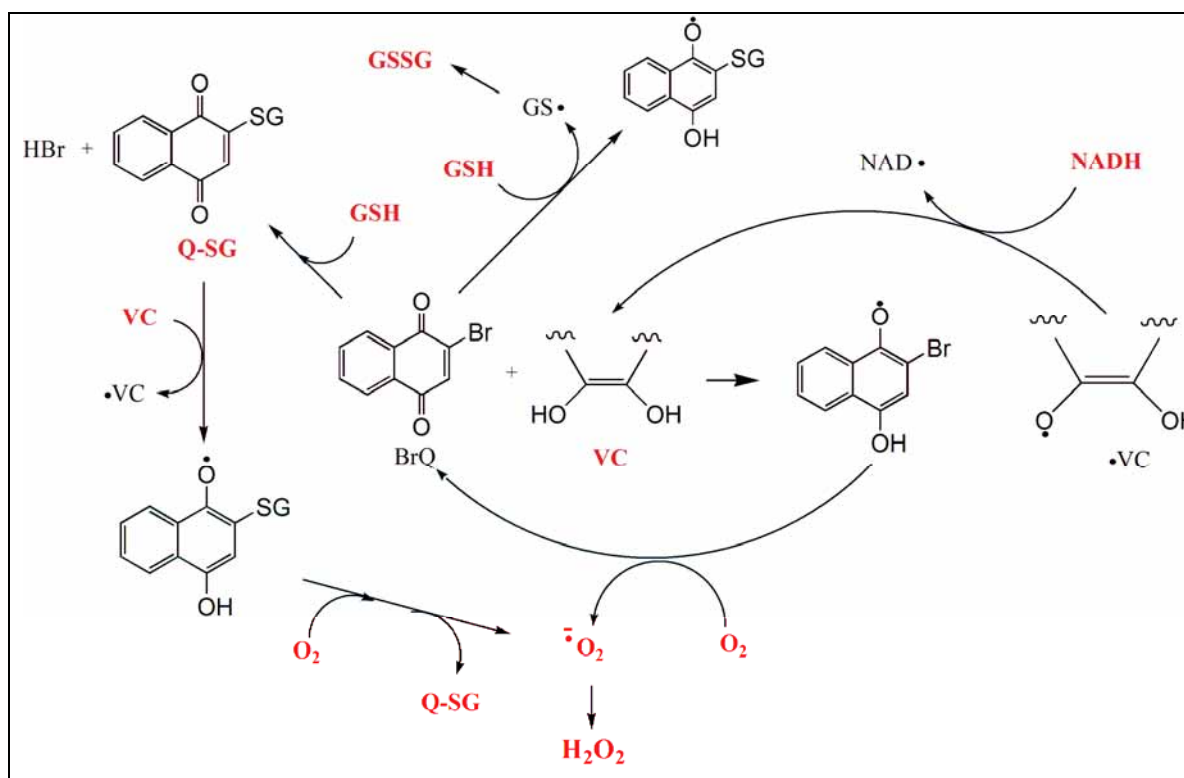


Figura 34. Vias propostas para 2-bromo-1,4-naftoquinona BrQ/ vitamina C - VC em reação ciclo-redox na presença ou ausência de GSH ou NADH. Os compostos que foram medidos pelo seu consumo ou produção são marcados em vermelho.

4.2. Ensaios biológicos

Ao longo dos estudos químicos foi observado melhor desempenho na produção de H₂O₂ para a BrQ, a qual foi utilizada nos estudos de citotoxicidade e tendo como referência a VK₃, para a qual já existem substanciais aplicações neste contexto. Os experimentos de citotoxicidade tiveram como objetivo avaliar se a maior capacidade de geração de H₂O₂ teria consequências no meio biológico. Todos os experimentos foram realizados com 10⁴

células/orifício, que é condizente ao número de células encontrado na maior parte dos artigos publicados e relacionados a este assunto. Para a absorbância do controle negativo (somente células em meio de cultura), foi atribuído o valor de 100% de sobrevivência, oferecendo, desta forma, subsídios para os cálculos de morte celular. Todos os ensaios foram procedidos da mesma forma (número de células em mesmo volume de cultura, concentrações iguais, diluição de substâncias testes, etc) e assim minimizaram-se erros nas comparações feitas.

4.2.1. Citotoxicidade em célula tumoral MCF-7 BUS

4.2.1.1. Citotoxicidade de células MCF-7 BUS expostas à associação VK₃/VC

A Figura 35 representa os ensaios de citotoxicidade em célula tumoral MCF-7 BUS em todas as concentrações testadas 1 (10/1000 μM); 2 (5/500 μM); 3 (2,5/500 μM) e 4 (2,5/250 μM) respectivamente para (VK₃/VC) e seus controles de forma isolada (VC, VK₃) com concentrações correspondentes à eles.

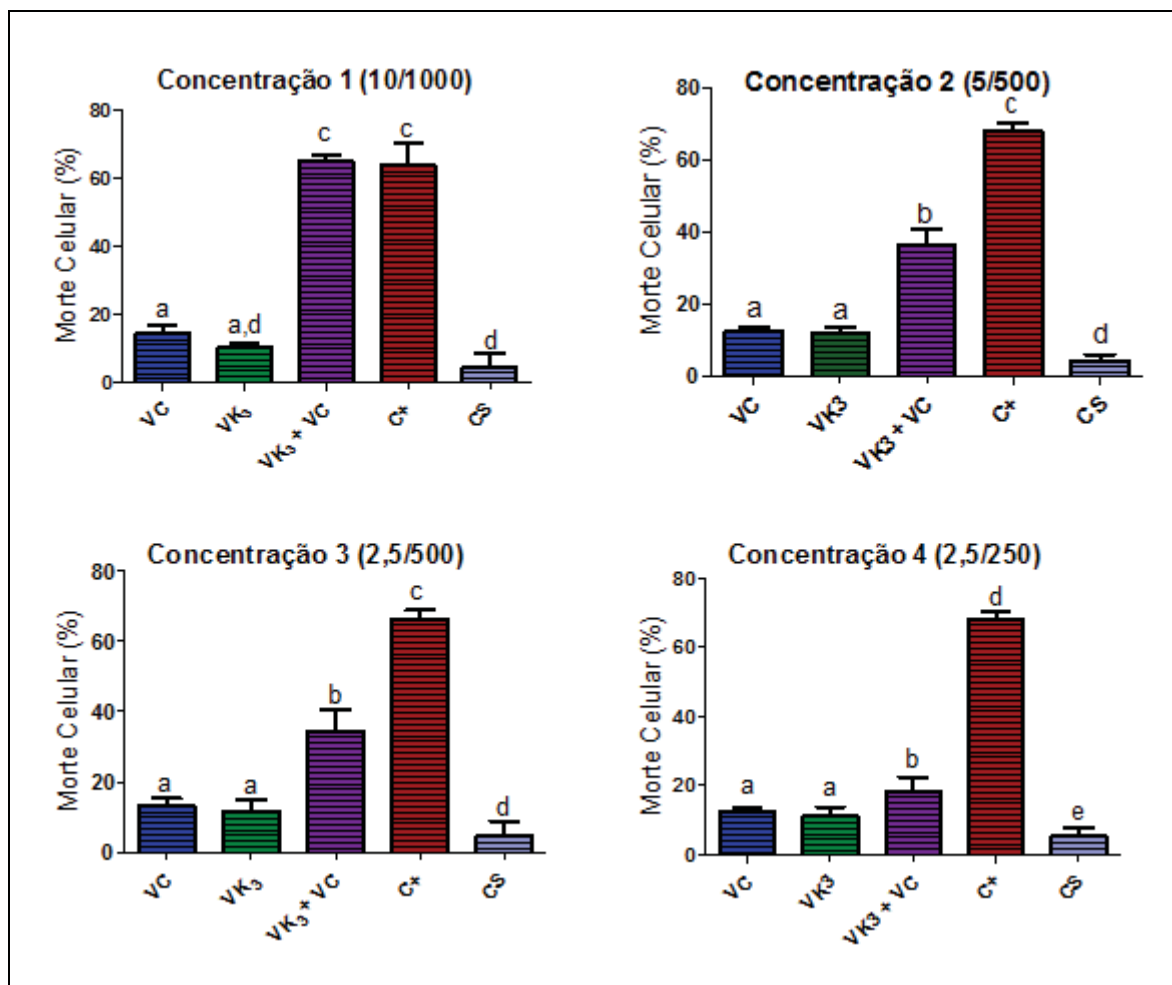


Figura 35. Morte celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento (10^4 células/poço) de grupos com concentrações diferentes entre a associação 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/vitamina C- VC e seus controles. O controle positivo (C⁺, 40% de DMSO), controle de solvente (CS). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), VK₃ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), One way (ANOVA) com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

Podemos notar claramente que em todos os experimentos representados acima houve uma diferença significativa entre os controles (VC, VK₃ e CS) e a associação VK₃/VC, mostrando maior eficiência de morte celular para este último sem interferência do solvente utilizado para a dissolução das naftoquinonas (solução estoque de 10 mM em DMSO), a qual, posteriormente, serviu para que fossem feitas as diluições para as concentrações teste em meio de cultura, contendo em cada orifício menos de 0,01% de DMSO. Da mesma forma, para a realização do controle do solvente foram realizadas diluições respeitando as mesmas proporções, mas neste caso, contendo somente o DMSO em meio de cultura.

Os controles VC e VK₃ não apresentaram diferenças entre si em nenhum dos grupos de concentrações testados (Tabela 4).

O controle positivo (C+) não apresentou morte de 100%, o que podemos considerar normal, pois o processo de proliferação das células é muito rápido, podendo haver viabilidade de algumas células em cultura. Visto isso, somente na concentração 1 não se constatou diferença estatística entre a associação das vitaminas e o controle positivo, que foi composto de 40% de DMSO.

As concentrações 2 e 3, representados pelos valores de 5/500 e 2,5/500 µM respectivamente, apresentaram significâncias iguais, porém, com vantagem para a concentração 3, pois esta apresentou a mesma proporção de morte celular (em torno de 34,5%) com menor concentração de VK₃ utilizada (Figura 36).

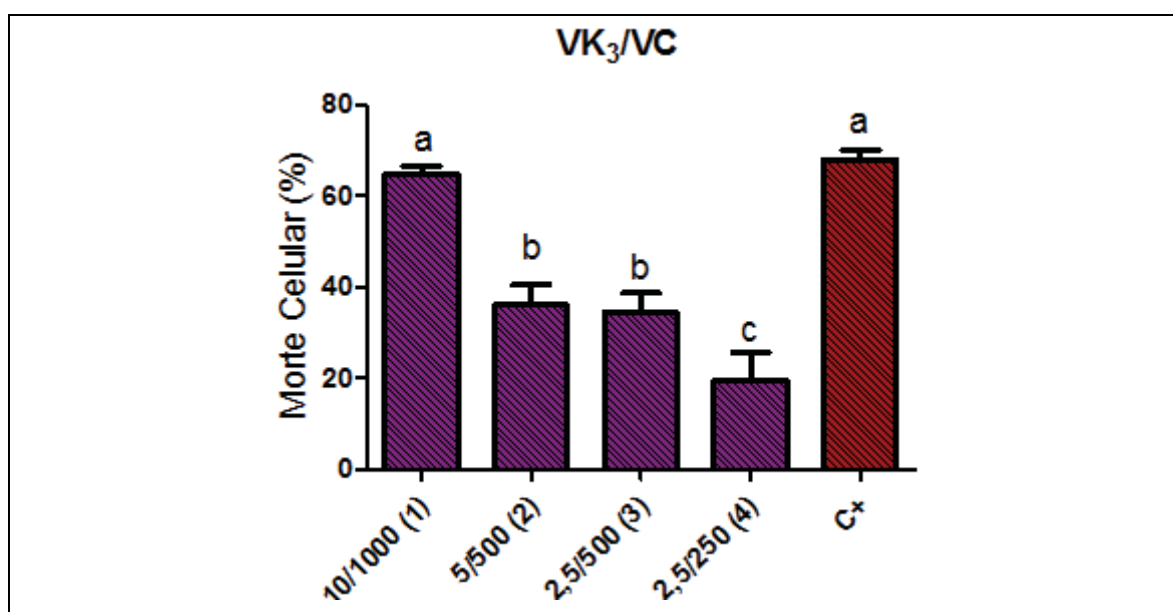


Figura 36. Morte celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento (10^4 células/poço) de grupos com concentrações diferentes entre a associação 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/Vitamina C - VC. O controle positivo (C+, 40% de DMSO). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 µM), VK₃ (10, 5 e 2,5 µM) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), one way ANOVA com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

Tabela 4. Citotoxicidade em células MCF-7 BUS (%), pela exposição de compostos isolados (controles) e associação de 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃ / vitamina C- VC (10⁴ células/poço). Condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 µM), VK₃ (10, 5 e 2,5 µM) e suas associações em meio DMEM.

Grupo	Concentração VK ₃ e/ou VC µM			
	10/1000 (1)	5/500 (2)	2,5/500 (3)	2,5/250 (4)
C+	66,4 ± 3,2 (f)			
CS	4,5 ± 3,1 (e)			
VC	14,2 ± 2,5 (a)	12,1 ± 1,5 (a)		12,38 ± 1,2 (a)
VK ₃	9,9 ± 1,4 (a,e)	11,7 ± 1,5 (a)	11,4 ± 3,3 (a)	10,88 ± 2,8 (a)
VK ₃ /VC	64,6 ± 6,6 (b,f)	36,1 ± 4,4 (c)	34,4 ± 6,0 (c)	18,0 ± 4,4 (d)

Dados apresentados como média ± desvio padrão.

Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,01). Teste one way (ANOVA) com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

4.2.1.2. Citotoxicidade de células MCF-7 BUS expostas à associação BrQ/VC

A Figura 37 representa os ensaios de citotoxicidade em célula tumoral MCF-7 BUS em todas as concentrações testadas (10/1000; 5/500; 2,5/500 e 2,5/250 µM respectivamente para BrQ/VC) e seus controles de forma isolada (VC, BrQ) com concentrações correspondentes à eles. Estão representados também controles positivo (C+) e de solvente (CS).

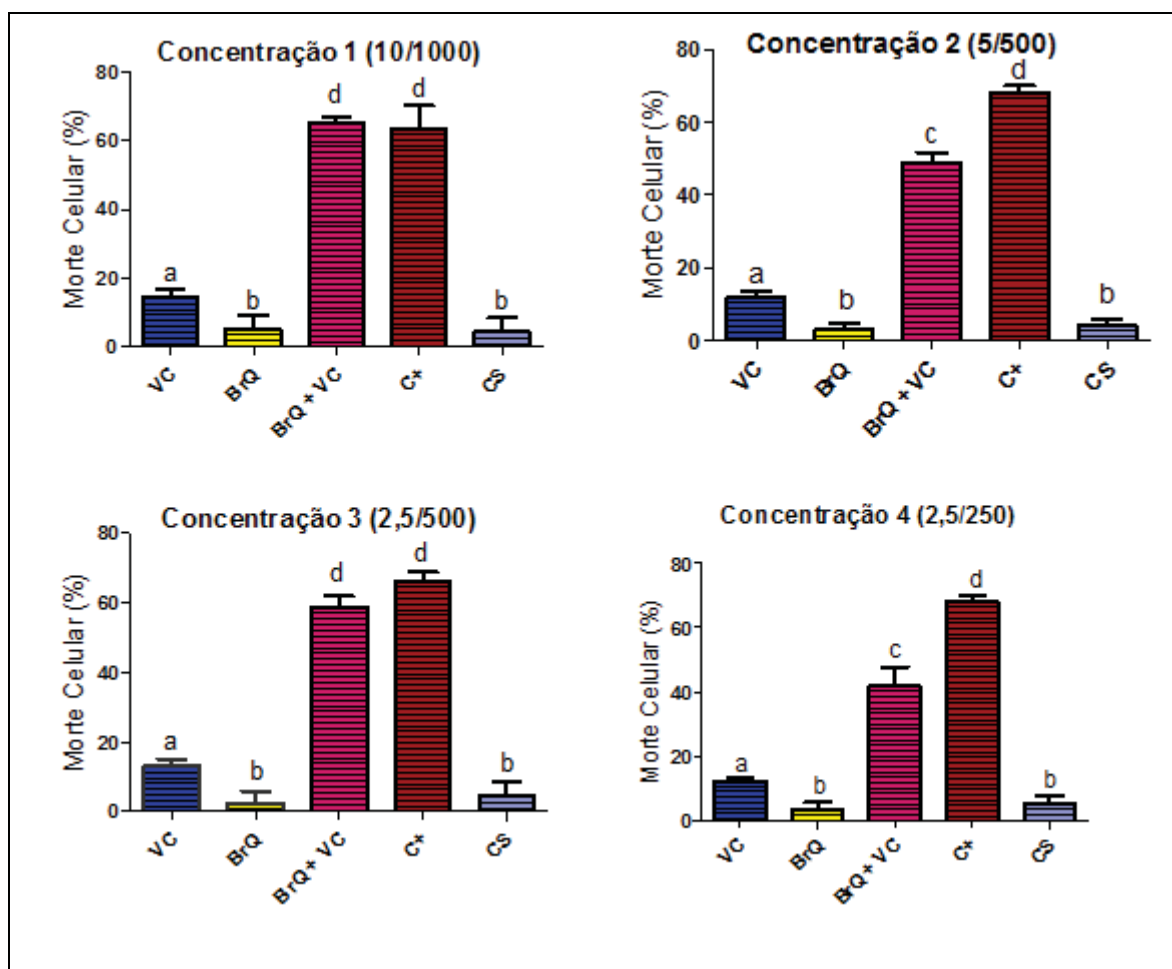


Figura 37. Morte celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento (10^4 células/poço) de grupos com concentrações diferentes entre a associação 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ /vitamina C - VC e seus controles. O controle positivo (C+, 40% de DMSO), controle de solvente (CS). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), *one way* (ANOVA) com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

É possível verificar que em todos os experimentos representados acima houve uma diferença significativa entre os controles VC e BrQ, havendo similaridade entre os controles BrQ e CS (Tabela 5).

Todos os controles VC e BrQ mostraram significância estatística nas concentrações testadas em relação à associação BrQ/VC, mostrando maior eficiência de morte celular neste último, sem interferência do solvente.

A diluição de BrQ ocorreu da mesma forma que VK₃. Além disso, o controle do composto BrQ apresenta diferença estatística, para menos, perante o controle VC, o qual, junto à literatura, dependendo da concentração, é considerado uma fonte de estudo como

droga coadjuvante contra o câncer (AGUS; VERA; GOLDE, 1999; KUIPER et al., 2010). Assim, verificamos a eficiência da associação de BrQ e VC (Figura 38).

As concentrações 1 e 3 representadas pelas concentrações 5/500 e 2,5/500 μM respectivamente, apresentaram significâncias iguais, porém, com a vantagem para o grupo 3, pois este apresentou a mesma proporção de morte celular (em torno de 60%) com uma concentração 4 vezes menor (Tabela 5).

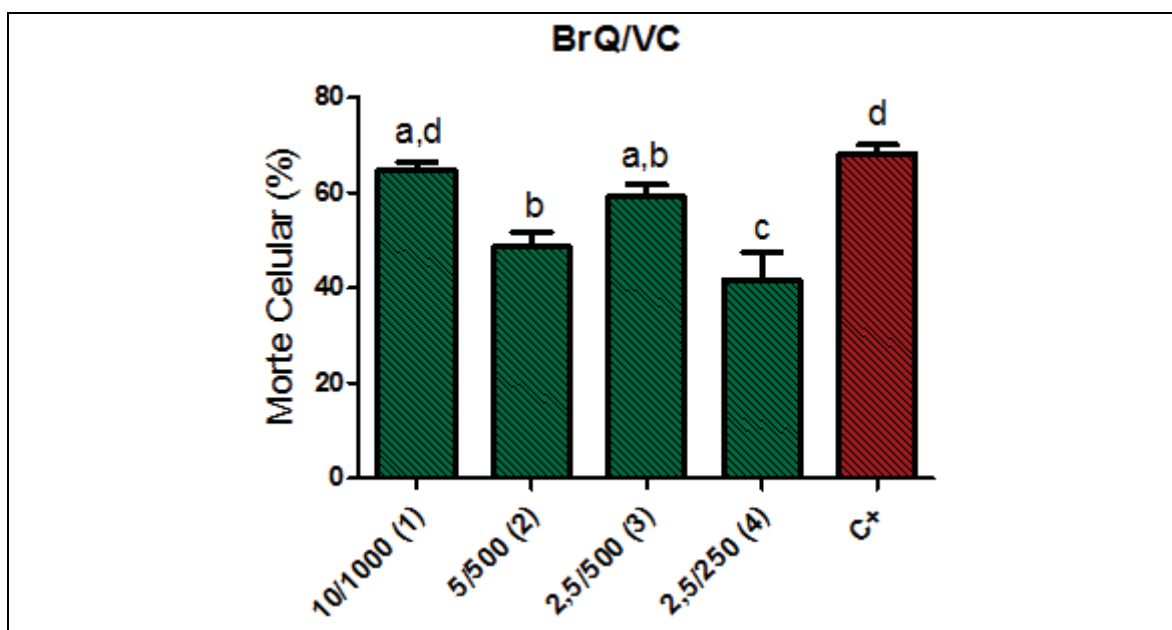


Figura 38. Morte celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento (10^4 células/poço) de grupos com concentrações diferentes de 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/Vitamina C - VC. O controle positivo (C+, 40% de DMSO). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μM), BrQ (10, 5 e 2,5 μM) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), one way ANOVA com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

Tabela 5. Citotoxicidade em células MCF-7 BUS (%), pela exposição de compostos isolados (controles) e associação de 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/vitamina C- VC (10^4 células/poço). Condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) e suas associações em meio DMEM.

Grupo	Concentração BrQ e/ou VC μ M			
	10/1000 (1)	5/500 (2)	2,5/500 (3)	2,5/250 (4)
C+	66,4 \pm 3,2 (h)			
CS	4,5 \pm 3,1 (g)			
VC	14,27 \pm 2,5 (a)	12,1 \pm 1,5 (a)		12,3 \pm 1,2 (a)
BrQ	5,2 \pm 4,0 (b,g)	3,0 \pm 2,6 (b,g)	2,5 \pm 3,5 (b,g)	3,3 \pm 2,3 (b,g)
BrQ/VC	64,8 \pm 2,1 (c,h)	48,6 \pm 3,1 (d)	58,8 \pm 3,1 (e)	41,8 \pm 6,0 (f)

Dados apresentados como média \pm desvio padrão.

Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$). Teste *one way* (ANOVA) com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

4.2.1.3. Comparação da citotoxicidade em células MCF-7 BUS entre os grupos VK₃/VC versus BrQ/VC

Com exceção do grupo 1 das concentrações, nas outras combinações testadas houveram diferenças quando se compara estatisticamente os dois grupos de associações de naftoquinona com VC (BrQ/VC versus VK₃/VC) (Figura 40).

Partindo da premissa que quanto maior a diferença encontrada entre as mortes de BrQ/VC e VK₃/VC, melhor serão os resultados encontrados para o par BrQ/VC em relação ao par VK₃/VC, apesar do grupo de concentração 3 (BrQ/VC) apresentar maior porcentagem de morte celular e ainda uma diferença significativa entre a morte por VK₃/VC, o grupo de concentração 4 é aquele que demonstra maior razão entre os dois grupos (BrQ:VC/VK₃:VC) (Tabela 6).

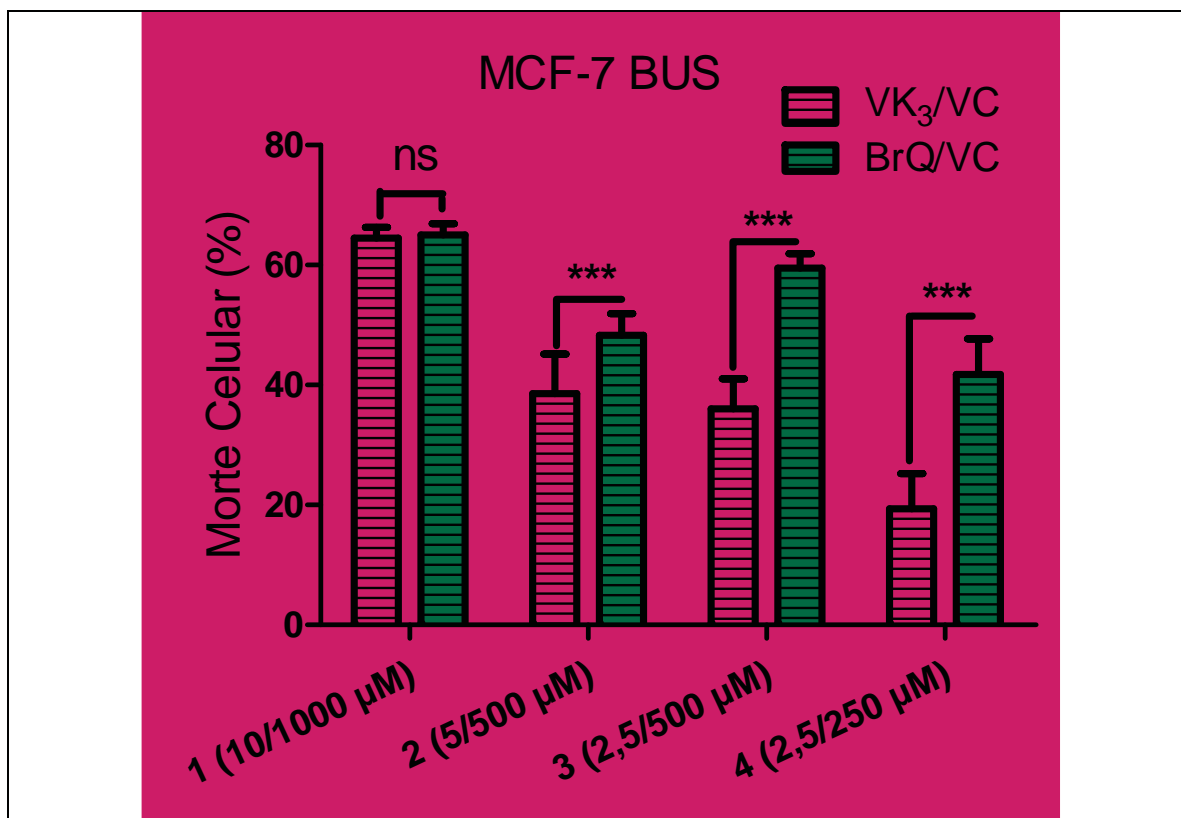


Figura 39. Comparação da morte celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento em diferentes concentrações das associações 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/Vitamina C- VC versus 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/VC. A condição de experimentação foram VC (1 mM, 500 e 250 µM), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 µM) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Teste *t de students*. Realizado em pares.

ns – não significativo;

***** - significativo $p < 0,05$;

****** - significativo $p < 0,01$;

******* - significativo $p < 0,001$.

Tabela 6. Comparação morte celular em células MCF-7 BUS (%) após 24 horas de tratamento (10^4 células/poço) entre 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃ / vitamina C- VC *versus* 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/Vitamina C- VC. Condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 μ M).

Grupo de Concentrações μ M	VK ₃ /VC	BrQ/VC	Razão BrQ:VC/VK ₃ :VC
(1) 10/1000	64 \pm 1,7	66 \pm 1,8 ns	1,0
(2) 5/500	36 \pm 6,9	48 \pm 3,6 ***	1,6
(3) 2,5/500	35 \pm 5,0	59,3 \pm 2,4 ***	1,6
(4) 2,5/250	18,0 \pm 4,4	41,8 \pm 6,0 ***	2,3

Dados apresentados como média \pm desvio padrão.

Teste *t de students*. Realizado em pares.

ns – não significativo;

***** - significativo $p < 0,05$;

****** - significativo $p < 0,01$;

******* - significativo $p < 0,001$.

Na Figura 40 está representado um gráfico com múltipla comparação de todos os componentes neste tópico mencionados, onde a mistura de concentração 2 (5/500 μ M) da associação VK₃/VC apresenta a mesma porcentagem de morte que a associação BrQ/VC, no entanto, em concentração 2 vezes menor (4 – 2,5/250).

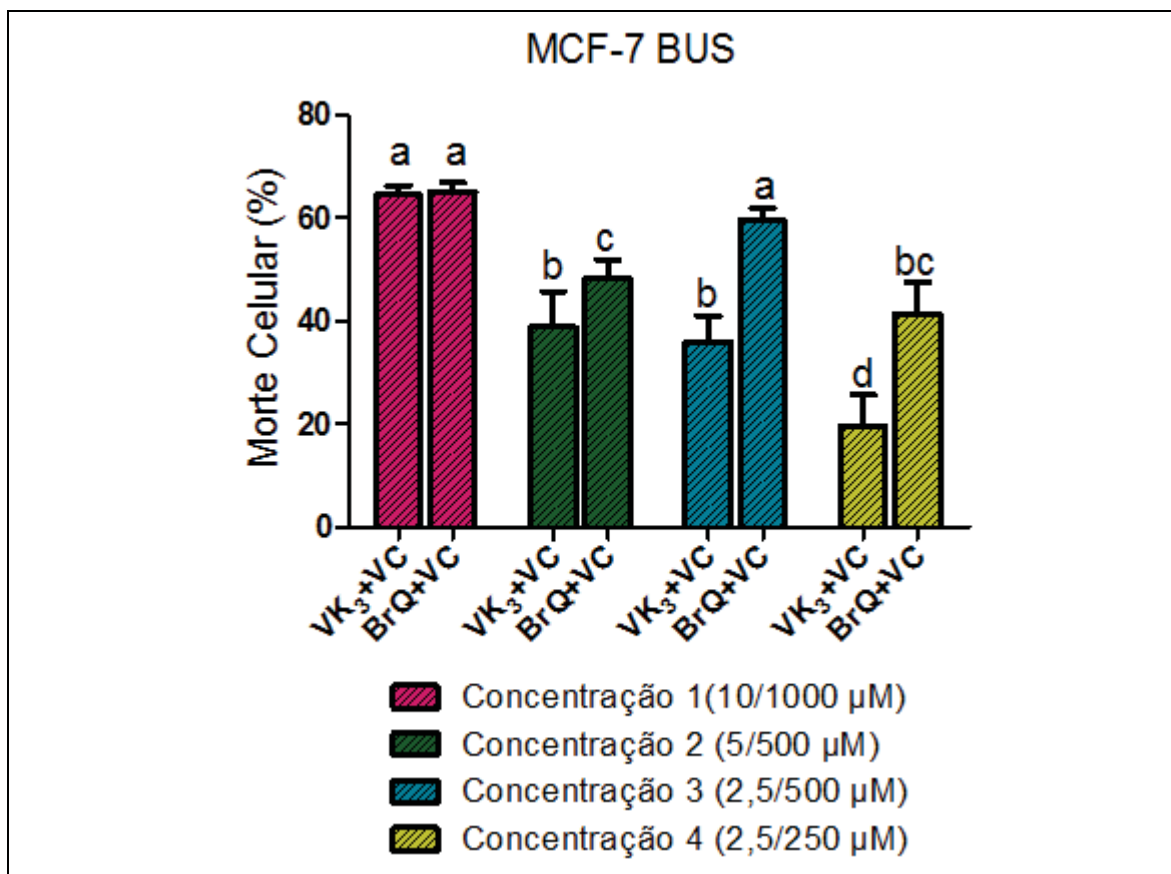


Figura 40. Comparação da morte celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento em diferentes concentrações das associações 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/Vitamina C- VC e 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/VC. A condição de experimentação foram VC (1 mM, 500 e 250 µM), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 µM) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o erro padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$). Teste *One way* (ANOVA), com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

4.2.2. Citotoxicidade em célula normal CHO

4.2.2.1. Citotoxicidade de células CHO expostas à associação VK₃/VC

A Figura 41 representa os ensaios de citotoxicidade em célula normal CHO em todas as concentrações testadas 1 (10/1000 µM); 2 (5/500 µM); 3 (2,5/500 µM) e 4 (2,5/250 µM) respectivamente para (VK₃/VC) e seus controles de forma isolada (VC, VK₃), com concentrações correspondentes à eles, da mesma forma como foi realizado com a linhagem de célula tumoral MCF-7 BUS.

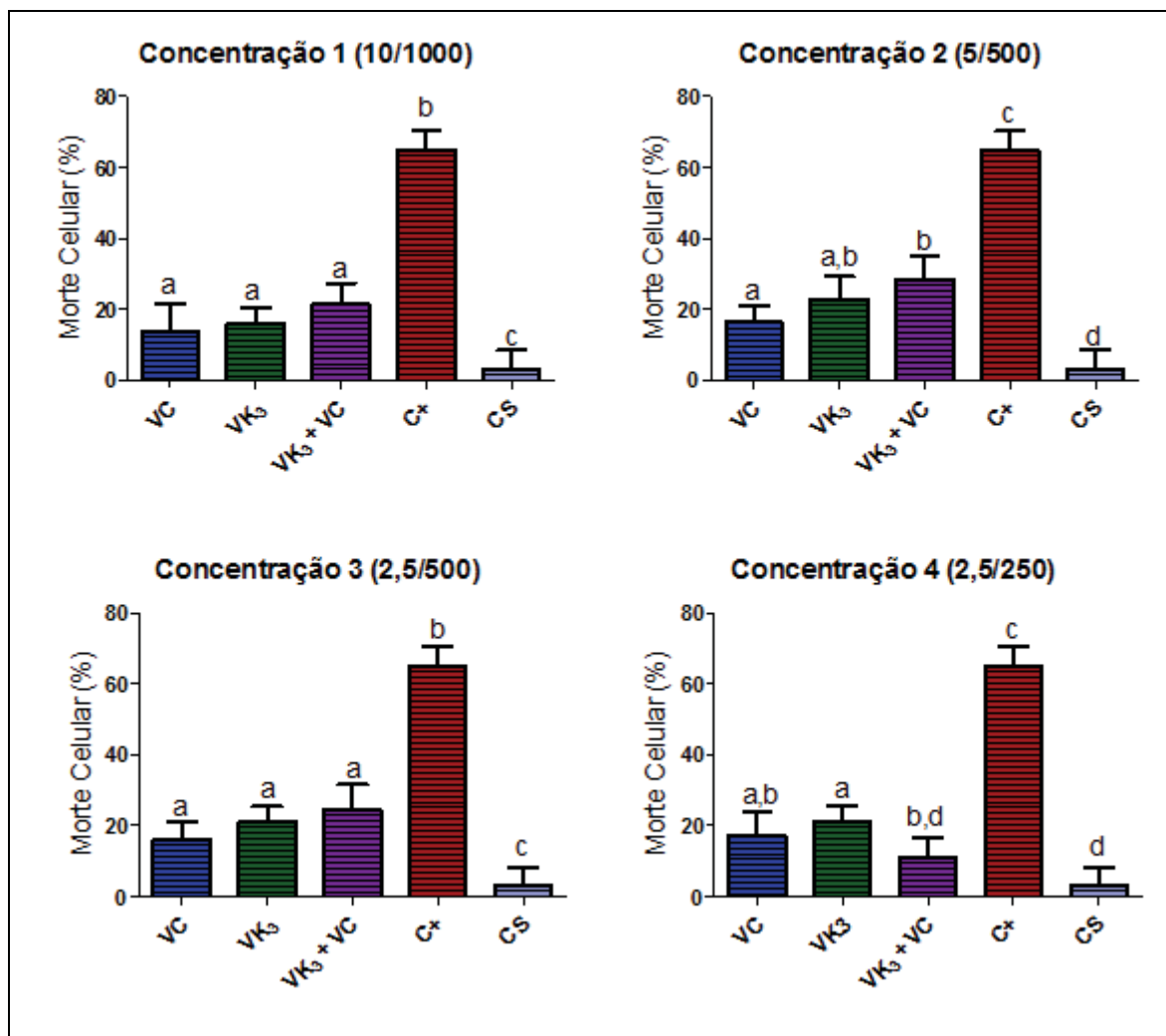


Figura 41. Morte celular em células CHO após 24 horas de tratamento (10^4 células/poço) de grupos com concentrações diferentes entre a associação 1,4-naftoquinona – VK₃ /vitamina C - VC e seus controles. O controle positivo (C⁺, 40% de DMSO), controle de solvente (CS). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), VK₃ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), *One way* (ANOVA) com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

Como apresentado na figura anterior, não houve diferenças entre os grupos controle VC e VK₃ em nenhum ensaio.

Com relação à associação das vitaminas em células normais, nas concentrações 1 e 3, não houve diferença com os controles VC e VK₃, havendo distinção nas concentrações 2, com maior porcentagem para VK₃/VC em comparação ao VC, e na concentração 4, onde a associação VK₃/VC mostrou menor toxicidade em comparação ao controle VK₃.

A associação que apresenta maior morte celular é a combinação 2 (28,5%). Entretanto, a mesma não se mostra significativamente diferente que as concentrações 1 (21,3%) e 3 (24,5%).

A associação da concentração 4 (menor concentração de associação 2,5/250 μM) exibiu a menor proporção de morte celular (9,8%). Os valores das associações nas concentrações 1, 2, 3 e 4 se mostraram muito diferentes do controle positivo (Figura 42) (Tabela 7).

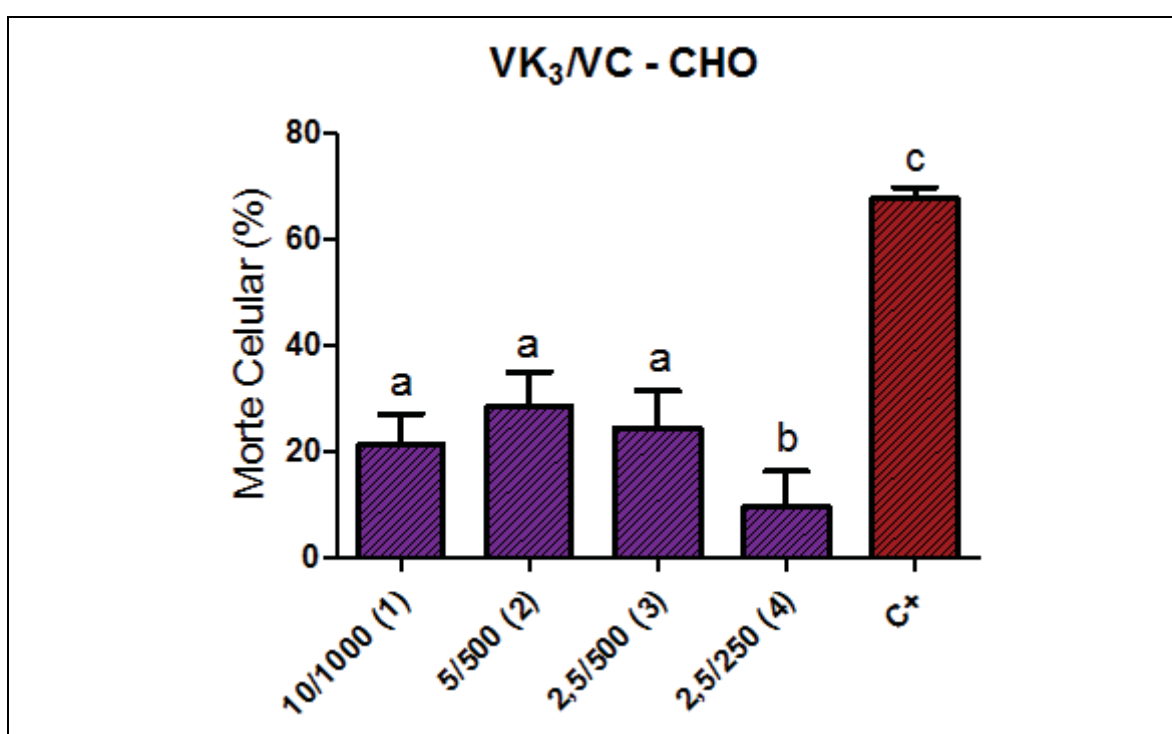


Figura 42. Morte celular em células CHO após 24 horas de tratamento (10^4 células/poço) de grupos com concentrações diferentes entre a associação 2-metil-1,4-naftoquinona - VK_3 /Vitamina C – VC. O controle positivo (C+, 40% de DMSO). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μM), VK_3 (10, 5 e 2,5 μM) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), *one way* ANOVA com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

Tabela 7. Citotoxicidade em células CHO (%), pela exposição de compostos isolados (controles) e associação de 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃ / vitamina C- VC (10⁴ células/poço). Condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 µM), VK₃ (10, 5 e 2,5 µM) e suas associações em meio DMEM.

Grupo	Concentração VK ₃ e/ou VC µM			
	10/1000 (1)	5/500 (2)	2,5/500 (3)	2,5/250 (4)
C+	65,5 ± 5,0 (d)			
CS	3,1 ± 2,0 (f)			
VC	13,9 ± 7,3 (a)	16,23 ± 4,7 (a)		17,1 ± 6,9 (a,c)
VK ₃	16,0 ± 4,4 (a)	22,8 ± 6,3 (a,b)	21,1 ± 4,3 (a)	21,2 ± 4,0 (a)
VK ₃ /VC	21,3 ± 5,3 (a)	28,3 ± 6,5 (b)	24,5 ± 7,0 (a)	9,8 ± 6,6 (c)

Dados apresentados como média ± desvio padrão.

Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,01). Teste *one way* (ANOVA) com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

4.2.2.2. Citotoxicidade de células CHO expostas à associação BrQ/VC

Em ensaios de citotoxicidade com a utilização de célula normal CHO para a substância BrQ e sua associação com VC, foram utilizadas as mesmas concentrações (10/1000; 5/500; 2,5/500 e 2,5/250 µM respectivamente para BrQ/VC) e seus controles de forma isolada VC e BrQ, em concentrações correspondentes à eles, assim representados na Figura 43, além de controles positivo (C+) e de solvente (CS).

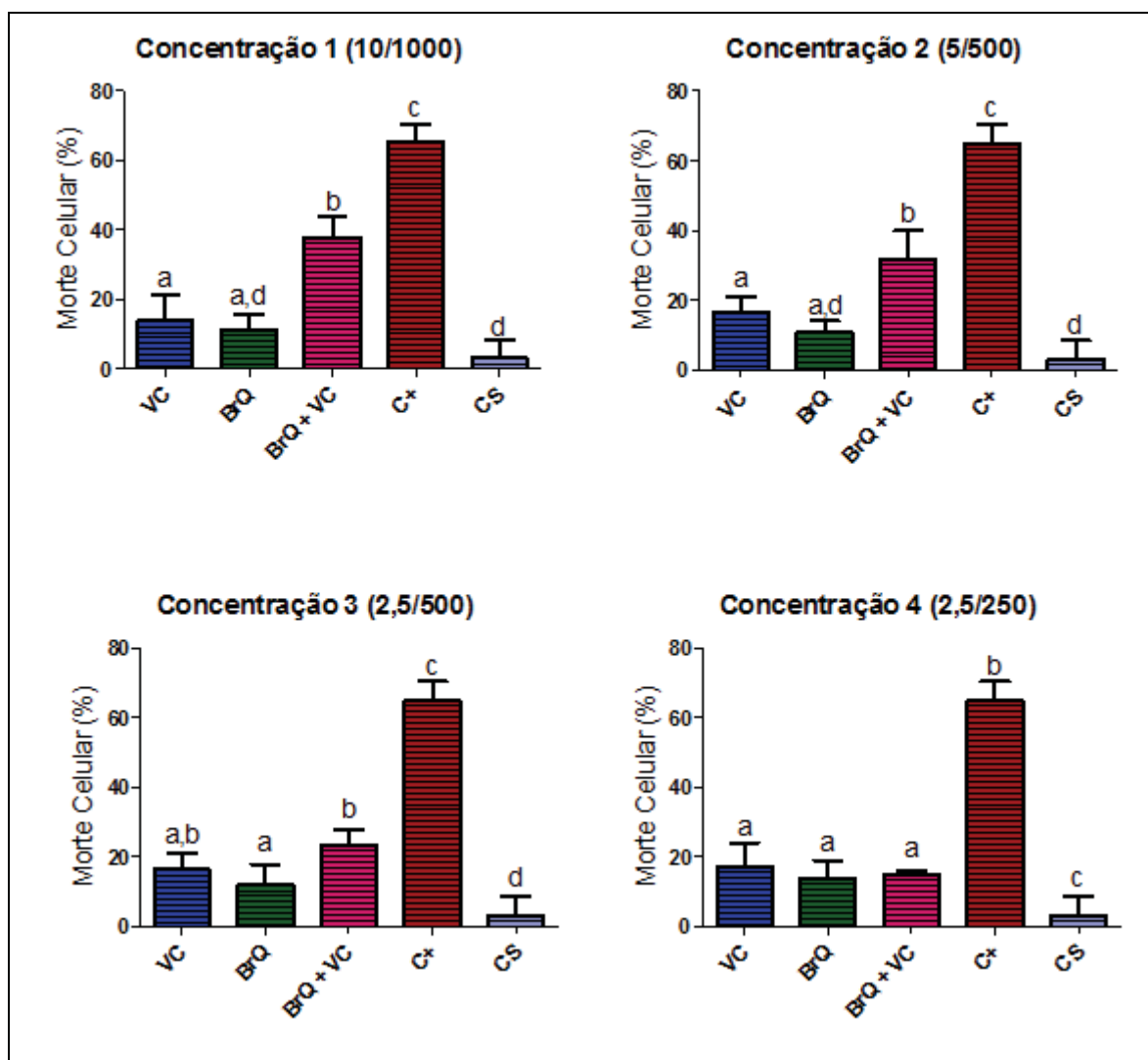


Figura 43. Morte celular em células CHO após 24 horas de tratamento (10^4 células/poço) de grupos com concentrações diferentes entre a associação 2-bromo-1,4-naftoquinona - BrQ /vitamina C - VC e seus controles. O controle positivo (C+, 40% de DMSO), controle de solvente (CS). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), *one way* (ANOVA) com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

Nas concentrações 1 e 2 (10/1000 e 5/500 μ M respectivamente), a combinação de BrQ/VC mostrou citotoxicidade maior em comparação aos controle VC e BrQ. A concentração 3 se apresentou muito similar ao controle VC e na menor concentração testada (4 – 2,5/250 μ M) não houve diferença estatística entre os controles VC e BrQ em comparação a associação destas duas substâncias (BrQ/VC).

Mais uma vez, o solvente (DMSO), no qual as naftoquinonas foram dissolvidas, não interferiu na citotoxicidade.

O controle BrQ foi o composto que apresentou menor toxicidade.

A comparação das combinações BrQ/VC é destacada na Figura 44. As associações das concentrações 1 e 2 apresentaram maior porcentagem de toxicidade (37,8 e 31,8% respectivamente), seguindo da concentração 3 (26,23%) e por fim da concentração 4 (15,3%), configurando, assim, uma dependência à concentração (Tabela 8).

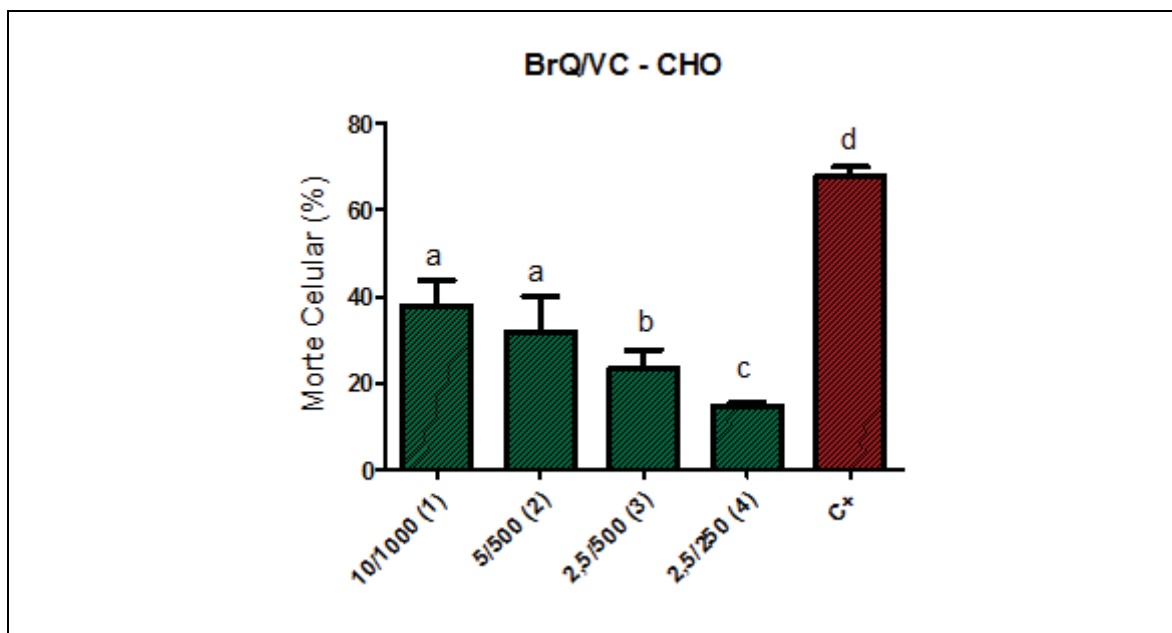


Figura 44. Morte celular em células CHO após 24 horas de tratamento (10^4 células/poço) de grupos com concentrações diferentes de 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/Vitamina C - VC. O controle positivo (C+, 40% de DMSO). A condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), *one way* ANOVA com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

Tabela 8. Citotoxicidade em células CHO (%), pela exposição de compostos isolados (controles) e associação de 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/ vitamina C- VC (10^4 células/poço). Condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), BrQ (10, 5 e 2,5 μ M) e suas associações em meio DMEM.

Grupo	Concentração BrQ e/ou VC μ M			
	10/1000 (1)	5/500 (2)	2,5/500 (3)	2,5/250 (4)
C+	66,4 \pm 3,25 (d)			
CS	4,5 \pm 3,1 (e)			
VC	14,0 \pm 2,0 (a)	14,16 \pm 2,5 (a)	12,2 \pm 2,1 (a,b)	13,38 \pm 1,0 (a)
BrQ	11,1 \pm 4,4 (a,e)	10,6 \pm 3,3 (a,e)	11,9 \pm 5,8 (a)	13,8 \pm 5,1 (a)
BrQ/VC	37,9 \pm 5,8 (b)	31,8 \pm 8,0 (b)	23,3 \pm 4,3 (b)	14,1 \pm 0,96 (a)

Dados apresentados como média \pm desvio padrão.

Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$). Teste *one way* (ANOVA) com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

4.2.2.3. Comparação da citotoxicidade em células CHO entre os grupos VK₃/VC versus BrQ/VC

A concentração 1 da combinação das drogas BrQ/VC se apresentou com maior significância de morte celular. Já as concentrações restantes 2 (31,56 e 28,5%) e 3 (23,22 e 23,88%) e 4 (14,1 e 9,0), respectivamente para BrQ/VC e VK₃/VC, não apresentaram diferença expressiva na morte celular (Tabela 9).

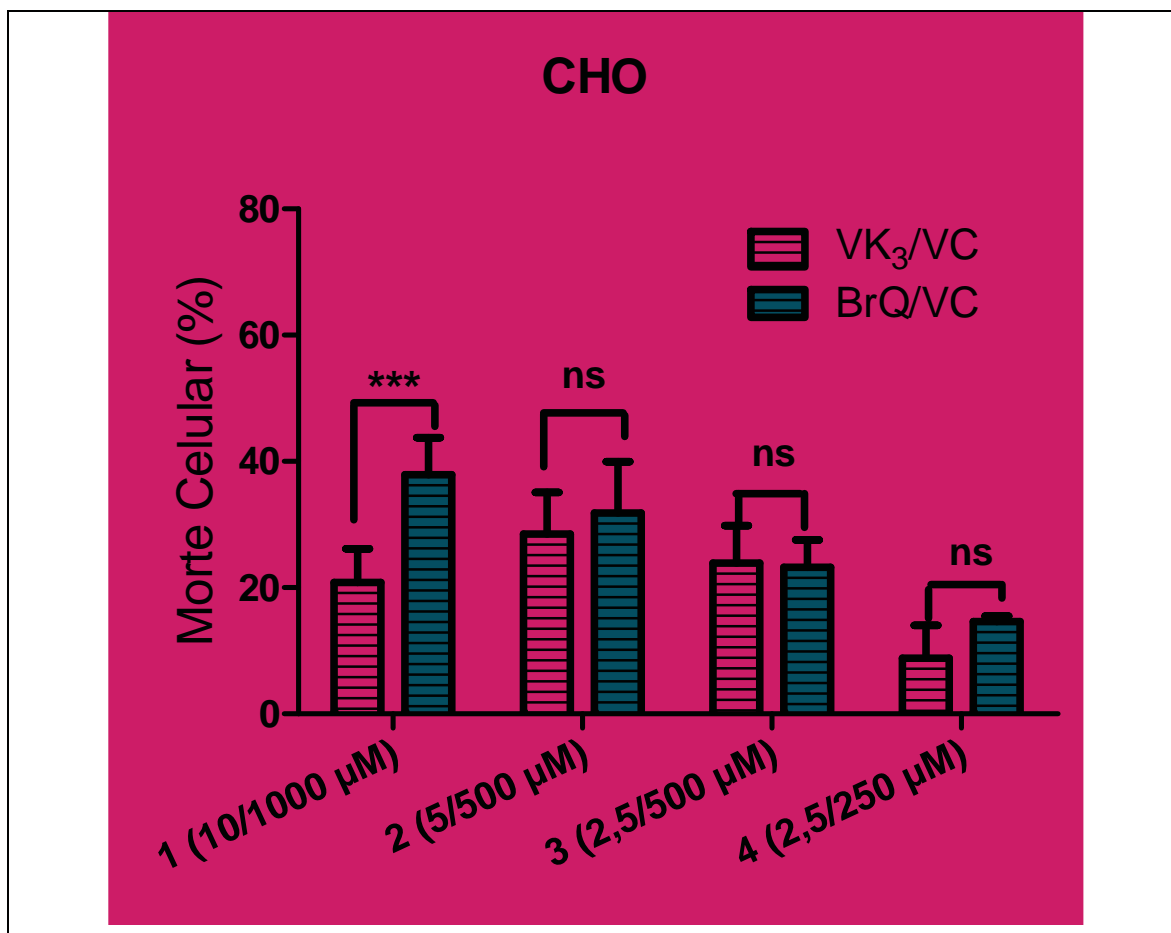


Figura 45. Comparação da morte celular em células CHO após 24 horas de tratamento em diferentes concentrações das associações 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/Vitamina C- VC versus 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/VC. A condição de experimentação foram VC (1 mM, 500 e 250 μM), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 μM) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Teste *t de students*. Realizado em pares.

ns – não significativo;

***** - significativo $p < 0,05$;

****** - significativo $p < 0,01$;

******* - significativo $p < 0,001$;

Tabela 9. Comparação morte celular em células CHO (%) após 24 horas de tratamento (10^4 células/poço) entre 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃ / vitamina C- VC *versus* 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/Vitamina C- VC. Condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 μ M).

Grupo de Concentrações μ M	VK ₃ /VC	BrQ/VC	Razão BrQ:VC/VK ₃ :VC
(1) 10/1000	21,3 \pm 5,8	37,8 \pm 5,8 ***	1,7
(2) 5/500	28,5 \pm 6,3	31,8 \pm 8,1 ns	1,1
(3) 2,5/500	24,5 \pm 7,0	23,2 \pm 4,3 ns	-
(4) 2,5/250	9,8 \pm 6,0	14,1 \pm 0,9 ns	1,4

Dados apresentados como média \pm desvio padrão.

Teste *t de students*. Realizado em pares.

ns – não significativo;

* - significativo $p < 0,05$;

** - significativo $p < 0,01$;

*** - significativo $p < 0,001$.

Na Figura 46 está representado um gráfico com múltipla comparação de todos os componentes neste tópico mencionados.

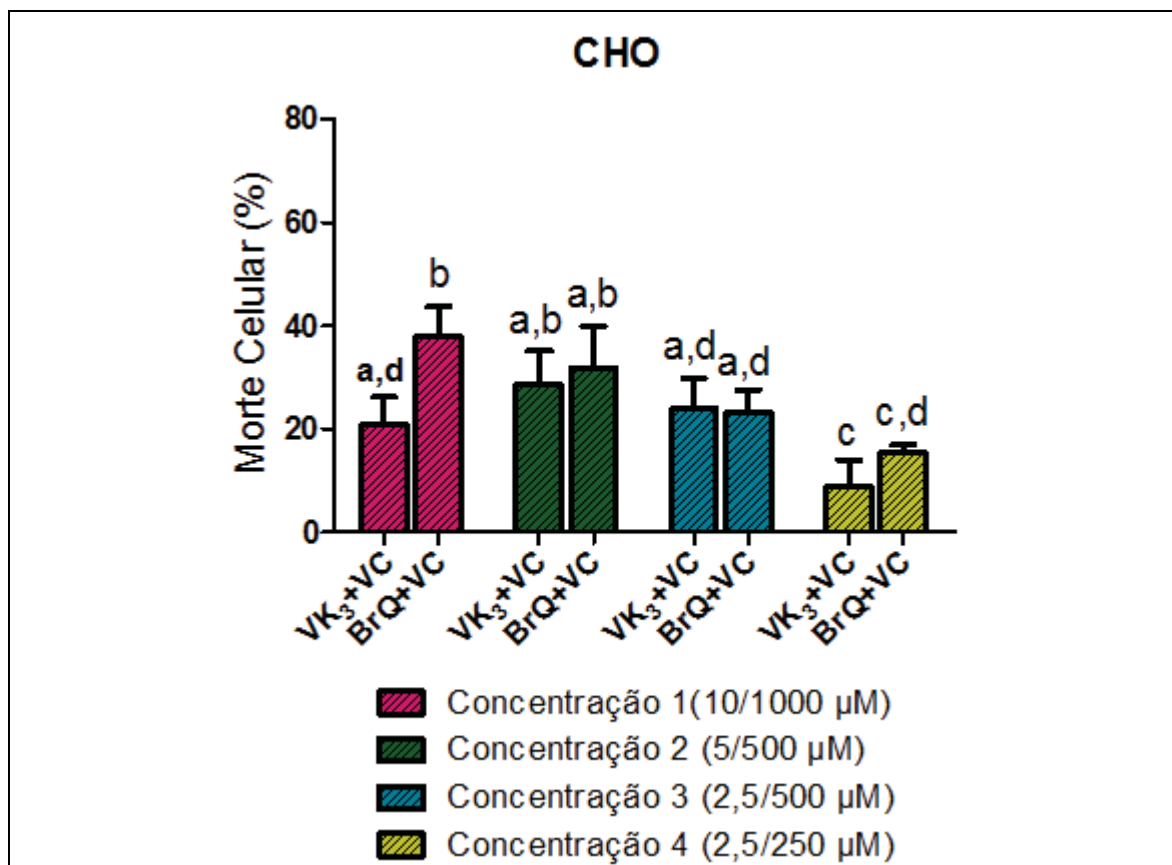


Figura 46. Comparação da morte celular em células CHO após 24 horas de tratamento em diferentes concentrações das associações 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/Vitamina C- VC e 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/VC. A condição de experimentação foram VC (1 mM, 500 e 250 µM), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 µM) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o erro padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$). Teste *one way* (ANOVA), com pós-teste Tukey, com múltipla comparação.

4.2.2.4. Comparação da citotoxicidade pela associação VK₃/VC e BrQ/VC entre linhagem de célula normal (CHO) versus linhagem de célula tumoral (MCF-7 BUS)

A grande problemática de terapias contra o câncer consiste na falta de seletividade entre células normais e tumorais (PELICANO; CARNEY; HUANG, 2004; LÓPEZ-LÁZARO, 2010).

Para verificar este fim, neste tópico serão apresentados dados comparando as drogas nas quatro combinações de concentrações testadas, entre os grupos de célula normal (CHO) e célula tumoral (MCF-7 BUS) isoladamente para as associações de substâncias VK₃/VC e BrQ/VC.

Conforme a Figura 47, todas as concentrações VK₃/VC se mostraram mais tóxicas para a linhagem de célula tumoral apresentando resultados 3,0; 1,26; 1,42 e 1,4 vezes maior para as combinações de concentração 1, 2, 3 e 4, respectivamente (Tabela 10).

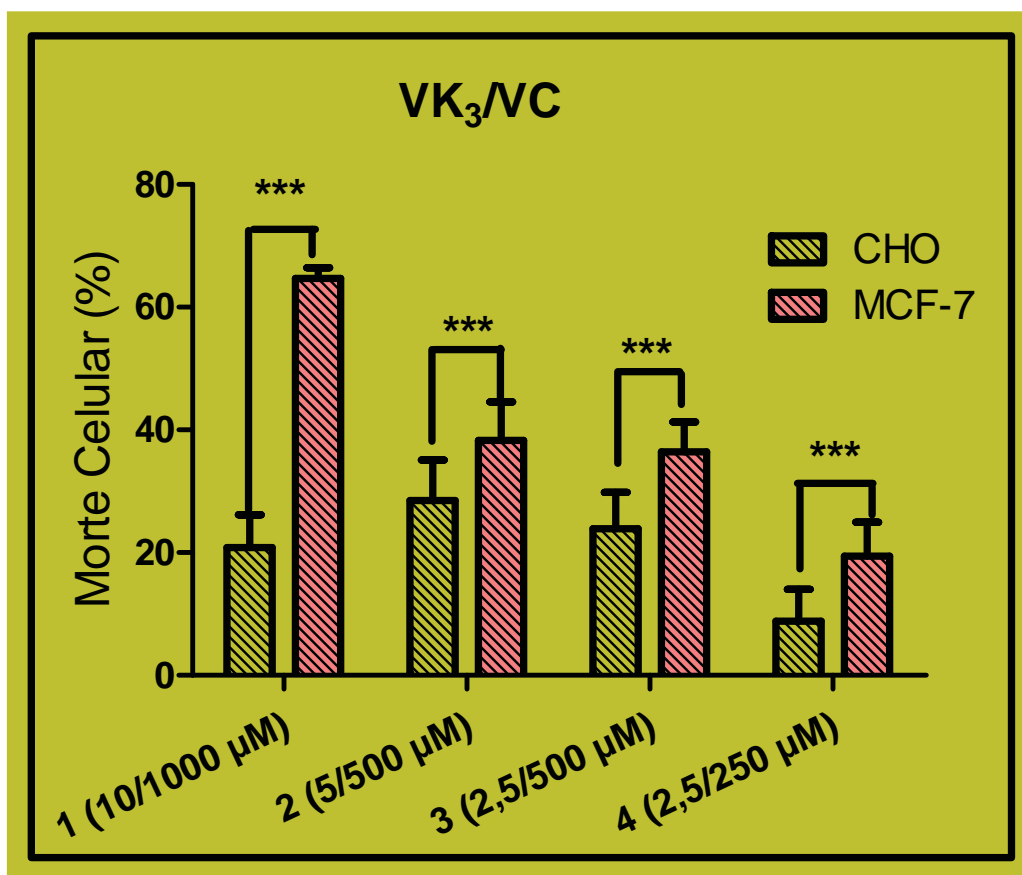


Figura 47. Comparação da morte celular em células CHO *versus* MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento em diferentes concentrações das associações 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃/Vitamina C- VC. A condição de experimentação foram VC (1 mM, 500 e 250 μM), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 μM) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Teste *t de students*.

Realizado em pares.

ns – não significativo;

***** - significativo $p < 0,05$;

****** - significativo $p < 0,01$;

******* - significativo $p < 0,001$

Da mesma forma, a associação BrQ/VC se mostrou com maior magnitude de morte celular para a linhagem de célula tumoral com resultados 1,74; 1,5; 2,5 e 2,9 vezes maior para as combinações de concentração 1, 2, 3 e 4 respectivamente (Figura 48) (Tabela 10).

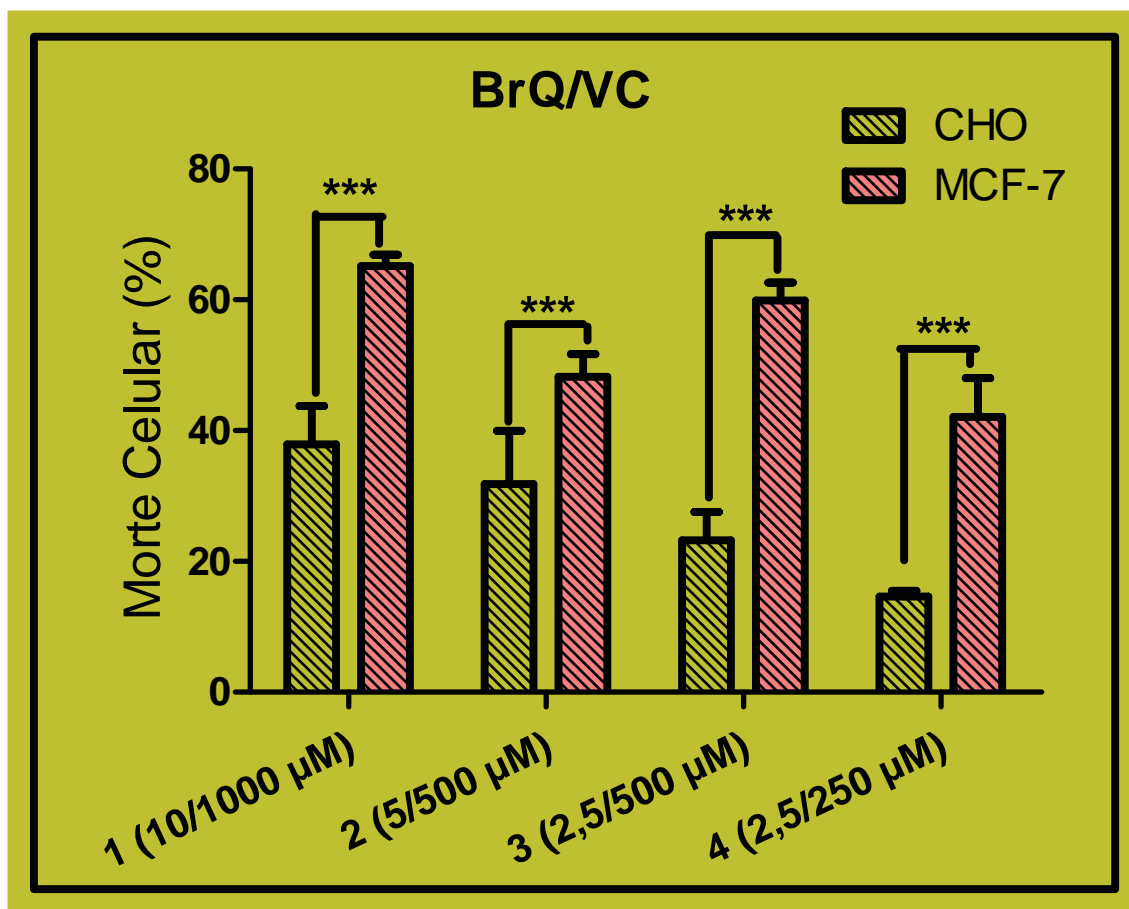


Figura 48. Comparação da morte celular em células CHO *versus* MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento em diferentes concentrações das associações 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/VC. A condição de experimentação foram VC (1 mM, 500 e 250 µM), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 µM) em meio DMEM. Experimento representativo de três experimentos diferentes. Barras verticais representam o desvio padrão. Teste *t de students*.

Realizado em pares.

ns – não significativo;

* - significativo $p < 0,05$;

** - significativo $p < 0,01$;

*** - significativo $p < 0,001$.

A Tabela 10 apresenta todos estes dados já mencionados e, além disso, aponta as diferenças expressas em forma de razão (MCF-7 BUS/CHO).

Tabela 10. Comparação morte celular em linhagem de célula normal (CHO) *versus* célula tumoral (MCF-7 BUS) (%) após 24 horas de tratamento (10^4 células/poço) com 2-metil-1,4-naftoquinona - VK₃ / vitamina C- VC e 2-bromo-1,4-naftoquinona – BrQ/Vitamina C- VC. Condição de experimentação foram VC (1000, 500 e 250 μ M), VK₃ e BrQ (10, 5 e 2,5 μ M).

Grupo μ M/ μ M	VK ₃ /VC			BrQ/VC		
	CHO	MCF-7 BUS	Razão MCF-7 BUS/ CHO	CHO	MCF-7 BUS	Razão MCF-7 BUS/ CHO
(1) 10/1000	21,4 \pm 5,8	64 \pm 1,7 ***	3,0	37,8 \pm 5,8	66 \pm 1,8 ***	1,7
(2) 5/500	28,5 \pm 6,3	36 \pm 6,9 ***	1,2	31,8 \pm 8,1	48 \pm 3,6 ***	1,5
(3) 2,5/500	24,5 \pm 7,0	35 \pm 5,0 ***	1,4	23,2 \pm 4,3	59,3 \pm 2,4 ***	2,5
(4) 2,5/250	9,8 \pm 6,0	18 \pm 4,4 ***	1,4	14,1 \pm 1,5	41,7 \pm 5,9 ***	2,9

Dados apresentados como média \pm desvio padrão.

Teste t de *students*. Realizado em pares.

ns – não significativo;

* - significativo $p < 0,05$;

** - significativo $p < 0,01$;

*** - significativo $p < 0,001$.

Apesar da associação VK₃/VC em ambos grupos de linhagem de células apresentar menor valor de citotoxicidade, a melhor razão encontrada se observa na associação BrQ/VC (MCF-7 BUS/CHO - 2,9) na concentração mais baixa testada (4 – 2,5/250 μ M). Isto significa que a razão da combinação BrQ/VC se mostra 2 vezes maior que a razão VK₃/VC. Portanto, a combinação BrQ/VC apresenta menor proporção de morte celular para CHO e maior para MCF-7 BUS, em comparação a combinação VK₃/VC.

5. DISCUSSÃO

*”A felicidade não se resume na ausência de problemas,
mas sim na sua capacidade de lidar com eles.”*

(Albert Einstein)

A busca por novas terapias contra o câncer tem sido objeto de muitos estudos, pois a incidência cresce a cada ano. Terapias já existentes são eficazes em muitos casos e melhoradas constantemente, mas com o aumento da expectativa de vida e o concomitantemente aumento da exposição a agentes cancerígenos, o número de mortes é crescente. A dificuldade na descoberta de uma molécula ideal é muito difícil, ou praticamente impossível, quando levamos em consideração as características de um tumor, o qual se forma através de várias mutações, tornando-se um tecido extremamente diferenciado em comparação a célula que o originou e com uma população celular heterogênea (DIETER et al., 2011). Dentre tais características que as diferenciam de um tecido normal, podemos citar modificações no ciclo celular, resistência à morte celular, perda de adesão celular com consequente invasão de tecidos, alteração do metabolismo energético (STORZ, 2005; TRIPALDI; STUPPIA; ALBERTI, 2013), dentre outros, com uma particularidade que se torna muito importante neste contexto, sendo hoje apontada como uma característica emergente do câncer, a alteração do microambiente do tumor, consistindo em fator crucial para o surgimento de terapias racionais (HANAHAN; WEINBERG, 2011; HANAHAN; COUSSENS, 2012; CATALANO et al., 2013).

Células cancerígenas possuem uma peculiaridade muito importante inerente às mesmas, e que será explorada ao longo deste trabalho, qual seja, o estresse oxidativo ao qual estão submetidas (SZATROWSKI; NATHAN, 1991). Tal processo, que é responsável por contribuir para o surgimento e progressão de várias doenças, incluindo o câncer, pode ser uma fonte para manutenção da sobrevivência e homeostase dessas células (HILEMAN et al., 2004). As EROs, em particular H_2O_2 , atuam como segundo mensageiros em vias que alteram a transdução de sinal, sendo desta forma, um instrumento para a promoção e manutenção do tumor (TOYOKUNI et al., 1995). Além disso, é importante ressaltar que o microambiente de um tumor também está alterado, sendo caracterizado por um desequilíbrio redox (AGUS; VERA; GOLDE, 1999).

Se por um lado um desequilíbrio redox é parte do mecanismo de sobrevivência de células tumorais, terapias que exacerbam a produção de EROs em nível celular é considerada uma forma eficaz para promoção da morte de células cancerosas (LOPEZ-LAZARO, 2007; LOPEZ-LAZARO, 2010). Elevada concentração de H_2O_2 induz a parada do ciclo celular e alterações de DNA, incluindo mutações e instabilidade genética, que desencadeiam vias alternativas de sinalização celular e mudanças no metabolismo levando à morte celular (LOPEZ-LAZARO, 2010).

Neste contexto, células cancerosas são tipicamente mais sensíveis às drogas anticâncer do que células normais. Como demonstrado por Huang et al. (2000), células leucêmicas humanas com alta concentração de EROs, foram mais vulneráveis a ação do 2-Metoxiestradiol (2-ME) do que linfócitos normais (baixos níveis de EROs). O 2-ME é um novo agente anticâncer que possui, dentre outras ações, o acúmulo da proteína pró-apoptótica (p-53) e acúmulo de EROs, por inibição da enzima superóxido dismutase (SOD).

Considerando esta última característica, várias abordagens terapêuticas para tratar o câncer são baseadas ou relacionadas com a exacerbação da geração de EROs em tumores. Obviamente, este é o caso com a utilização de VK₃/VC que se mostrou eficiente em vários experimentos *in vitro* (NOTO et al., 1989; VENUGOPAL et al., 1996; ZHANG et al., 2001; VERRAX et al., 2003, 2004; CASTRO et al., 2008; CHEN et al., 2012) e *in vivo* (TAPER et al., 1992, 2001, 2004; VERRAX et al., 2005, 2006; CHEN et al., 2011). É importante ressaltar que, quando usadas sozinhas, ambas as vitaminas apresentam efeitos citotóxicos através de mecanismos que incluem a geração de H₂O₂ (VENUGOPAL et al., 1996; AGUS; VERA; GOLDE, 1999), mas a administração combinada de VK₃/VC mostra uma atividade citotóxica sinérgica e seletiva em doses até 50 vezes menores a estas drogas utilizadas sozinhas (NOTO et al., 1989).

Levando em consideração tais informações, este estudo foi realizado visando a busca por nova e mais eficiente combinação de naftoquinonas e vitamina C no que tange à produção de EROs, em especial H₂O₂. Obviamente, para que ocorra a produção de H₂O₂, há necessariamente o consumo de oxigênio com produção intermediária do O₂[•].

O presente trabalho foi dividido em duas fases, a primeira consistiu em estudos químicos e bioquímicos e a segunda em ensaios biológicos, o qual foi realizado com o auxílio de culturas celulares, sendo, um grupo composto de uma linhagem tumoral e o outro grupo compreendido por uma linhagem de células normais.

No âmbito dos ensaios bioquímicos, foram realizados vários experimentos com o objetivo de visualizar e quantificar a produção de EROs e produtos de suas interações. Nos experimentos envolvendo o monitorado do consumo de O₂, a associação de VC com a naftoquinona BrQ se mostrou mais eficiente em relação as outras naftoquinonas testadas (MQ e VK₃), situação esta provavelmente relacionada ao seu maior potencial de redução influenciado pela presença do substituinte Br, como já sugerido por Verrax et al. (2005), em seus estudos com VK₃ e VC. De fato, a presença de grupos que retiram elétrons no anel

aromático aumenta o seu potencial redox e, por consequência, a capacidade pró-oxidante dos mesmos (KANEGAE et al., 2007). Além disso, estudos da relação entre estrutura química e atividade biológica com várias naftoquinonas mostraram que a presença de grupos retiradores de elétrons, aumentam o poder antiploriferativo das mesmas em algumas linhagens de células tumorais (DEEPAK BHASIN et al., 2013). Diante disso, acreditamos que o uso de BrQ, o qual nunca foi utilizado no contexto aqui empregado, poderá trazer novas aplicações como agente quimioterápico.

Concordando com os resultados apresentados pelo monitoramento do O_2 , a associação BrQ/VC também se mostrou mais eficiente na produção de H_2O_2 em relação as naftoquinonas estudadas. O aumento na produção de H_2O_2 foi dependente da concentração de VC. Além disso, a velocidade de formação de H_2O_2 não sofreu influência pela SOD, o que pode ser explicado considerando que a etapa lenta da reação é a formação de $O_2^{\cdot-}$ e não a dismutação deste à H_2O_2 .

O $O_2^{\cdot-}$ consiste em produto intermediário na produção de H_2O_2 , caracterizado como um radical extremamente deletério ao nosso organismo e com meia vida muito curta (GILBERT; COLTON, 1999). Esta espécie reativa foi quantificada pelo monitoramento da redução do citocromo c, comprovando sua formação e concluindo o caminho de formação da EROs (H_2O_2).

A análise das naftoquinonas testadas em associação com VC indicou maior eficiência frente aquelas testadas isoladamente, sendo que a associação BrQ/VC foi significativamente mais eficaz. Deste modo, a combinação de ácido ascórbico e naftoquinonas é uma forma de exacerbar a auto-oxidação do ácido ascórbico. Em outras palavras, as naftoquinonas agem como catalisador para estas reações (VERRAX et al., 2003). Do mesmo modo, segundo o presente estudo, houve pequeno consumo das naftoquinonas em associação com VC durante a reação ciclo redox. Contudo, considerando a produção de H_2O_2 no mesmo intervalo de tempo, a proporção $[H_2O_2] \mu M/min_{produzido}/[naftoquinona] \mu M/min_{consumido}$ foi 68 ± 11 e 5.8 ± 0.2 para BrQ e VK₃, respectivamente, a qual revelou uma alta capacidade catalítica do composto BrQ para a auto-oxidação do ácido ascórbico.

O status redox celular é dependente da concentração de GSH, que corresponde por mais de 90% de grupamentos tióis na célula. A maior parte de GSH está presente no citosol, no entanto, uma pequena porcentagem, mas não menos importante, ($10 \pm 15\%$ do GSH total) está localizado nas mitocôndrias (FERNANDEZ-CHECA et al., 1997). Neste

sentido, vários trabalhos têm reportado a influência da geração de EROs na depleção de GSH (VERRAX et al., 2005; ARMSTRONG et al., 2002; FERNANDEZ VILLAMIL et al., 2012; FISHER-WELLMAN et al., 2013), configurando assim, um prejuízo em reserva de antioxidante intracelular e formações de seus produtos como o GSSG, forma oxidada do GSH.

Considerando a importância desse antioxidante intracelular, estudos foram realizados para avaliar a interação dos compostos aqui estudados com o mesmo. A concentração remanescente de GSH tanto nas reações com BrQ e VK₃ foram altas, e a formação de seu produto de oxidação (GSSG) foi baixa para ambas as associações. Porém, a reação com GSH na associação de BrQ/VC apresentou formação de um produto de conjugação (Q-SG) em alta concentração, enquanto que na associação VK₃/VC a formação deste produto se mostrou próximo ao limite de quantificação.

É importante ressaltar que, mesmo com a formação de Q-SG, o que implica em um consumo parcial de BrQ, ainda é significativo a formação de EROs pela combinação BrQ/VC, visto que Q-SG também é capaz de promover a formação de EROs pela interação com VC. Assim, podemos dizer que, provavelmente, em um organismo, a produção de Q-SG não irá interferir na formação de H₂O₂, o que poderia comprometer os resultados.

O sucesso da combinação VK₃/VC também está relacionado ao fato de que as células tumorais têm uma capacidade aumentada de acumular VC em relação à células normais (LANGEMANN et al., 1989). Com efeito, uma característica de células tumorais é a absorção de dehidroascorbato (DHA) através de uma ou mais isoformas do transportador de glicose, incluindo GLUT1, GLUT3 ou de GLUT-4 (LIANG; JOHNSON; JARVIS, 2001). Esta forma oxidada de ascorbato é produzido no microambientes pró-oxidantes no entorno de tumores. Uma vez no interior de células tumorais, a vitamina C oxidada (DHA) retorna à forma VC pela semide-hidroascorbato reductase dependente de NADH ou de-hidroascorbato glutathione-redutase dependente (DE LAURENZI et al., 1995), que impedem o seu transporte reverso mantendo um gradiente de concentração favorável ao DHA, e, por conseguinte, resulta na acumulação de concentrações 100 vezes mais elevadas de VC em comparação com o meio extracelular (AGUS; VERA; GOLDE, 1999; LIANG; JOHNSON; JARVIS, 2001). Propomos que esta propriedade da combinação VK₃/VC também pode ser melhorada usando BrQ no lugar de seu protótipo, VK₃, uma vez que a oxidação de ácido ascórbico à de-hidroascorbato foi mais eficaz utilizando BrQ.

Outra diferença importante entre as células normais e tumorais é o aumento do uso da via glicolítica por este último (WARBURG, 1956). Por exemplo, o uso da combinação VK₃/VC provoca uma diminuição de 80% na respiração das células tumorais devido a uma inibição de 30% da atividade de desidrogenase de gliceraldeído -3- Fosfato (GAPDH) e 100% de depleção celular de NAD⁺ (GILLOTEAUX et al., 2010). O elevado nível de DHA também tem sido proposto para ser envolvido na inibição de outras enzimas nesta via metabólica, incluindo hexoquinase e desidrogenase de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (FIORANI et al., 2000; SAYED et al., 2013). Além dos altos níveis de EROs produzidos pela BrQ/VC, foi demonstrado que esta combinação pode esgotar a coenzima NADH pela reciclagem da vitamina C, o que poderia ter implicações diretas na via glicolítica (VERRAX et al., 2007, SAYED et al., 2013).

O funcionamento do corpo humano fundamenta-se em milhões de reações enzimáticas e a maioria delas é dependente de coenzimas. Este é o caso do redutor NADH, envolvido na transdução energética por meio de reações redox. A coenzima NADH, na sua forma fosforilada NADPH também cumpre outro papel da maior relevância, qual seja, a atuação como redutor para reciclagem de GSH. Ou seja, NADPH pode ser também considerado um antioxidante intracelular. Diante disso, nossos resultados que mostraram que a combinação VC/BrQ promove a oxidação de NADH, pode-se sugerir que este seja mais um mecanismo de ação das mesmas para alteração do status redox celular.

A elucidação de processos bioquímicos, que eventualmente fazem parte dos alvos de citotoxicidade da associação de naftoquinonas/VC, consiste no caminho inicial para os estudos biológicos. O esclarecimento de tais vias, mesmo que seja *in vitro*, aponta como tais drogas poderão se comportar *in vivo*, retratando, portanto, uma etapa requerida para triagem de novos fármacos de exploração racional. Em outras palavras, foi este o caminho por nós traçado para que pudéssemos identificar as combinações mais promissoras para os estudos posteriores em meio celular. Assim, em conjunto, os estudos apresentados até aqui, mostram que o composto BrQ foi significativamente mais eficaz do que VK₃ na geração de EROs e, além disso, poderia provocar a depleção de reservas antioxidantes celulares como o GSH e a coenzima NADH. Na Figura 34, resumimos todas as reações caracterizadas e promovidas pela associação destes compostos.

No intuito de exacerbar ainda mais a formação de H₂O₂ foi utilizado a molécula palmitado do ácido ascórbico (AP). O objetivo para utilização da mesma foi a sua maior lipossolubilidade, se comparado ao VC, e assim maior acessibilidade ao meio intracelular.

No entanto, a associação BrQ/AP foi menos eficiente do que BrQ/VC, no que diz respeito a geração de EROs. Além disso, o sua alta insolubilidade inviabilizou os estudos em cultura celular. Por esta razão, não fomos adiante com esta vertente de estudos.

Levando em conta a necessidade de análise em células para a evolução da presente pesquisa e comprovação da melhor eficiência na produção de H₂O₂ pela associação BrQ/VC, células de câncer de mama (MCF-7 BUS) e células normais de ovário de hamster chinês (CHO) foram alvos nestes estudos.

Todos os resultados de estudos celulares foram realizados com a técnica de coloração por sulforrodamina B (SRB) desenvolvido por Skehan e colaboradores em 1985 para medir a citotoxicidade induzida pela droga e consequente proliferação de células para aplicações de *screening* de drogas em grande escala (VOIGT, 2005). O ensaio baseia-se na capacidade do corante aniônico, SRB, ligar-se eletrostaticamente aos resíduos de aminoácidos básicos, corando as proteínas celulares remanescentes. O ensaio de SRB não é destrutivo e indefinidamente estável. Estes avanços práticos fazem do emprego de SRB um ensaio adequado e sensível para medir a citotoxicidade induzida por drogas, mesmo em aplicações em larga escala (VOIGT, 2005). Além disso, apresenta maior linearidade e estabilidade frente às células viáveis (KEEPERS et al., 1991).

As diferenças estatísticas entre os controles VC e VK₃ em relação a reações onde há associações das duas vitaminas, já era esperada, em razão da diferença de citotoxicidade já constar em vários trabalhos com variadas linhagens de células (NOTO et al., 1989; VENUGOPAL et al., 1996; ZHANG et al., 2001; VERRAX et al., 2003, 2004; CASTRO et al., 2008; CHEN et al., 2012). Portanto, utilizamos esta associação como um protótipo neste trabalho, comportando-se como uma espécie de controle, apesar de que, mesmo assim, foi incluído DMSO a 40% como controle positivo.

A linhagem celular de câncer de mama (MCF-7 BUS) foi derivada de uma efusão pleural de uma paciente com carcinoma mamário metastático, previamente tratado com radioterapia e terapia hormonal (SOULE et al., 1973). A MCF-7 BUS é uma linhagem responsiva a estrogênio (RASMUSSEN; NIELSEN, 2002).

Alguns estudos envolvendo a associação VK₃/VC utilizaram a linhagem MCF-7 como alvo para se avaliar a toxicidade (NOTO et al., 1989; DE LOECKER et al., 1993; DEJEANS et al., 2010), apresentando maior eficiência quando esta linhagem de células foi exposta às duas vitaminas concomitantemente, em concentrações em torno de 1:100 (VK₃/VC).

Seguindo esse panorama o presente trabalho apresentou resultados compatíveis aos autores citados acima, com a ressalva que a linhagem aqui avaliada foi a MCF-7 BUS. A concentração que se mostrou com maior proporção de morte celular foi a concentração 1 (10:1000, $\approx 70\%$) muito similar ao controle positivo.

A combinação da naftoquinona BrQ com VC apresentou a mesma característica em comparação à VK₃/VC, porém a concentração 3 (4 vezes menor para VK₃ e 2 vezes menor para VC em relação à concentração 1) também apresentou proporção de morte celular alta ($\approx 62\%$).

Comparando as duas associações, a BrQ/VC se mostra com uma vantagem no que se diz respeito à morte celular, visto que esta foi consideravelmente mais citotóxica mesmo nas concentrações menores testadas (2, 3 e 4).

A maior diferença de morte celular, quando comparamos as associações, foi apresentada na concentração 3, mas a maior razão (2,3 - BrQ:VC/VK₃:VC) foi encontrada na concentração 4 (concentração 4 vezes menor em relação à concentração 1 para ambas as substâncias), mostrando que tais resultados estão de acordo com aqueles apresentados nos estudos químicos, onde o BrQ/VC demonstrou uma eficiência no consumo de oxigênio igual a VK₃/VC, no entanto, em concentrações 100 vezes menor, o que poderia, eventualmente, inferir em menores efeitos adversos em estudos *in vivo*.

Como já mencionado neste trabalho, o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer baseia-se na seletividade de sua atuação, apresentando, necessariamente, toxicidade frente às células cancerígenas e menor ou nenhuma toxicidade para células as normais (PELICANO; CARNEY; HUANG, 2004; LÓPEZ-LÁZARO, 2010).

Muitas publicações são encontradas com relação à citotoxicidade de VK₃/VC em células tumorais, mas há escassez de referências mostrando a seletividade desta associação (KITANO et al., 2012). Já quando falamos da associação BrQ/VC, não foram encontradas publicações, até o momento, a respeito de ambas vertentes.

Com relação à verificação de seletividades por células normais frente às associações estudadas, foi realizado extenso esforço para a utilização da linhagem de célula normal de mama (MCF-10A). Tal processo se tornou inviável diante da falta de reprodutividade nos experimentos. Por isso, esta etapa foi realizada com a linhagem de Ovário de Hamster Chinês (CHO do inglês *chinese hamster ovary*), também qualificadas como células normais.

As células CHO são utilizadas para uma variedade de experimentos: estudos genéticos, citotoxicidade e *screening* toxicológico, nutrição e expressão de genes, em particular, na expressão de proteínas recombinantes, sendo característica importante, a sua aplicabilidade variada por adaptação em condições diversas de cultura (JAYAPAL, et al., 2007; WURM; HACKER, 2011).

Na exposição de VK₃/VC em célula de linhagem normal estudada, a toxicidade se apresentou em torno de 28% para a concentração 2 e 9,8% para a concentração 4.

Com relação à combinação BrQ/VC a maior proporção de morte se apresentou na concentração 1 (37,9%) e a menor para a concentração 4 (14,1%). Diferentemente de VK₃/VC, a associação BrQ/VC se mostrou dose dependente.

Além disso, quando comparamos os grupos VK₃/VC em relação a BrQ/VC para as células CHO, nota-se uma significância na concentração 1, mas esta não é detectada nas concentrações menores.

Verificando a possível seletividade entre células de linhagem tumoral e normal, a associação VK₃/VC apresentou seletividade em todas as concentrações testadas, com maior razão (3,0 - MCF-7 BUS/CHO) para a concentração 1.

Com relação à associação BrQ/VC, da mesma forma, em todas as concentrações observou-se seletividade, mas com um diferencial de extrema importância, condizente à maior razão encontrada (2,9 - MCF-7 BUS/CHO) na concentração 4. Tal aspecto configura uma vantagem na utilização da associação de VC com a naftoquinona BrQ, sendo que sua citotoxicidade em células tumorais apresentou proporções interessantes na menor concentração testada (mostra 2 vezes maior - em relação à VK₃/VC), e esta mesma concentração se configurou com menor nível de citotoxicidade para células de linhagem normal.

6. CONCLUSÕES

Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência.

(Augusto Cury)

Feliz é aquele que escolhe um dos caminhos da vida e colhe seu ônus e glórias.

E na hora da dificuldade não olha para trás e se questiona como seriam os outros caminhos.

- BrQ foi a molécula que em associação com VC apresentou maior proporção no consumo de oxigênio, entre 5 a 10 vezes a maior, e produção de H₂O₂ superior a 95%, em relação às outras associações de VC com naftoquinonas estudadas inicialmente. Mostrando assim que BrQ é um potente gerador de ânion superóxido na presença de VC;
- Tanto VK₃ como BrQ foram consumidos na reação com VC, sendo que a associação com o composto BrQ apresentou maior consumo, mas também a maior produção de H₂O₂;
- Houve interação das duas naftoquinonas (VK₃ e BrQ) com GSH produzindo GSSG e um produto gerado pela associação com a naftoquinona (Q-SG). Sendo este produzido principalmente na associação com BrQ;
- O Q-SG não prejudicou a produção de ânions superóxido, pois este também consumiu oxigênio em grandes proporções;
- A reação de ciclo redox entre VC e as naftoquinonas (VK₃ e BrQ) promoveu a oxidação do NADH o que indica uma reciclagem do ácido ascórbico potencializando o ciclo e eventual comprometimento da via glicolítica.
- O par redox BrQ/VC se mostrou mais eficiente que o par VK₃/VC em cultura de células tumorais (MCF-7), principalmente em concentrações menores.
- As associações BrQ/VC e VK₃/VC foram menos citotóxicas frente a linhagem de célula normal (CHO), configurando em ambas, a presença de seletividade.
- O par redox BrQ/VC se apresentou com maior seletividade em relação ao par VK₃/VC.
- A associação BrQ/VC apresenta seletividade na citotoxicidade nas menores concentrações avaliadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

*“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”*

(Cora Coralina)

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

AMIRI, K. I., RICHMOND, A. Role of nuclear factor-kappa B in melanoma, **Cancer Metast. Rev.**, v. 24, p. 301–313, 2005.

ANDRIANTSITOHAINA, R., DULUC, L., GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. C, GIL-DEL VALLE, L., GUEVARA-GARCIA, M., SIMARD, G., SOLETI, R., SU, D. F., VELÁSQUEZ-PÉREZ, L., WILSON, J. X., LAHER, I. Systems biology of antioxidants. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 123, p. 173-192, 2012.

ARIS, R. M., MERKEL, P. A., BACHRACH, L. K., BOROWITZ, D. S., BOYLE, M. P., ELKIN, S. L., GUISE, T. A., HARDIN, D. S., HAWORTH, C. S., HOLICK, M. F., JOSEPH, P. M., O'BRIEN, K., TULLIS, E., WATTS, N. B., WHITE, T. B. Guide to bone health and disease in cystic fibrosis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 90, p. 1888–1896, 2005.

ARMSTRONG, J.S., STEINAUER, K. K., HORNUNG, B., IRISH, J. M., LECANE, P., BIRRELL, G. W., PEEHL, D. M., KNOX, S. J. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. **Cell Death Differ.**, v. 9, p. 252-63, 2002.

BARTON, G.M.G., ROATH, O.S. Leucocyte ascorbic acid in abnormal leucocyte states. **J. Clin. Pathol.**, v. 29, p. 86-, 1976.

BECK, R., VERRAX, J., DEJEANS, N., TAPER, H., CALDERON, P. B. Menadione reduction by pharmacological doses of ascorbate induces an oxidative stress that kills breast cancer cells. **Int. J. Toxicol.**, v. 28, p. 33-42, 2009.

BENSAAD, K., VOUSDEN, K. H. Savior and slayer: the two faces of p53. **Nat. Med.**, v. 11, p. 1278-1279, 2005.

BISHOP, J.M. The molecular genetics of cancer. **Science**. v.235, p.305–11, 1987.

BODANSKY, O., WROBLESKI, D., MAKARDT, B. Concentration of ascorbic acid in plasma and white cells of patients with cancer and noncancerous chronic diseases. **Cancer Res.** v.11, p. 238–242, 1951.

BOVERI, T. Concerning the origem of malignant tumors by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. **J. Cell Sci.**, v 121 (suppl. 1), p 1-84, 2008.

CALDERON, B.P., CADROBBI, J., MARQUES, C., HONG-NGOC, N., JAMISON, J.M., GILLOTEAUX, J., SUMMERS, H.S., TAPER, H.S. Potential therapeutic application of the association of Vitamins C and K3 in cancer treatment. **Curr. Med. Chem.**, v. 9, p. 2271–2285, 2002.

CAMERON, E., POULING, L., LEIBOVITZ, B. Ascorbic Acid and cancer: A review1. **Cancer Res.**, v. 39, p. 663-681, 1979.

CAMERON, E.; PAULING, L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: prolongation of survival times in terminal human cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.73, p. 3685-3689, 1976.

CAMERON, E.; PAULING, L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.75, p. 4538-4542, 1978.

CASTRO, F.A.V., MARIANI, D., PANEK, A.D., ELEUTHERIO, E.C.A., PEREIRA, M. D. Cytotoxicity Mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Plos. One.**, v. 3, p. 1-6, 2008.

CATALANO, V., TURDO, A., DI FRANCO, S., DIELI, F., TODARO, M., STASSI, G. Tumor and its microenvironment: A synergistic interplay. **Semin. Cancer Biol.**, 4 September 2013.

CHEN, J., JIANG, Z., WANG, B., WANG, Y., HU, X. Vitamin K₃ and K₅ are inhibitors of tumor pyruvate kinase M2. **Cancer Letters**, v.316, p. 204-210, 2012.

CHEN, M. F., YANG, C. M., SU, C. M., LIAO, J. W., HU, M. L. Inhibitory effect of vitamin C in combination with vitamin K₃ on tumor growth and metastasis of Lewis lung carcinoma xenografted in C57BL/6 mice. **Nutr. Cancer.**, v. 63, p. 1036-1043, 2011.

CHUNG-MAN, H.J., ZHENG, S., COMHAIR, S.A., FARVER, C., ERZURUM, S.C. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. **Cancer Res.**, v. 61, p. 8578-8585, 2001.

CRANDON, J.H., MIKAL, S., LANDEAU, B.R. Ascorbic acid economy in surgical patients. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 92, p. 246-267, 1961.

CRANDON, J.H., MIKAL, S., LANDEAU, B.R. Ascorbic-acid deficiency in experimental and surgical subjects. Lind Bicentenary Symposium. **Proc. Nutr. Soc.** v. 12, p. 274-279, 1953.

DAVI, G.S., PRASAD, M.H., SARASWATHI, I., RAGHU, D., RAO, D.N., REDDY, P.P. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. **Clin. Chim. Acta.** v. 293, p. 53-62, 2000.

DE LAURENZI, V., MELINO, G., SAVINI, I., ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M., FINAZZI-AGRIB, A., AVIGLIANO, L. Cell Death by Oxidative Stress and Ascorbic Acid Regeneration in Human Neuroectodermal Cell Lines. **Eur. J. Cancer**, v. 31, p. 463-466, 1995.

DE LOECKER, W.; JANSSENS, J.; BONTE, J.; TAPER, H.S. Effects of sodium ascorbate (vitamin C) and 2-methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K3) treatment on human tumor cell growth in vitro. Synergism with combined chemotherapy action. **Anticancer Res.**, v.13, p.103-106, 1993.

DEEPAK, B., CHETTIAR, S. N., ETTER, J. P., MOK, M., LI, P. K. Anticancer activity and SAR studies of substituted 1,4-naphthoquinones. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 21, p. 4662-4669, 2013.

DEJEANS, N.; TAJEDDINE, N.; BECK, R.; VERRAX, J.; TAPER, H.; GAILLY, F.; CALDERON, P. Endoplasmic reticulum calcium release potentiates the ER stress and cell death caused by an oxidative stress in MCF-7 cells. **Biochem. Pharmacol.**, v.79, p.1221–1230, 2010.

DIETER, S. M., BALL, C. R., HOFFMANN, C. M., NOWROUZI, A., HERBST, F., ZAVIDIJ, O., ABEL, U., ARENS, A., WEICHERT, W., BRAND, K., KOCH, M., WEITZ, J. R., SCHMIDT, M., KALLE, C. V., GLIMM1, H. Distinct Types of Tumor-Initiating Cells Form Human Colon Cancer Tumors and Metastases. **Cell Stem Cell**, v. 9, p. 357–365, 2011.

DUARTE, T.L., LUNEC, J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. **Free Radic. Res.**, v. 39, p. 671-686, 2005.

EL-BENNA, J., DANG, P.M., GOUGEROT-POCIDALO, M.A., ELBIM, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Arch Immunol. Ther. Exp. (Warsz)**, v.53, p.199-206, 2005.

EMONS, G., GHADIMI, M., GRADE, M. General Principles of Tumour Biology in Visceral Surgery. **Zentralbl. Chir.**, v.5, 2013.

FERNANDEZ VILLAMIL, S. CARRIZO, P.H.; DI ROSSO, M.; PORTELA, M.M.;DUBIN, M. The metabolism of 9-chloro-b-lapachone and its effects in isolated hepatocytes. The involvement of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1). **Chemic. Biol. Interac.**, v.200, p.84–91, 2012.

FERNANDEZ-CHECA, J. C, KAPLOWITZ, N., GARCIA-RUIZ, C., COLELL, A., MIRANDA, M., MARI, M., ARDITE, E., MORALES, A. GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p.7-17, 1997.

FIORANI, M., DE SANCTIS, R., SCARLATTI, F., VALLORANI, L., DE BELLIS, R., SERAFINI, G., Bianchi, M., Stocchi, V. Dehydroascorbic acid irreversibly inhibits hexokinase activity. **Mol. Cell Biochem.**, v. 209, p. 145-153, 2000.

FISHER-WELLMAN, K. H.; GILLIAM, L. A.; LIN, C. T.; CATHEY, B. L.; LARK, D. S.; NEUFER, P. D. Mitochondrial glutathione depletion reveals a novel role for the pyruvate dehydrogenase complex as a key H₂O₂-emitting source under conditions of nutrient overload. **Free Radic. Biol. Med.**, v.65, p.1201–1208, 2013.

GANT, T.W., RAO, D.N.R., MASON, R.P., COHEN, G.M. Redox cycling and sulphydryl arylation; their relative importance in the mechanism of quinine cytotoxicity to isolated hepatocytes. **Chem. Biol. Interact.**, v. 65, p. 157-173, 1988.

GERALD D, BERRA E, FRAPART YM, CHAN DA, GIACCIA AJ, MANSUY, D. GERSCHMAN, R., GILBERT, D. L., NYE, S. W., DWYER, P., FENN, W. O. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. **Science**, v. 119, p. 623-626, 1954.

GILBERT, D. L. From the Breath of life to Reactive Oxygen Species. In GILBERT, D. L., COLTON, C. A. *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. New York: Spring, 3-31, 1999.

GILLOTEAUX J, JAMISON JM, LORIMER HE, JARJOURA D, TAPER HS, CALDERON PB ET AL. Autoschizis: a new form of cell death for human ovarian carcinoma cells following ascorbate: menadione treatment nuclear and DNA degradation. **Tissue & Cell**. v. 36, p. 197-210, 2004.

GILLOTEAUX, J. JAMISON, M.J.; ARNOLD, D.; ERVIN, E.; DOCHERTY, J.J.; NEAL, D.; et al. Cancer cell necrosis by autoschizis: synergism of antitumor activity of

vitamin C: vitamin K₃ on human bladder carcinoma T24 cells. **Scanning** 1998; 20: 564-575.

GILLOTEAUX, J., JAMISON, M. J., NEAL, D. R., LOUKAS, M., DOBERZSTYN, T., SUMMERS, J. L. Cell damage and death by autschizis in human bladder (RT4) carcinoma cells resulting from treatment with ascorbate and menadione. **Ultrastruct. Pathol.**, v. 34, p. 140-160, 2010

GOGVADZE, V., ZHIVOTOVSKY, B., ORRENIUS, S. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. **Mol. Asp. Med.**, v. 31, p. 60-74, 2010.

GOLDFARB, M.; SHIMIZU, K.; PERUCHO, M.; WIGLER, M. Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. **Nature**. v.296, p.404-9, 1982.

GROTE, K., ORTMANN, M., SALGUERO, G., DOERRIES, C., LANDMESSER, U., LUCHTEFELD, M., BRANDES, R.P., GWINNER, W., TSCHERNIG, T., BRABANT, E.G., KLOS, A., SCHAEFER, A., DREXLER, H., SCHIEFFER, B. Critical role for p47phox in renin-angiotensin system activation and blood pressure regulation. **Cardiovasc. Res.**, v.71, p.596-605, 2006.

HANAHAN, D., COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, v.21, p. 309-322, 2012.

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, p.646-674, 2011

HARMAN, D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. **J. Gerontol.**, v. 11, p. 298-300, 1956.

HEY, E. Vitamin K—what, Why, and when, **Arch. Dis. Child Fetal Neonatal**, v. 88, p. 80–83, 2003.

HILEMAN, E.O., LIU, J., ALBITAR, M., KEATING, M.J., HUANG, P. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 53, p. 209-219, 2004.

HIROTA K, MATISUI M, IWATA S, NISHIYAMA A, MORI K, YODOI J. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thiredoxin and Ref-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 94, p. 3633-3638, 1997.

HUANG, P., FENG, L., OLDHAM, E.A., KEATING, M.J., PLUNKETT, W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. **Nature.** v. 407, p. 390–395, 2000.

HUG, H., STRAND, S., GRAMBIHLER, A., GALLE, J., HACK, V., STREMMEL, W., KRAMMER, P.H., GALLE, P.R. Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 28191–28193, 1997.

JAYAPAL, K.P.; WLASCHIN, K.; HU, W.S. Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells — 20 Years and Counting. **Chem. Eng. Prog.**, v.103, n.10, p.40-47, 2007.

JIANG, Y., YANG, J., YANG, C., MENG, F., ZHOU, Y., YU, B., KHAN, M., YANG, H. Vitamin K4 induces tumor cytotoxicity in human prostate carcinoma PC-3 cells via the mitochondria-related apoptotic pathway. **Pharmazie**, v. 68, p. 442-448, 2013.

KAND'ÁR, R., ZÁKOVÁ, P., LOTKOVÁ, H., KUCERA, O., CERVINKOVÁ, Z. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 43, p. 1382-1387, 2007.

KANEGAE, M. P., DA FONSECA, L. M., BRUNETTI, I. L., SILVA, S. O., XIMENES, V. F. The reactivity of ortho-methoxy-substituted catechol radicals with sulfhydryl groups: contribution for the comprehension of the mechanism of inhibition of NADPH oxidase by apocynin. **Biochem. Pharmacol.**, v. 74, p. 457-464, 2007.

KANG, D., HAMASAKI, N. Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 41, p. 1281–1288, 2003.

KAVITHA, C. V., DEEP, G., GANGAR, S. C., JAIN, A. K., AGARWAL, C., AGARWAL, R. Silibinin Inhibits Prostate Cancer Cells- and RANKL-Induced Osteoclastogenesis by Targeting NFATc1, NF-kB, and AP-1 Activation in RAW264.7 Cells. **Mol. Carcinog.**, P. 1-12, 2012.

KEEPERS, Y. P., PIZAO, P. E., PETERS, G. J., VAN ARK-OTTE, J., WINOGRAD, B., PINEDO, H. M. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. **Euro. J. Cancer**, v.27, p. 1717, 1991.

KIM, M. K., LEE, J. S., KIM, K. Y., LEE, H. G. Ascorbyl palmitate-loaded chitosan nanoparticles: Characteristic and polyphenol oxidase inhibitory activity. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v. 103, p. 391–394, 2013.

KITAGAWA, R.R., FONSECA, L.M, XIMENES, V.F., KHALIL, N.M., VILEGAS, W., RADDI, M.S.G. Ascorbic acid potentiates the cytotoxicity of the naphthoquinone 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin. **Phytochemistry**. v. 69, p. 2205-2208, 2008.

KITANO, T.; YODA, H.; TABATA, K.; MIURA, M.; TORIYAMA, M.; MOTOHASHI, M.; SUZUKI, T. Vitamin K3 Analogs Induce Selective Tumor Cytotoxicity in Neuroblastoma. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 35, n.4, p. 617–623, 2012.

KLAUNIG, J.E., KAMENDULIS, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 44, p.239-267, 2004.

KONG, Q., BEEL, J.A., LILLEHEI, K.O. A threshold concept for cancer therapy. **Med. Hypotheses**. v. 55, p. 29–35, 2000.

KONG, Q., LILLEHEI, K.O. Antioxidante inhibitors for cancer therapy. **Med. Hypotheses**. v. 51, p. 405-409, 1998.

KOVACIC, P., OSUNA, J.A. Jr. Mechanisms of anti-cancer agents: Emphasis on oxidative stress and electron transfer. **Curr. Pharm. Des.** v, 6, p. 277-309, 2000.

KUIPER, C., MOLENAAR, I. G. M., DACHS, G. U., CURRIE, M. J., SYKES, P. H., VISSERS, M. C. M. Low ascorbate levels are associated with increased hypoxia-inducible factor-1 activity and an aggressive tumor phenotype in endometrial cancer. **Cancer Res.**, v. 70, p. 5749-5758, 2010.

LAMSON, D.W, PLAZA, S.M. The anticancer effect of vitamin K. **Altern. Med. review.** v. 8, p.303-318, 2003.

LANGEMANN, H., TORHORST, J., KABIERSCHE, A., KRENGER, W., HONEGGER, C.G. Quantitative determination of water- and lipidsoluble antioxidants in neoplastic and non-neoplastic human breast tissue. **Int. J. Cancer.** v. 43, p. 1169-1173, 1989.

LIANG, W. J., JOHNSON, D., JARVIS, S. M. Vitamin C transport systems of mammalian cells. **Mol. Membr. Biol.**, v. 18, p. 87-95, 2001.

LIQUID CRYSTAL INSTITUTE. Liquid Crystals Pharmaceuticals. 2008. Disponível em: <http://www.lci.kent.edu/lcp_apatone.htm>. Acesso em: 11 out. 2013.

LÓPEZ-LÁZARO, M. A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. **Mol. Med.**, v. 16, p. 144-153, 2010

LÓPEZ-LÁZARO, M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. **Cancer Lett.**, v. 252, p. 1-8, 2007.

LÓPEZ-LÁZARO, M. HIF-1: hypoxia-inducible factor or dysoxia-inducible factor?. **FASEB J.**, v. 20, p. 828-832, 2006.

LOYD, V., DAVIS, P.S. EMERY, H., LAUDER, H. Platelet ascorbic acid levels in normal subjects and in diseases. **J. Clin. Pathol.**, v. 25, p. 478-483, 1972.

HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., HARRIS, C.C. p53 Mutations in human cancer, **Science**, v 253, p. 49–53, 1991.

MAKI, A.; BEREZESKY, I.K.; FARGOLNI, J.; HOLBROOK, N.J.; TRUMP, B.F. Role of $[Ca^{2+}]_i$ in induction of c-Fos, c-Jun, and c-Myc messenger-RNA in rat Pte after oxidative stress. **FASEB J.**, v.6 p.919–924, 1992.

MARCH J. *Advanced Organic Chemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1982.

MAY, J.M.; QU, Z.; COBB, C.E. Accessibility and reactivity of ascorbate 6-palmitate bound to erythrocyte membranes. **Free Rad. Biol. Med.**, v.21, p.471-480, 1996.

MCCORD, J. M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, p. 6049–6055, 1969.

MECHTA-GRIGORIOU F. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. **Cell**. v.118, 781-794, 2004.

MILLER, Jr., W.H. Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells. **Oncologist**. v. 7, p.14–29, 2002.

MITCHELL J.S, SIMON-REUSS I. Combination of some effects of x-radiation and a synthetic vitamin K substitute. **Nature**. v.160. p. 98-99, 1947.

MITCHELL J.S. Clinical trials of tetra-sodium 2-methyl-1: 4-naphthohydroquinone diphosphate, in conjunction with x-ray therapy. **Brit. J. Can.**, v. 2, p. 351-359, 1948.

MIYAJIMA, A., NAKASHIMA, J., YOSHIOKA, K., TACHIBANA, M., TAZAKI, H., MURAI, M.. Role of reactive oxygen species in *cis*-dichlorodiammineplatinum- induced cytotoxicity on bladder cancer cells. **Br. J. Cancer**., v. 76, p. 206–210, 1997.

MOUKHARSKAYA, J., VERSCHRAEGEN, C. Topoisomerase 1 inhibitors and cancer therapy. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 26, p. 507-525, 2012.

MULLER, F. L., LIU, Y., VAN REMMEN, H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 49064–49073, 2004.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem. J.**, v. 417, p.1–13, 2009.

NICCO, C., LAURENT, A., CHEREAU, C., WEILL, B., BATTEUX, F. Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species. **Biomed. Pharmacother.** v. 59, p. 169-174, 2005.

NOTO, V., TAPER, H.S, YI-HUAN, J., JANSSENS, J., BONTE, J., LOECKER, W. Effects of sodium ascorbate (vitamin C) and 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone (vitamin K) treatment on human tumor cell growth in vitro.I. Synergism of combined vitamin C and K₃ action. **Cancer.** p. 901-906, 1989.

OBERLEY TD, OBERLEY LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. **Histol. Histopathol.**, v. 12, p. 525–535, 1997.

ORANGE, J. S., LEVY, O., GEHA, R. S. Human disease resulting from gene mutations that interfere with appropriate nuclear factor kappaB activation. **Immunol. Rev.**, v. 203, p. 21–37, 2005.

PADAYATTY, S.J., SUM, H., WANG, Y., RIORDAN, H.D., HEWITT, S.M., KATZ, A., WESLEY, R.A., LEVINE, M. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. **Ann. Intern. Med.** v. 140, p. 533-537, 2004.

PARADA, L.F.; TABIN, C.J.; SHIH, C.; WEINBERG, R.A. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. **Nature**, v.297, p.474–8, 1982.

PARKINSON, A. Biotransformation of Xenobiotics. In KLASSEN, C. D., Casarret Doull's Toxicology: the basic science of poison. ed. 8. New York: McGraw-Hill, p. 133-222, 2013.

PÉEZ-SACAU, E., DIAZ-PEÑATE, R.G., ESTÉVEZ-BRAUN, A., RAVELO, A.G., GARCIA-CASTELLANO, J.M., PARDO, L., CAMPILLO, M. Synthesis and pharmacophore modeling of naphthoquinone derivatives with cytotoxic activity in human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. **J. Med. Chem.**, v. 50, p. 696–706, 2007.

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

RASMUSSEN, T. H.; NIELSEN, J. B. Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (*E-Screen*). **Biomarkers**, v. 7, p.322 - 336, 2002.

REDDY, E.P.; REYNOLDS, R.K.; SANTOS, E.; BARBACID, M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. **Nature**. V.300, p.149–52, 1982.

ROOSEBOOM, M., COMMANDEUR, J.N.M., VERMEULEN, N.P.E. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. **Pharmacol. Rev.** v. 56, p. 53-94, 2004.

SAYBASILI, H., YUKSEL, M., HAKLAR, G., YALCIN, A.S. Effect of mitochondrial electron transport chain inhibitors on superoxide radical generation in rat hippocampal and striatal slices. **Antioxid. Redox Signal**. v. 3, p. 1099–1104, 2001.

SAYED, S.M.; MAHMOUD, A.A.; SAWY, S.A.; ABDELAAL, E. A.; FOUAD, A.M.; YOUSIF, R.S.; HASHIM, M.S.; HEMDAN, S.B.; KADRY, Z.M.; ABDELMOATY, M.A.; GABR, A.G.; OMRAN, F.M.; NABO, M.M.; AHMED, N.S. Warburg effect increases steady-state ROS condition in cancer cells through decreasing their antioxidant capacities (Anticancer effects of 3-bromopyruvate through antagonizing Warburg effect). **Med. Hypoth.**, 4 September 2013

SCHILIRÒ, T.; GORRASI, I.; LONGO, A.; COLUCCIA, S.; GILLI, G. Endocrine disrupting activity in fruits and vegetables evaluated with the *E-screen* assay in relation to pesticide residues. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 127, p. 139-46, 2011.

SEMENZA, G. L. Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. **Cancer Cell**, v. 5, p. 405-406, 2004.

SIDDHARTHA M. The Emperor of All Maladies: A Biography of Cancer. New York: Simon & Schuster, 2011.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.82, p. 1107 - 1112, 1990.

SOULE, H. D.; VASQUEZ, J.; LONG, A.; ALBERT, S.; BRENNAN, M. J. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.51, p. 1409- 1413, 1973.

STANBRIDGE, E.J. Identifying tumor suppressor genes in human colorectal cancer. **Science**. v.247, p.12–3, 1990.

STARKOV, A. A., FISKUM, G., CHINOPOULOS, C., LORENZO, B. J., BROWNE, S. E., PATEL, M. S., BEAL, M. F. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. **J Neurosci**, v. 24, p.7779-7788, 2004.

STORZ, P. Reactive oxygen species in tumor progression. **Font. Biosci.**, v10, p. 1881-1896, 2005.

SUN Y, OBERLEY LW, ELWELL JH, SIERRA-RIVERA E. Antioxidant enzyme activities in normal and transformed mouse liver cells. **Int. J. Cancer**. v. 44, p. 1028–1033, 1989.

SZATROWSKI, T.P., NATHAN, C.F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. **Cancer Res.**, v. 51, p. 794-798, 1991.

TAHARA, E. B., NAVARETE, F. D. AND KOWALTOWSKI, A. J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 46, p. 1283–1297, 2009.

TAPER, H. S. Altered Deoxyribonuclease Activity in Cancer Cells and its Role in Non Toxic Adjuvant Cancer Therapy with Mixed Vitamins C and K₃. **Anticancer Res.**, v. 28, p. 2727-2732, 2008.

TAPER, H.S., JAMISON, J.M., GILLOTEAUX, J., GWIN, C.A., GORDON, T., SUMMERS, J. *In vivo* reactivation of DNases in implanted human prostate tumors after administration of a vitamin C/K₃ combination. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 49, p. 109-120, 2001.

TAPER, H.S., JAMISON, J.M., GILLOTEAUX, J., SUMMERS, J., CALDERON, P. B. Inhibition of the development of metastases by dietary vitamin C: K₃ combination. **Life Sci.**, v. 75, p. 955-967, 2004.

TAPER, H.S., ROBERFROID, M. Non-toxic sensitization of cancer chemotherapy by combined vitamin C and K₃ pretreatment in a mouse tumor resistant to oncovin. **Anticancer Res.**, v.12, p.1651-1654, 1992.

TARREN, B., SUMMERS, J. L., JAMISON, J. M., NEAL, D. R., MCGUIRE, K., GERSON, L., DIOKNO, A. A 12 week, open label, phase I/II a study using Apatone[®] for the treatment of prostate cancer patients who have failed standard therapy. **Int. J. Med. Sci.**, v. 5, p. 62-67, 2008.

TATARKOVA, Z., KUKA, S., PETRÁŠ, M., RAČAY, P., LEHOTSKÝ, J., DOBROTA, D., KAPLAN, P. Why mitochondria are excellent targets for cancer therapy. **Klin. Onkol.**, v. 25, p. 421-426, 2012.

THANNICKAL, V. J., FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 279, p. 1005-1028, 2000.

THIENELT; GREEN; BOWLES, 2012. New and established tyrosine kinase inhibitors for chronic myeloid leukemia. *Drugs Today (Barc)*, v. 48, p. 601-613, 2012.

TOYOKUNI, S., OKAMOTO, K., YODOI, J., HIAI, H. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS Lett.** v. 358, p. 1-3, 1995.

TRIPALDI, R., STUPPIA, L., ALBERTI, S. Human height genes and cancer. **Bioch. Biophys. Acta**, V. 1836, p. 27-41, 2013.

TSANG, W.P., CHAU, S.P., KONG, S.K., FUNG, K.P., KWOK, T.T. Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. **Life Sci.**, v. 73, p. 2047-2058, 2003.

TSUKAGUCHI, H., TOKUI, T., MACKENZIE, B., BERGER, U. V., CHEN, X. Z., WANG, Y., BRUBAKER, R. F., HEDIGER, M. A. A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. **Nature**, v. 399, p. 70-75, 1999.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.D, MAZUR, M., TELSNER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 39, p. 44-84, 2007.

VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M. Free radicals, metal and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.** v. 160, p. 1-40, 2006.

VENUGOPAL, M., JAMISON, J.M., GILLOTEAUX, J., KOCH, J.A., SUMMERS, M., GIAMMAR, D., SOWICK, C., SUMMERS, J.L. Synergistic antitumor activity of vitamins C and K₃ on human urologic tumor cell lines. **Life Sci.**, v.59, p. 1389-1400, 1996.

VERRAX, J., CADROBBI, J., DELVAUX, M., JAMISON J.M., GILLOTEAUX, J. SUMMERS, J.L., TAPER, H.S., CALDERON, P. B. The association of Vitamins C and K₃ kills cancer cells mainly by autschizis, a novel form of cell death. Basis for their potential use as coadjuvants in anticancer therapy. **Eur. J. Med. Chem.**, v.38, p. 451–7, 2003.

VERRAX, J., CADROBBI, J., TAPER, H.S., HABRAKEN, Y., PIETTE, J., CALDERON, P. B. Ascorbate potentiates the cytotoxicity of menadione leading to an oxidative stress that kills cancer cells by a non-apoptotic caspase-3 independent form of cell death. **Apoptosis.** v. 9, p. 225–35, 2004.

VERRAX, J., DELVAUX, M., BEGHEIN, N., TAPER, H.S, GALLEZ, B, CALDERON, P. B. Enhancement of quinone redox cycling by ascorbate induce a caspase-3 independent cell death in human leukaemia cells. An in vitro comparative study. **Free Rad. Res.**, v. 396, p. 49–57, 2005.

VERRAX, J., STOCKIS, J., TISON, A., TAPER, H.S., CALDERON, P. B. Oxidative stress by ascorbate/menadione association kills K562 human chronic myelogenous leukaemia cells and inhibits its tumour growth in nude mice. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, p. 671-680, 2006.

VERRAX, J.; VANBEVER, S.; STOCKIS, J.; TAPER, H.S.; CALDERON, P.B. Role of glycolysis inhibition and poly(ADP-ribose) polymerase activation in necrotic-like cell death caused by ascorbate/menadione-induced oxidative stress in K562 human chronic myelogenous leukemic cells. **Int. J. Cancer.**, v.120, n.6, p. 1192-7, 2007.

VOIGT, W. Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. **Chemosensitivity – Meth. Mol. Med.**, v.110, p 39-48, 2005.

WALLACE, D. C. Mitochondria and Cancer. **Nature Rev. Cancer**, v 12, p. 685-698, 2012.

WALLACE, D. C. The epigenome and the mitochondrion: bioenergetics and the environment. **Genes Dev.**, v. 24, p. 1571–1573, 2010.

WARBURG, O. On the origin of cancer cell. **Science.** v 123, p 309-314. 1956.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Fact sheet n. 297, February 2009. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. Acesso em: 10/05/2012.

WURM, F.M.; HACKER, D. First CHO genome. **Nature Biotech.**, v.29, n.8, p.718-720, 2011.

ZHANG, W., NEGORO, T., SATOH, K., JIANG, Y., HASHIMOTO, K., KIKUCHI, H., NICHIKAWA, H., MIYATA, T., YAMAMOTO, Y., NAKANO, K., YASUMOTO, E., NAKAVACHI, T., MININO, K., SATOH, T., SAKAGAMI, H. Synergistic cytotoxic action of vitamin C and vitamin K₃. **Anticancer Res.**, v.21, p.3439-3444, 2001.

ZHOU, Y., HILEMAN, E.O., PLUNKETT, W., KEATING, M.J., HUANG, P. Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. **Blood.** V. 101, p. 4098–4104, 2003.

CAPÍTULO II

*“Que comece agora
E que seja permanente essa vontade de ir
além daquilo que me espera”.*
(Caio Fernando Abreu)