



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JOSIVANY VALÉRIO DE FREITAS

**AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA E
MUTAGÊNICA DE ARILAMINONAFTOQUINONAS
SINTÉTICAS.**

VITÓRIA, ES
2011

JOSIVANY VALERIO DE FREITAS

**AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DE
ARILAMINONAFTOQUINONAS SINTÉTICAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci.

VITÓRIA, ES
2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

F866a Freitas, Josivany Valério de, 1980-
Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica de
arilaminonaftoquinonas sintéticas / Josivany Valério de Freitas. –
2011.
89 f. : il.

Orientador: Maria do Carmo Pimentel Batitucci.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Toxicidade aguda. 2. Testes de mutagenicidade. 3.
Camundongo. 4. Naftoquinonas. 5. Artêmia salina. I. Batitucci,
Maria Hermenegilda Grasselli. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

“Avaliação Tóxica, Citotóxica e Mutagenica de Arilaminonaftoquinonas
Sintéticas”

JOSIVANY VALERIO DE FREITAS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada por:

Prof.ª. Dr.ª. Maria do Carmo Pimentel Batitucci (UFES)
Orientadora

Prof.ª. Dr.ª. Flávia de Paula (UFES)
Membro Interno

Prof.ª. Dr.ª. Maria Aparecida Marin Morales (UNESP)
Membro Externo

Vitória-ES, 16 de maio de 2011.

Aos meus pais Freitas e Genilda, que me deram a vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais pelo amor incondicional, compreensão, apoio e educação durante todo o meu percurso na Universidade e fora dela.

Aos meus irmãos Vinícius, Danilo e Felype por sempre estarem ao meu lado.

Ao Thiago pela paciência, compreensão e companheirismo em todos os momentos e situações.

À minha família, pelo carinho de sempre, em especial aos Tios Edmar, Gecenilda e Paulinho, não tenho palavras para agradecer e descrever o quão importante vocês são para mim e aos primos e primas por estarem ao meu lado desde a infância...

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci, pela paciência, ensinamentos, pelo exemplo de profissionalismo e principalmente pelo compromisso da aprendizagem contínua.

À amiga Maria do Carmo Pimentel Batitucci, pela compreensão, apoio nos momentos difíceis quase intermináveis, tanto pessoais, como profissionais, companheira de muitas risadas e reclamações, festas e outros encontros e principalmente pela confiança na minha capacidade me ajudando a crescer como pessoa e cientista.

À Prof^a. Dr^a. Flávia de Paula do Departamento de Ciências Biológicas – UFES, por estar sempre disposta a ouvir e ensinar e pela disponibilidade na leitura e sugestões neste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Marin Morales, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, pela disponibilidade na leitura e sugestões neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sandro Greco, do Departamento de Química – UFES, pelo fornecimento das amostras de arilaminonaftoquinonas.

À Prof^a. Dr^a. Claudia Masrouah Jamal, do Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFES, pela realização dos ensaios frente a larvas de *Artemia salina*.

Aos colegas de mestrado, da turma de 2009, companheiros de muitos momentos difíceis e divertidos.

Às amigas de graduação Maressa e Marianna por tudo que já vivemos juntas.

Aos colegas do Laboratório de Genética Vegetal e Toxicológica: Luciano, Anny, Tatiane Perdigão, Thatiane Lorena, Juliana, João, Fernanda, Irany e Jean, pela amizade, brincadeiras, pela ajuda imprescindível para a realização deste trabalho e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos mestres e a todos os funcionários e colegas do Departamento de Ciências Biológicas e do Núcleo de Biotecnologia – UFES.

À Universidade Federal do Espírito Santo, por todas as oportunidades de crescimento intelectual e profissional possibilitada a mim desde a graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

A aqueles que em mim acreditaram e me apoiaram em todos os momentos, tornando este trabalho possível.

Muito obrigada!

Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível,
e de repente você estará fazendo o impossível.

São Francisco de Assis

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Genética Vegetal e Toxicológica do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo.

RESUMO

FREITAS, J. V. **Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica de Arilaminonaftoquinonas sintéticas.** 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, Brasil, 2011.

A procura por novos agentes antitumorais tem se tornado produtos que sejam mais eficientes no combate às células anormais e menos agressivas às células normais. Nesta perspectiva, as quinonas vêm sendo exaustivamente estudadas nas últimas décadas devido às suas propriedades biorredutivas e participação no estresse oxidativo. Os estudos toxicológicos para a verificação da toxicidade aguda, citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade de diversas substâncias, principalmente quando visam à produção de novos medicamentos, são realizados através de bioensaios que avaliam os efeitos do agente testado sobre a célula e o material genético. Neste trabalho, propomos avaliar a toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade de três diferentes arilaminonaftoquinonas sintéticas pela determinação da DL_{50} em camundongos, citotoxicidade por *Artemia salina* e mutagenicidade pelo ensaio do micronúcleo. O ensaio para determinação da DL_{50} e o teste do micronúcleo foram realizados com camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*). Para o teste de DL_{50} os camundongos foram divididos em dez grupos experimentais e tratados por via intraperitoneal com solução de arilaminonaftoquinonas preparadas com DMSO/H₂O nas concentrações de 200, 500 e 1000 mg/Kg. O controle negativo (CN) foi feito com solução salina 0,9%. O ensaio do micronúcleo *in vivo* foi realizado em medula óssea de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) jovens, machos e fêmeas. Para o ensaio do micronúcleo, os animais foram divididos aleatoriamente em doze grupos (três animais do mesmo sexo por gaiola). Para cada uma das arilaminonaftoquinonas. 6 grupos receberam, via gavagem, Arilaminonaftoquinona sintética (A) e 6 grupos receberam DMSO. Os outros grupos receberam cisplatina (3mg.kg⁻¹ m.c., i.p.,CP), DMSO (0,005mL.g⁻¹ m.c.,CS) ou NaCl 0,9% (CN). Foram analisados o número de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) de cada teste. No teste de letalidade a larvas de *A. salina* as amostras foram dissolvidas em DMSO e completadas a

solução com água marinha artificial. Dessa solução foram preparada as diluições. Larvas em estágio metanauplii (10 unidades) foram adicionadas a cada tubo e as culturas foram incubadas por 24 horas. Controles DMSO (CN) e lapachol + DMSO (CP) foram incluídos no teste. A análise estatística foi realizada empregando-se o software Assistat[®] 7.5. A significância estatística foi realizada pela análise de variância a um critério e pelo teste de Tukey *a posteriori*, a 5% de probabilidade. Os dados obtidos pelo teste de DL₅₀ e de toxicidade frente a *A. Salina*, mostraram que as arilaminonaftoquinonas testadas são classificadas como nocivas e citotóxicas, respectivamente. Quanto ao teste de micronúcleo os resultados mostram que as diferentes concentrações de arilaminonaftoquinonas + DMSO não diferiram significativamente dos grupos CN e CS. O aumento da frequência de PCEMN ($P < 0,01$), observada no grupo CP em relação ao grupo CN, confirmou a sensibilidade do ensaio em detectar genotoxicidade *in vivo*.

Palavras-chave: Naftoquinonas, Toxicidade, Mutagenicidade, Micronúcleo, Camundongos, *Artemia salina*.

ABSTRACT

FREITAS, J. V. **Toxic, mutagenic and cytotoxic avaluation of synthetic arilaminonaftoquinones.** 2011. 90 s. Dissertation (Master Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011).

The search for new anticancer agents has become increasingly necessary, with a view to increased efficiency and reduced cytotoxic effect on normal tissues. In this perspective, quinones which are classified according to the aromatic system in its present structure, bearing a ring the naphthoquinones naphthalenic characteristic, have been extensively studied in recent decades due to their bioreductive properties and participation in oxidative stress. Toxicological studies for testing acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity of various substances, especially when aiming at producing new medicines, are performed by bioassays that evaluate the effects of the agent tested on the cell and genetic material. We propose to evaluate the toxicity, cytotoxicity and mutagenicity of arilaminonaftoquinones 1, 2 and 3 by synthetic determination of the LD50 in mice, cytotoxicity against *Artemia salina* larvae and the micronucleus. The test for LD50 determining was conducted in Swiss albino mice (*Mus musculus*) in which mice with body mass index between 25-45g, were divided into experimental groups (n = 10) and treated separately, with arilaminonaftoquinones solution of 1, 2 and 3 DMSO/H₂O in concentrations of 200, 500 and 1000 mg / kg, and with the negative control (CN-0.9% saline solution) intraperitoneally in experimental casual. The lethality test to larvae of the *A. salina* was performed according to the method of Meyer (Meyer et al., 1982), simplified. The samples were dissolved in DMSO solution and supplemented with artificial sea water, this solution were prepared dilutions. *Metanauplius* larval stage (10 units) were added to each tube containing the dilutions and the cultures were incubated for 24 hours. DMSO controls (NC) and lapachol + DMSO (CP) were included in the test. O micronucleus test was performed in vivo in bone marrow of Swiss albino mice (*Mus musculus*). To this end, we used young animals, males and females. For each of arilaminonaftoquinone tested the animals were randomly divided into twelve groups (3 animals of the same sex per cage), the same treatment was applied to a group of

males and a group of females. For each of the six arilaminonaftoquinones groups received by gavage, Arilaminonaftoquinone [50, 100 and 200mg.kg⁻¹ mc] dissolved in DMSO. The other groups received cisplatin (3mg.kg⁻¹ mc⁻¹, ip, CP), DMSO (0.005 mL.g⁻¹ mc⁻¹, CS) or 0.9% NaCl (CN). Bone marrow was collected 24 hours after treatment for preparation of slides. For each animal was calculated the number of micronucleated polychromatic erythrocytes (PCEMN) in 2000 polychromatic erythrocytes (PCE) from bone marrow cells and the number of micronucleated erythrocytes normochromatic (NCEMN) in 2000 normochromatic erythrocytes (NCE) in peripheral blood. Cytotoxicity was evaluated by means of the PCE: NCE in 200 erythrocytes (PCE + NCE) in bone marrow, per animal. Statistical analysis was performed using the software Assistat ® 7.5. Statistical significance comparing data between different treatment groups was performed by ANOVA (analysis of variance) to a criterion and the Tukey test a posteriori the 5% probability. The obtained datas by the LD50 test and the front toxicity *A. Salina*, showed that arilaminonaftoquinones tested are classified as harmful and cytotoxic respectively. When the results of micronucleus test results show us that the animal groups treated with different concentrations of DMSO arilaminonaftoquinonas + did not differ significantly from the CS and CN ratio on the PCE: NCE and the frequency of MN, while the CP group decreased ratio of PCE: NCE (P <0.01) and increased frequency of PCEMN (P <0.01) compared to the control group, demonstrating the sensitivity of the assay to detect genotoxicity in vivo. Keywords: Naphthoquinones. Arilaminonaftoquinones. Toxicity. Mutagenicity. Micronucleus. Mice

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Transformação de uma célula normal em célula tumoral	29
Figura 2 – Ciclo de replicação celular esquemático para a célula em mitose	31
Figura 3 – Classificação das quinonas	33
Figura 4 – Classificação de agentes antineoplásicos	36
Figura 5 – Correlação da atividade dos agentes antineoplásicos com a fase do ciclo celular	37
Figura 6 – Inibidores da topoisomerase I.....	41
Figura 7 – Inibidores da topoisomerase II.....	42
Figura 8 – Esboço das alterações nas ações das topoisomerases.....	43
Figura 9 – Estruturas químicas de diferentes inibidores catalíticos da DNA topoisomerase II	44
Figura 10 – Mecanismo de transferência de elétron para a avaria do DNA pela antraciclina	46
Figura 11 – Mecanismos de geração de radical hidroxil (HO•).	46
Figura 12 – Complexo doxorubicina-férrico.....	47
Figura 13 – Mecanismo de redução das antraciclina via dois elétrons.....	48
Figura 14 – Naftoquinonas com atividade antitumoral.....	48
Figura 15 – Ciclo redox induzido por quinonas.....	49
Figura 16 – Poliaminas naturais	50
Figura 17 – Eritropoiese em medula óssea de roedores	55
Figura 18 – Arilaminonaftoquinonas 1-3.....	58
Figura 19 – DL ₅₀ da arilaminonaftoquinona 2 e arilaminonaftoquinona 1 e 3	64
Figura 20 – Porcentagem de eritrócitos micronucleados em medula óssea de camundongos Swiss nos tratamentos CN, CS, CP e com arilaminonaftoquinona 1, nas doses de	

50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg.....67

Figura 21– Porcentagem de eritrócitos micronucleados em medula óssea de camundongos Swiss, nos tratamentos CN, CS, CP e com arilonaftoquinona 2 nas doses de 50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg.....68

Figura 22 – Porcentagem de eritrócitos micronucleados em medula óssea de camundongos Swiss, nos tratamentos CN, CS, CP e com arilonaftoquinona 3, nas doses de 50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg respectivamente.....68

Figura 23 – relação PCE/NCE em resposta ao tratamento com três concentrações diferentes de arilonaftoquinona 1 e controles negativo (CN), solvente (CS) e positivo (CP).69

Figura 24 – relação PCE/NCE em resposta ao tratamento com três concentrações diferentes de arilonaftoquinona 2 e controles negativo (CN), solvente (CS) e positivo (CP).70

Figura 25 – valores percentuais da relação PCE/NCE em resposta ao tratamento com três concentrações diferentes de arilonaftoquinona 3 e controles negativo (CN), solvente (CS) e positivo (CP).70

Figura 26–Processo de redução enzimático das naftoquinonas.75

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1 – Grupos submetidos aos tratamentos com arilaminonaftoquinonas 1, 2 e 3; DMSO; NaCl e Cisplatina.....	61
Tabela 2 – Frequência de eritrócitos policromaticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos Swiss tratados com três diferentes concentrações de arilonaftoquinona 1.....	65
Tabela 3 – Frequência de eritrócitos policromaticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos Swiss tratados com três diferentes concentrações de arilonaftoquinona 2.....	66
Tabela 4 – Frequência de eritrócitos policromaticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos Swiss tratados com três diferentes concentrações de arilonaftoquinona 3.....	66
Quadro 1 – Principais classes de agentes antineoplásicos	38

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

<	menor que
>	maior que
±	mais ou menos
+	mais
®	marca registrada
α	alfa
β	beta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
°C	grau Celsius
CHO	células de ovário de Hamster chinês
CIS	cisplatina
CL ₅₀	concentração letal média
CN	controle negativo
CP	controle positivo
CS	controle do solvente
DL ₅₀	dose letal média
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DQUI	departamento de química
ERO	espécies reativas de oxigênio
g	grama
h	horas
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes
IAEMS	International Association of Environmental Mutagen Societies

INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	intraperitoneal
kg	kilograma
L	litro
m.c.	massa corpórea
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
MN	micronúcleo(s)
NAD(p)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato
NCE	eritrócito(s) normocromático(s)
NCI	Instituto Nacional do Câncer Norte Americano
nº	número
PCE	eritrócito(s) policromático(s)
PCEMNs	eritrócito(s) policromático(s) micronucleados
p.c.	peso corpóreo
PPM	partes por milhão
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
ROS	espécies reativas de oxigênio
SESA	Secretária Estadual de Saúde
SEMUS	Secretária Municipal de Saúde do Município de Vitória
SUS	Sistema Único de Saúde
TOPO I	topoisomerase I

TOPO II	topoisomerase II
UICC	União Internacional Contra o Câncer
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
♂	machos
♀	fêmeas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
2.1 Câncer: introdução e estatística.....	26
2.2 Ciclo Celular.....	30
2.3 Quinonas	33
2.4 Quimioterapia	34
2.5 Inibidores de topoisomerase I e II.....	39
2.6 Atividade farmacológica via ciclo redox.....	45
2.7 Compostos Contendo o Grupo Ferrocenila.....	50
2.8 Bioensaios Para Avaliação de Toxicidade e Genotoxicidade	51
2.8.1 Ensaio <i>in vivo</i> com Larvas de <i>Artemia salina</i>.....	52
2.8.2 Ensaio <i>in vivo</i>: O Ensaio da Toxicidade Aguda em Camundongos por meio da Determinação da DL₅₀.....	53
2.8.3 Ensaio <i>in vivo</i>: O Ensaio do Micronúcleo em Roedores	54
3. OBJETIVOS	57
3.1 Objetivos Específicos	57
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.1 Reagentes	58
4.2 Animais	58
4.3 Teste de Toxicidade Aguda.....	59

4.3.1	Teste de Toxicidade Aguda em Camundongos	59
4.3.2	Teste de Citotoxicidade com Larvas de <i>Artemia salina</i>	60
4.4	Ensaio do Micronúcleo em Células de Medula Óssea de Camundongos.....	60
4.4.1	Delineamento Experimental	61
4.4.2	Análise Citológica.....	62
4.5	Análise Estatística.....	62
5.	RESULTADOS	64
5.1	Avaliação da Toxicidade aguda em Camundongos: Determinação da DL ₅₀	64
5.2	Ensaio com Larvas de <i>Artemia Salina</i>	64
5.3	Ensaio do Micronúcleo em Células de Medula óssea de camundongos <i>In vivo</i>	65
6.	DISCUSSAO	72
7.	CONCLUSAO	81
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO A-TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2010, EXECETO PELE NÃO MELANONA, NA POPULAÇÃO BRASILEIRA.....		88
ANEXO B - ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2010 DAS TAXAS BRUTAS DE INCIDENCIA POR 100 MIL DE NÚMEROS DE CASOS NOVOS POR CÂNCER, EM HOMENS, SEGUNDO A LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA.....		89
ANEXO C - ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2010 DAS TAXAS BRUTAS DE INCIDENCIA POR 100 MIL DE NÚMEROS DE CASOS NOVOS POR CÂNCER, EM MULHERES, SEGUNDO A LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA.....		90

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor. A definição científica de câncer é feita pelo termo neoplasia, especificamente para os tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas (ALMEIDA et al., 2005).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a terceira causa de óbitos no mundo (ARÊAS, 2007). Como a expectativa de vida tem melhorado gradativamente, a incidência de câncer, segundo a União Internacional Contra o Câncer (UICC), estimado em 2002 em 11 milhões de novos casos, alcançará quase 20 milhões em 2020. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A explicação para este crescimento está na maior exposição dos indivíduos a fatores de risco cancerígenos. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA)-2005, no Brasil, o câncer é a segunda causa de mortes por doença, levando, em 2006, a cerca de 472.050 casos da doença, sendo a região sudeste a de maior incidência.

No Estado do Espírito Santo, a Secretária Estadual de Saúde (SESA)-2009 estimou um número de óbitos causados por neoplasias de 3251 para 2009 e de 3382 em 2010, colocando o câncer como um dos principais causadores de óbitos no estado, segundo a SESA, o câncer é a segunda principal causa de morte entre indivíduos acima de 60 anos e a terceira principal causa de morte entre habitantes na faixa etária de 20 – 59 anos. Estes últimos dados são preocupantes, por se tratar da parcela significativa da população que está em idade produtiva sendo, portanto, geradora de força de trabalho e renda para o estado e seus municípios.

Assim, o câncer constitui um problema de saúde pública mundial o que pode colocar em risco a economia países em desenvolvimento, como o Brasil, e neste, também para os estados e municípios, como no caso de Vitória.

Este cenário ilustra a necessidade de grande investimento no desenvolvimento de ações amplas e abrangentes para melhoria do controle do câncer em todos os níveis: promoção da saúde, detecção precoce, assistência aos pacientes, tratamento dos pacientes e desenvolvimento de novas drogas, vigilância do câncer e dos seus fatores de risco e formação de recursos humanos.

A quimioterapia é um dos métodos mais utilizados para tratamentos de neoplasias e utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos, que atuam com diferentes mecanismos de ação, para deter a multiplicação celular, sendo originalmente sintéticos, Semi-sintéticos ou Naturais (HARDMAN e LIMBIRD, 2005). Os avanços verificados nas últimas décadas, na área da quimioterapia antineoplásica, têm facilitado, consideravelmente, a aplicação de outros tipos de tratamento de câncer e permitido maior número de curas (INCA, 2006).

Os agentes antineoplásicos são atualmente utilizados de forma combinada, atuando em processos metabólicos diferentes e aumentando a probabilidade de erradicação das células cancerosas, além de apresentarem menor toxicidade, já que são utilizados em uma dosagem menor, quando comparados ao seu uso separadamente (HARDMAN e LIMBIRD, 2005).

Os quimioterápicos naturais foram introduzidos ao longo dos últimos vinte anos no tratamento do câncer, reforçando o interesse de indústrias farmacêuticas em produtos desta origem (ARÊAS, 2007). A procura por novos agentes antitumorais com eficiência e menos tóxicos para as células normais tem se tornado cada vez mais necessária, o que leva a um grande interesse na identificação de novos agentes antineoplásicos, que tenham ação seletiva e efeitos adversos minimizados. Na última década, quimioterápicos derivados de bactérias (Adriamicina), plantas (Lapachol, Taxol), organismos e microorganismos marinhos, entre outros, têm apresentado resultados bastante satisfatórios (SILVA et al., 2003).

Em Relação aos quimioterápicos de origem vegetal, vários estudos têm demonstrado a ação de naftoquinonas, como Lapachol (*Tabebuia sp*) e a Lausona (*Lawsonia sp*) e seus derivados como agentes antineoplásicos. Rao e colaboradores, através de um estudo de 1968, demonstraram que o lapachol possuía uma atividade altamente significativa em tumores de ratos. Em 1971, o Instituto Nacional do Câncer Norte Americano (NCI) noticiou que possuía um programa em estágio de teste clínico (fase 1) onde os pacientes utilizavam o lapachol como droga terapêutica, porém este apresentou vários efeitos colaterais sendo então suas pesquisas abandonadas pelo NCI. Em um pequeno estudo de 1980 com nove pacientes que possuíam diferentes tipos de tumores (fígado, rim, mama, colo uterino e próstata), o lapachol demonstrou uma habilidade efetiva em diminuir tanto o progresso dos tumores, bem como a dor sentida pelos pacientes (HUSSAIN et al., 2007).

Acredita-se que a atividade antitumoral do lapachol pode ser devido a sua interação com os ácidos nucléicos (COSTA, 2010) e aos mecanismos de ação das naftoquinonas de forma dose e tempo-dependente. A inibição do crescimento celular observada, pode ocorrer em função da indução da apoptose, inibição da topoisomerase II ou estresse oxidativo (SILVA et al. 2003).

Os tumores são doenças genéticas que surgem por um acúmulo de mutações no DNA. A grande maioria das mutações no genoma é neutra, ou seja, não alteram o fenótipo do indivíduo, enquanto que uma pequena fração tem um efeito positivo ou negativo. Uma mutação é o primeiro passo rumo à carcinogênese, porém, a maioria das mutações é corrigida pelos sistemas de reparo das células e são eliminadas a tempo (HAVSTEEN, 2002). Apesar disto, o número de mutações que determinam um efeito deletério ao organismo é significativo e o seu estudo com vistas à sua correção ou mesmo à diminuição de sua frequência é de extrema importância, quando do estudo de novos fármacos.

Assim, estudos acerca dos efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de diversas substâncias, principalmente quando visam à produção de novos medicamentos, são

realizados através de bioensaios que utilizam, por exemplo, roedores. Estes ensaios permitem o monitoramento da bioatividade dos referidos fármacos, quanto à sua possível potencialidade tóxicas. Além disso, a avaliação de efeitos mutagênicos e/ou antimutagênicos, oportuniza o desenvolvimento de novos medicamentos a serem utilizados no tratamento de neoplasias. Isso é de fundamental importância, pois, muitas substâncias têm a capacidade de provocar mutações no DNA, danificar as células ou induzir a tumorigênese.

A identificação de agentes anticarcinogênicos naturais ou sintéticos é indispensável e extremamente importante na busca de estratégias para a prevenção do câncer. O potencial mutagênico e/ou carcinogênico de uma substância pode ser avaliado em sistemas biológicos diversos. Os sistemas celulares de mamíferos, utilizados para essa avaliação, abrangem os testes *in vitro* e *in vivo*. Nos testes *in vivo* são utilizados freqüentemente invertebrados, como a *Artemia salina*, e vertebrados, como, por exemplo, ratos e camundongos.

Diversos ensaios são rotineiramente usados para monitoramento de populações expostas a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos. Entre eles, podem-se citar o teste para determinação da DL_{50} e o de citotoxicidade frente a larvas de *Artemia salina*, de substâncias a serem utilizadas em ensaios posteriores e o teste do micronúcleo (MN) *in vivo*, realizado em medula óssea de roedores.

A letalidade de organismos tem sido utilizada para um rápido e, relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida. Os resultados podem ser facilmente tratados estatisticamente. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (CAVALCANTE, 2000).

O ensaio de letalidade em camundongos é utilizado como um teste toxicológico preliminar, quando do estudo de substâncias com um potencial farmacológico, para se determinar a dose letal (DL_{50}) capaz de matar 50% da população de animais testados. Essa dose mede-se em miligramas (mg) de substância por cada

quilograma (kg) de massa corporal do animal testado. Quanto menor for a concentração de uma substância por DL₅₀ mais tóxica esta será (CAVALCANTE, 2000).

O teste toxicológico realizado com larvas de *Artemia salina* é um ensaio biológico simples proposto para avaliar a citotoxicidade de substâncias naturais e/ou sintéticas e determinar a concentração letal média (CL₅₀) de tais substâncias. Trata-se de um método rápido, reprodutível e barato para uma pré-determinação de possíveis atividades farmacológicas das substâncias em estudo (ANDRIOLLI, 2007).

O ensaio do micronúcleo (MN) é um teste citogenético relativamente simples que pode ser utilizado para avaliar os efeitos de substâncias químicas tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sendo recomendado por agências reguladoras no mundo todo como parte da avaliação de segurança de um produto. O ensaio, quando realizado corretamente, detecta tanto clastogenicidade – quebra de cromossomos – quanto aneugenicidade – aneuploidia ou segregação cromossômica anormal devido a disfunções no aparato mitótico (KRISHNA, HAYASHI, 2000; CHOY, 2001).

Este trabalho se focalizou na determinação da dose letal mediana (DL₅₀), abrangendo alterações mutagênicas, tendo como objetivo a identificação da mutagenicidade, os efeitos tóxicos e citotóxicos de Arilaminonaftoquinonas sintéticas sobre células de medula óssea de camundongos por meio do ensaio do micronúcleo e sobre o sistema teste que utiliza larvas de *Artemia Salina*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer: Introdução e Estatística

Atualmente, a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas.

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo, pois estes são classificados de acordo com o tecido e o tipo de célula que lhe dão origem (INCA, 2011). Cânceres que se originam de células epiteliais ou mucosas são denominados carcinomas; aqueles que se originam de tecidos conjuntivos ou musculares são denominados sarcomas. Outros cânceres que não enquadram nestas duas categorias como é o caso das várias leucemias, derivadas de células hematopoiéticas e dos cânceres derivados do sistema nervos (ALBERTS et al.; 2008).

Outras características que diferem os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástases). Por outro lado, um tumor benigno, significa, simplesmente, uma massa localizada de células que se multiplicam mais vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo em risco para a vida do organismo. (INCA, 2011).

Atualmente, o câncer tornou-se problema de saúde pública mundial, não somente pelo aumento de sua prevalência, mas também pelos investimentos em ações abrangentes, nos diversos níveis de atuação, como na promoção da saúde, na detecção e mobilização social, na pesquisa e na gestão do sistema único de saúde (SUS) (Ministério da Saúde, 2007).

Estatisticamente, em pesquisa realizada pela Organização Mundial de Saúde, o câncer é a terceira causa de óbitos no mundo sendo responsável por mais de 12% dos óbitos mundiais, matando cerca de 6,0 milhões de pessoas por ano (ARÉAS, 2007). Com o crescente aumento populacional e o envelhecimento contínuo da população, o perfil epidemiológico do câncer tem sofrido alterações, afetando significativamente o impacto das neoplasias no cenário mundial. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil as estimativas, para 2010 e 2011, mostraram juntas uma ocorrência de quase 500.000 casos novos de câncer.

Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina. Em 2010, foram constatados por volta de 240.000 casos novos para o sexo masculino e 250.000 para sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma seja o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero (ANEXO A).

No Estado do Espírito Santo a Secretária Estadual de Saúde (SESA)-2009 estimou que o número de óbitos causados por neoplasias foi de 3251 para 2009 e de 3382 para 2010, colocando o câncer como um dos principais causadores de óbitos no estado.

Ainda segundo o INCA, no Estado do Espírito Santo, para o ano de 2010, o número de casos de câncer, em homens, figura em 4.700 novos casos resultando uma taxa bruta de 257,60 por 100.000 habitantes e no município de Vitória em 610 novos casos, sendo a taxa bruta estimada em 369,41 por 100.000 habitantes. (Anexo B).

Quando se analisa as mesmas taxas, em mulheres, o INCA estimou que em 2010 o número de novos casos figura em 4.640 para o estado, fornecendo numa taxa bruta de 250,00/100.000 habitantes e de 670 novos casos para o município de Vitória resultando numa taxa bruta de 363,33/100.000 habitantes (Anexo C).

Nos dois casos observa-se que a estimativa de taxa bruta de novos casos de câncer no município de Vitória está acima daquela observada no estado, o que poderá afetar gravemente uma parcela significativa da população que ainda está em idade produtiva, diminuindo a geração de renda no município e aumentando o gasto do município, com saúde pública, uma vez que segundo a Secretaria Municipal de Saúde do Município de Vitória (SEMUS)-2011, há um grande repasse de recursos aos hospitais da rede pública especializados em tratamento de doentes com neoplasias.

Houve um aumento dos recursos em assistência oncológica liberados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), para os anos de 2000 e 2005, onde se registrou um aumento de 103% nos gastos federais (ARÊAS, 2007). Somente no ano de 2005 foram aprovados cerca de 1.5 milhões de procedimentos quimioterápicos em todo Brasil pelo SUS. No município de Vitória, a Prefeitura Municipal passou a oferecer consultas e exames especializados, por meio de convênios com os hospitais Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Santa Rita de Cássia, Cassiano Antônio de Moraes (Hucam) e Pró-Matre. Com isto, os moradores da capital têm maior facilidade em agendar exames como ultrassonografia, mamografia, raios-X, tomografia computadorizada, endoscopia podendo fazer todo o tratamento de câncer gratuitamente nesta capital (SEMUS)-2011.

No decorrer da vida, o DNA sofre alterações denominadas de mutações, que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA, na divisão celular. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para evolução e diversidade das espécies. Muitas mutações não implicam mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou causam a morte celular e por isso não são detectáveis. Assim apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos pode determinar vantagens ou um crescimento desordenado das células (RIBEIRO e MARQUES, 2003).

Após passar por várias divisões, uma célula poderá acumular mutações que, poderão determinar a perda do controle de sua divisão, determinando assim, o aparecimento do câncer. A literatura tem mostrado que mutações em vários genes

críticos têm sido encontradas nas neoplasias. Os primeiros genes identificados foram os protooncogenes, nos quais as mutações ocorrendo em um ou em poucos códons críticos, podem gerar um produto gênico ativado que causa a transformação celular (BISHOP, 1191; apud RIBEIRO e MARQUES, 2003). Nestas circunstâncias, os protooncogenes pode transformar-se em oncogenes, que são genes dominantes no nível celular que codificam proteínas estimuladoras do crescimento, as quais contribuem para o descontrole da divisão celular e o fenótipo maligno da célula (Figura 1). Porém há os genes supressores de tumor que codificam proteínas cruciais para o controle do crescimento celular, e, somente quando esses genes são inativados por perdas ou mutação, podem resultar em crescimento celular anormal (ALBERTS, 2008).

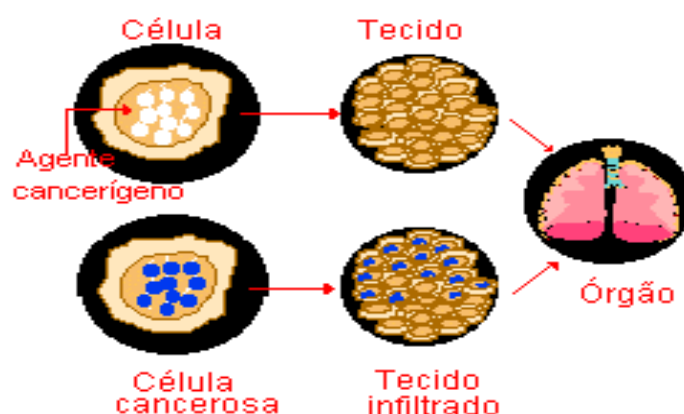


Figura 1: Transformação de uma célula normal em célula tumoral (INCA, 2011).

As células alteradas passam então a se comportar de forma anormal, multiplicando-se de maneira descontrolada. Com a constante multiplicação celular, há a necessidade de que novos vasos sanguíneos sejam formados para que haja a nutrição destas células, em um processo denominado angiogênese. A manutenção e o acúmulo de massa dessas células formam os tumores malignos e elas também podem adquirir a capacidade de se desprenderem do tumor e migrarem, invadindo, inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através destes, disseminarem-se, chegando a órgãos distantes do

local onde o tumor teve início, processo este denominado de metástases (ALMEIDA et al; 2005).

As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas substituem as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções.

2.2 Ciclo Celular

O conhecimento dos processos básicos da proliferação celular é fundamental para a compreensão dos mecanismos de ação dos agentes mutagênicos e antimutagênicos. As células de um tecido normalmente encontram-se em uma das seguintes fases: Divisão ativa (ciclagem), diferenciação, quando irregular levando a morte e latenciação (podem se dividir ativamente, desde que as condições ambientais assim permitam)(ALBERTS, 2008).

As células em proliferação sofrem vários eventos que constituem o ciclo celular, durante o qual a célula multiplica todos os seus componentes e, a seguir, divide-se em duas células-filhas idênticas.

As quatro fases distintas do ciclo celular compreendem as fases S, G₁, G₂ e M (Figura 2), onde a fase S é a fase de síntese de DNA; G₁ é o *gap* (intervalo) entre a mitose que deu origem à célula e a fase S. Na fase G₁, a célula está se preparando para a síntese de DNA; G₂ é o *gap* (intervalo) entre a fase S e a mitose que dará origem a duas células-filhas. Durante a fase G₂, a célula está se preparando para a divisão mitótica que dará origem às células-filhas; a fase M refere-se à mitose (ALBERTS, 2008).

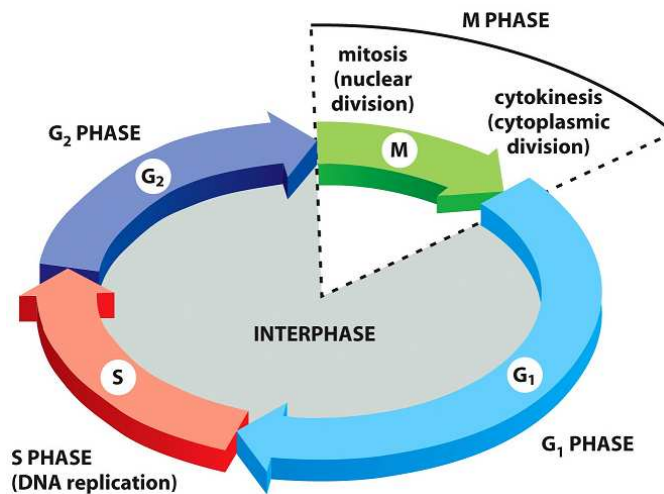


Figura 2: Ciclo de replicação celular esquemático para a célula em mitose (ALBERTS, 2008).

A célula que não está replicando apresenta-se na fase G_0 . Nesta fase, parte do DNA que não está se transcrevendo apresenta-se super enovelado, e outra parte (cromatina ativa) com atividade transcricional. Este estágio pode ser modificado para a fase G_1 , onde há a preparação da célula para a multiplicação, com a produção de constituintes celulares que serão essenciais para a nova célula que será gerada, além da preparação para a síntese de DNA, que ocorrerá na fase S (ALMEIDA, et al; 2005).

Nas fases G_1 e S existem diversos mecanismos reguladores que irão afetar a multiplicação celular. Os fatores de crescimento, como os produtos de oncogenes, ativam a multiplicação celular, enquanto que os controles de retroalimentação são inibidores da multiplicação celular. Estes controles são, por exemplo, genes supressores tumorais, que detêm a replicação celular quando há dano no DNA, para que ele seja reparado. Outro mecanismo regulador é a apoptose (morte celular programada), que provoca a morte da célula em detrimento da possibilidade da célula tornar-se alterada, podendo levar ao câncer. (ALMEIDA, 2005).

Na fase G_2 há a síntese de componentes para a mitose (divisão celular com manutenção do número de cromossomos específicos da espécie). Após a divisão do material nuclear, há a citocinese, que é a separação citoplasmática da célula mãe,

formando as duas células filhas com suas organelas e demais constituintes celulares, finalizando o ciclo de replicação celular, retornando assim para a fase G_0 . A célula tumoral ou transformada não finaliza o ciclo de replicação celular, pois passa da fase M para a nova fase G_1 (ALBERTS, 2008).

2.3 Quinonas

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural (THOMSON, 1997). Nos últimos anos intensificou-se o interesse nestas substâncias, não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior obtidas em variados estudos farmacológicos (SILVA, et al., 2003). Tanto que alguns programas de produtos naturais, conduzidos pelo Instituto Nacional do Câncer norte americano (NCI) tem identificado as quinonas como um importante elemento farmacológico de atividade citotóxica (WEI, et al., 2009).

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

Sabe-se que as quinonas provocam a redução dos níveis fisiológicos da NAD(P)H e a despolarização da membrana mitocondrial e reagem com o DNA, levando a depuração, através da formação de aductos, no DNA. Esta transformação tem comprovado a relevância na toxicidade de alguns hormônios e esteróides que são metabolizados a orto-quinonas (SILVA, et al., 2009).

Em estudos farmacológicos, as quinonas mostram variadas biodinamicidades, destacando-se, dentre muitas, as propriedades microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, processos

nos quais elas atuam de diferentes formas. Como exemplo, destaca-se o estresse oxidativo que provocam, ao induzirem a formação deletéria endógena de espécies bioativas derivadas do oxigênio ($^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$, O_2^- e H_2O_2)⁵, como ocorre no *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas (MATÉS e SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2000 apud SIIVA, 2003).

Outra atividade marcante destas substâncias, descoberta um tanto recentemente, é a inibição do complexo das topoisomerases, ação que provoca o desencadeamento da apoptose celular (HUSSAIN et al., 2007).

As quinonas são classificadas de acordo com o sistema aromático presente em sua estrutura, tendo as naftoquinonas um anel naftalênico característico (Figura 3) (SILVA et al., 2003).

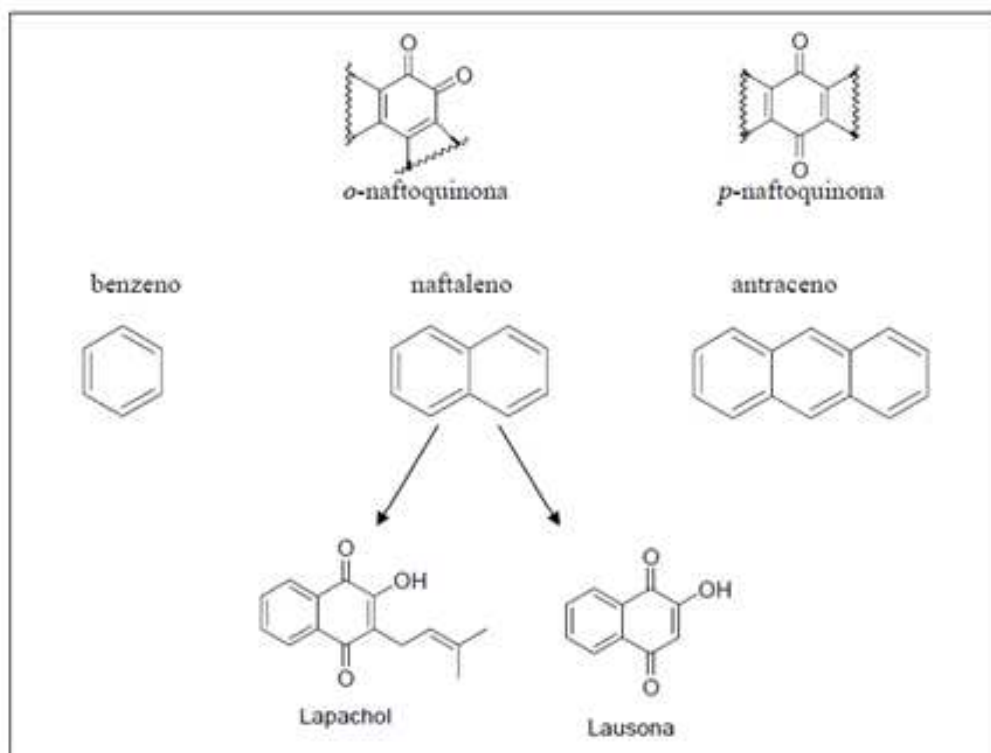


Figura 3: Classificação das quinonas (Silva et al. 2003).

Numa observação mais apurada sobre a importância das quinonas, especialmente de benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas, pode-se citar o grande número de drogas neste grupo que possuem aplicações práticas reconhecidas. Algumas, inclusive, chegaram à produção industrial, como por exemplo, as vitaminas K6, as mitomicinas e as antraciclina. Sob o ponto de vista estrutural, em grande parte destacam-se nestas substâncias os anéis redox acoplados a diversos sistemas heterocíclicos, normalmente nas posições 2,3 ou 3,4 do sistema naftalênico. Estes anéis heterocíclicos podem ser dos tipos furânico, pirânico, pirrólico, etc. indicando sua importância na expressão da bioatividade. (Silva et al., 2003).

Vários estudos têm demonstrado a ação de naftoquinonas, como Lapachol (*Tabebuia sp*) e a Lawsonia (*Lawsonia sp*) e seus derivados como agentes antineoplásicos. A β -Lapachona, uma orto-naftoquinona, tem sido amplamente estudada, principalmente por apresentar efeitos seletivos em linhagens tumorais, quando comparados a linhagens normais. Vários mecanismos de ação das naftoquinonas se apresentam de forma dose e tempo-dependente. A inibição do crescimento celular observada, pode ocorrer em função da indução da apoptose, inibição da topoisomerase II ou estresse oxidativo, entre outros (CHOI et al., 2003; SILVA et al., 2003; KONGKATHIP et al., 2003; LI et al., 2003; WOO E CHOI, 2005; REINICKE et al., 2005 apud ARÊAS, 2007).

Acredita-se que a atividade antitumoral do lapachol pode ser devido a sua interação com ácidos nucléicos. Também tem sido proposto que a interação desta naftoquinona com a dupla hélice de DNA ocorre de tal maneira impedindo que haja a duplicação do DNA, assim como a transcrição do RNA (MURRAY & PIZZORNO, 1998 apud COSTA, 2010).

2.4 Quimioterapia

O termo quimioterapia foi criado por Erlich, no início do século passado, para descrever o uso de substâncias químicas sintéticas capazes de destruir agentes

infecciosos. Recentemente, a definição desse termo foi ampliada para incorporar os antibióticos e a quimioterapia do câncer, no qual são utilizadas substâncias denominadas antineoplásicas. Estes agentes quimioterápicos são usados para uma variedade de propósitos, cuja administração da droga pode estar relacionada com a cura de um câncer específico, na sensibilização de tumores à terapia de radiação, na redução do tamanho do tumor para posterior cirurgia ou para destruir metástases microscópicas, após a remoção do tumor.

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia. Por isso, o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável. (ALMEIDA et al., 2005).

A importância clínica dos agentes antineoplásicos induz a necessidade de um estudo sistemático, o que primeiramente deveria ser feito com o uso de classificações químicas, levando-se em conta os diferentes grupos funcionais presentes na estrutura das moléculas dos agentes anticancerígenos. Contudo, a variedade de tipos de compostos utilizados em quimioterapia é tão grande, que tal classificação só pode ser feita indiretamente. Atualmente, o critério para a classificação dos antineoplásicos baseia-se no ponto de interferência no mecanismo de ação das diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e transdução (Figura 4) (ALMEIDA et al., 2005).

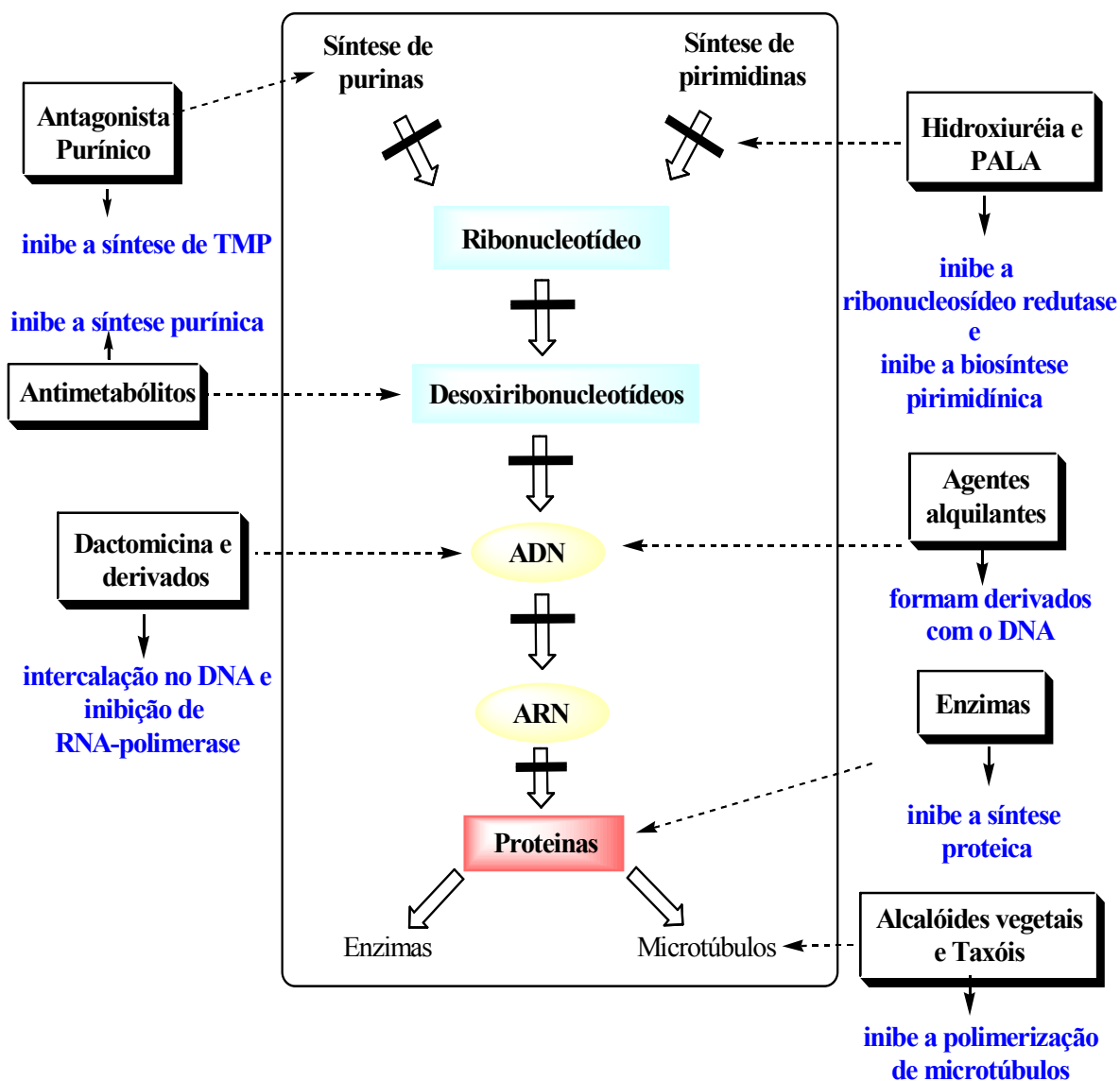


Figura 4: Classificação de agentes antineoplásicos (ALMEIDA et al., 2005).

Uma correlação simplificada pode ser estabelecida do ciclo celular com os tipos de agentes quimioterápicos antineoplásicos mais comuns, como mostra a figura 5.

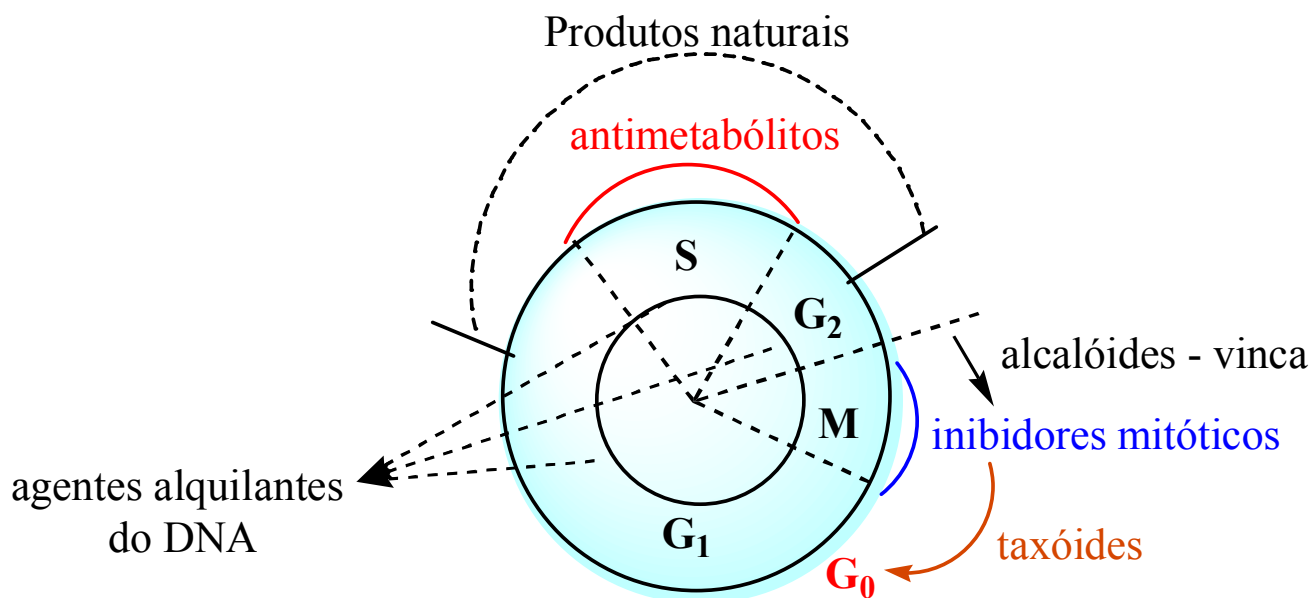


Figura 5: Correlação da atividade dos agentes antineoplásicos com a fase do ciclo celular (ALMEIDA et al., 2005).

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem a sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular e são denominados fármacos ciclo-celular específicos (CCS – *cell cycle-specific*). Um segundo grupo de agentes, denominados fármacos ciclo-celular não específicos (CCNS – *cell cycle-nonspecific*), tem a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G₀ (Quadro 1) (ALMEIDA et al., 2005).

AGENTES CICLOS-CELULARES ESPECÍFICOS	AGENTES CICLOS-CELULARES NÃO ESPECÍFICOS
1 – Agentes antimetabólicos	1 – Produtos naturais
1.1 – Análogo do ácido fólico	1.1 – Antibióticos naturais
1.2 – Antagonista das pirimidinas	1.1.1 – Antraciclina
1.3 – Análogos das purinas	1.1.2 – Mitomicina
2 – Agentes hormonais	1.1.3 – Dactinomicina
2.1 - Adrenocorticosteróides	1.1.4 – Plicamicina
2.2 - Progestinas	1.1.5 – Bleomicina
2.3 - Estrogênios	1.2 – Alcalóides pirrolizidínicos
2.4 - Androgênios	2 – Complexos de coordenação de platina
2.5 - Antiestrogênio	2.1 – Cisplatina
2.6 - Antiandrogênio	2.2 – Carboplatina
2.7 – Hormônio liberador de gonadotropina	3 - Agentes alquilantes diversos
2.8 – Inibidor da aromatase	3.1 – Mostardas nitrogenadas
2.9 – Inibidor do hormônio peptídico	3.2 – Nitroso uréias
3 - Produtos naturais	3.3 – Triazenos
3.1 – Alcalóides	3.4 – Alquil sulfonatos
3.1.1 – Alcalóides da vinca	
3.1.2 - Podofilotoxinas	
3.1.3 – Paclitaxel (taxol)	
4 - Enzimas	

Quadro 1: Principais classes de agentes antineoplásicos (ALMEIDA et al., 2005).

Diversos fármacos antitumorais muito utilizados clinicamente são substâncias que apresentam mecanismo de ação ciclo-celular não específico e relacionado ao DNA. Dentro dessa subclasse, é possível fazer uma subclassificação desses agentes em relação ao mecanismo de ação no DNA: a) inibidores da síntese de nucleotídeos, através do uso dos análogos das bases nitrogenadas; b) os agentes alquilantes, que tem efeito direto no DNA; c) ligantes que interagem na fenda menor do DNA; d) substâncias que alteram as propriedades de pareamento das bases, chamadas de intercaladores; e) inibidores da DNA-girase (ALMEIDA et al., 2005).

2.5 Inibidores das Topoisomerases I e II

As topoisomerases I e II são enzimas nucleares que clivam uma (TOPO I) ou duas (TOPO II) fitas de DNA permitindo o desenrolamento da fita, o alívio do estresse torcional e a formação de isômeros dos segmentos interligados de DNA (apenas a TOPO II). As isomerases TOPO I e/ou TOPO II são necessárias para a replicação do DNA e transcrição do RNA. A TOPO II é necessária para a finalização da mitose, e exerce um papel crucial na estrutura terciária da cromatina. Duas isoformas de isomerase II foram isoladas: a TOPO II é estritamente regulada pelo ciclo celular (aumenta na fase S e mais ainda na fase M) e largamente localizada nas células em multiplicação e tecidos, já a TOPO I é predominantemente localizada no cérebro, principalmente no cerebelo e parece agir como um tipo de *back-up* da Topo II para a célula, e está mais associada à diferenciação celular do que à proliferação. De maneira semelhante à TOPO II, a TOPO I está em elevada concentração em células neoplásicas, independentemente do aumento da proliferação (SILVA et al., 2003).

A classe topoisomerase I resolve o problema da tensão causada durante o enrolamento e desenrolamento do DNA. Essa enzima se enrola em torno do DNA e faz um corte na fita única. Com esse ponto danificado, a enzima permite que a hélice possa girar. Uma vez o DNA relaxado, a topoisomerase reconecta a fita quebrada, restaurando a dupla hélice do DNA. A topoisomerase classe II é especialista em desenrolar o DNA dentro do núcleo. Quando a célula sofre divisão, é necessário que

ocorra a separação das duas cópias de cada cromossomo. Durante este processo, as duas cópias podem se emaranhar e a TOPO II auxilia o processo de separação. (SILVA et al., 2003).

Em sua atuação natural, essas enzimas se assentam na estrutura do DNA, fazendo cortes localizados que permitem que funções de transcrição, reparação, replicação e estruturação do cromossomo ocorram normalmente. Após essa abertura, as células se dividem seguindo apuradas etapas. Na primeira etapa, conhecida como G_1 (ou Gap 1), a célula copia o DNA para seus cromossomos num estágio chamado síntese (ou S). Em seguida, numa segunda etapa chamada G_2 , a célula se divide e um segundo conjunto idêntico de cromossomos vai para a célula filha. Durante esses estágios, a célula possui um mecanismo conhecido como ponto de checagem, quando há a conferência se o novo conjunto de cromossomos é idêntico ao antigo. Quando essa checagem não confere, o processo de divisão é interrompido à espera de reparo. Se o dano no cromossomo for muito grande, sem possibilidade de reparo, a célula interrompe seu ciclo vital cometendo suicídio, fenômeno conhecido como apoptose. As células cancerosas não possuem os pontos de checagem G_1 e G_2 , logo não há indução de apoptose, e conseqüentemente ocorre um acúmulo de danos genéticos. Nessas condições, qualquer agente (ou inibidor) que afete nas neoplasias o complexo topoisomerase-DNA poderia induzir esse processo letal (SILVA et al., 2003).

As substâncias que atuam nas topoisomerases podem ser divididas em duas classes, de acordo com o seu mecanismo de ação: as substâncias estabilizadoras do complexo topoisomerase-DNA e os fármacos inibidores catalíticos da topoisomerase.

Os inibidores das topoisomerases, pelo mecanismo de estabilização do complexo topoisomerase-DNA, são mais numerosos. Dentre os vários inibidores já existentes, pode-se destacar a camptotecina e seus análogos sintéticos, e a alil- β -lapachona), que atuam inibindo a ação da topoisomerase I (Figura 6). Esses inibidores estabilizam o complexo enzima-DNA, após o estágio do corte e antes do DNA ser

recomposto. Portanto, o DNA e a enzima não podem prosseguir com suas funções normais.

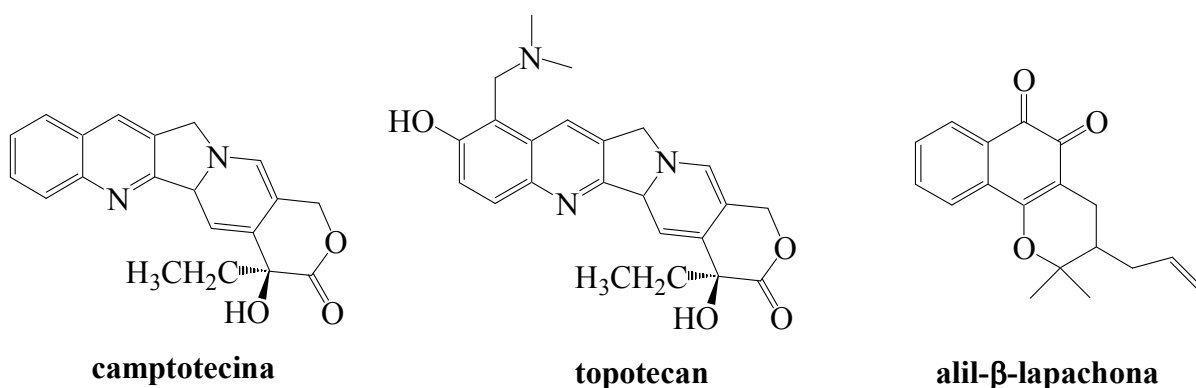


Figura 6: Inibidores da topoisomerase I. (SILVA et al., 2003).

Ainda atuando pelo mecanismo de estabilização transitória do complexo enzima-DNA, chamados complexos cliváveis, estão as drogas que atuam na topoisomerase II, cujo mecanismo de ação consiste na formação de um complexo ternário droga-DNA-topoisomerase II reversível não-produtivo, ou seja, não-clivável. Uma racionalização para a ação dessas substâncias, consiste na colisão do complexo ternário com o complexo de transcrição e replicação. Nessa colisão, o complexo ternário pode perder a sua reversibilidade e promover a quebra letal das duas tiras do DNA. Várias substâncias estão relatadas na literatura como tendo atividade inibidora da topoisomerase II: a β-lapachona, a elipticina e diversos derivados, e as quinonas saintopina e eleuterina, mostradas na figura 7 (SILVA et al., 2003).

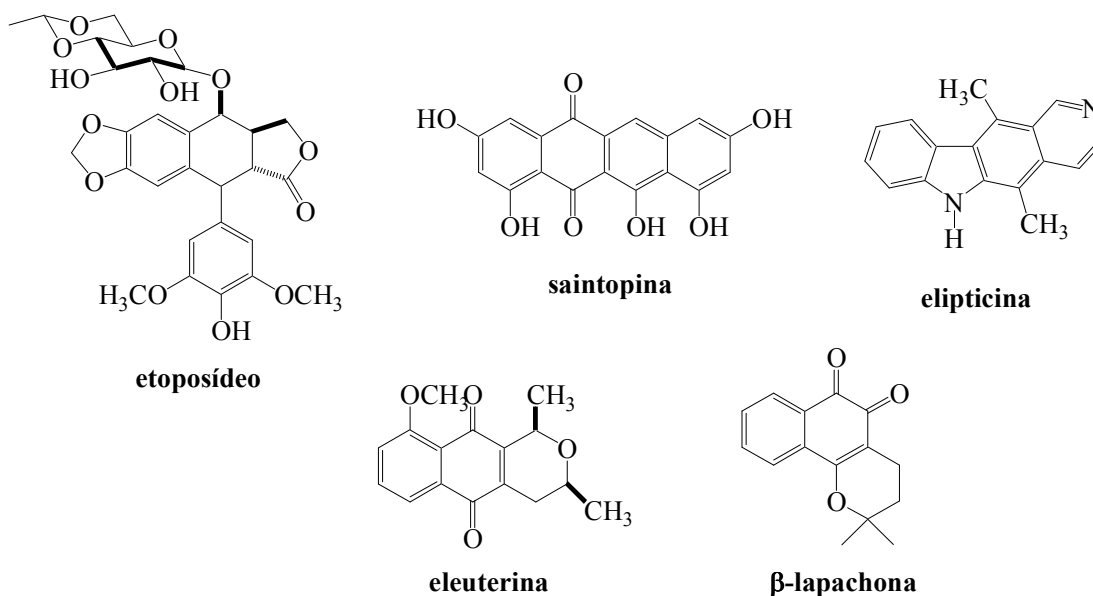


Figura 7: Inibidores da topoisomerase II.

A inibição da topoisomerase II é a mais desafiadora, pois foge um pouco do modelo clássico no qual um ligante interage com um receptor. A figura 8 mostra a formação dos complexos topoisomerasas I e II com o DNA, seguida da interação com um inibidor que congela o complexo DNA-topoisomerase, levando à sua fragmentação e, conseqüentemente, à morte celular. Os inibidores não agem na formação do complexo topoisomerase-DNA, ao contrário, eles não deixam as topoisomerasas reconectarem-se ao DNA e desfazerem o complexo, mantendo a topoisomerase ligada ao DNA. Outros fatores celulares percebem o dano e sinalizam a deflagração da apoptose (SILVA et al., 2003).

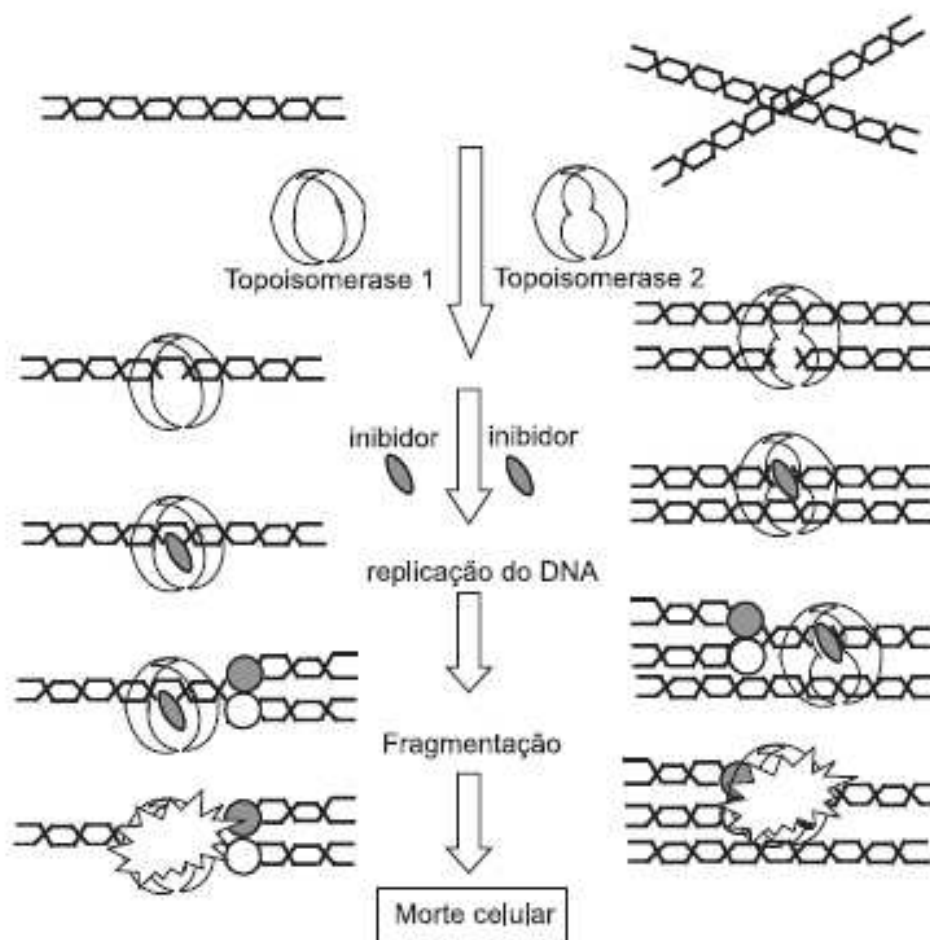


Figura 8: Esboço das alterações nas ações das topoisomerases. (SILVA et al., 2003).

Uma segunda classe não menos importante classe de inibidores da topoisomerase corresponde aos inibidores catalíticos. Assim são denominados um grupo quimicamente heterogêneo de compostos (Figura 9), que agem em qualquer etapa do ciclo catalítico da topoisomerase II. Essas substâncias podem interferir na ligação entre o DNA e a topoisomerase II (aclarrubicina e o sumarin), inibindo a atividade ATPase da enzima (merbarone, ICRF-187 e compostos estruturalmente relacionados aos derivados bis-dioxopiperazinas) ou inibindo o sítio ligante da enzima ATP (novobiocina) (SILVA et al., 2003).

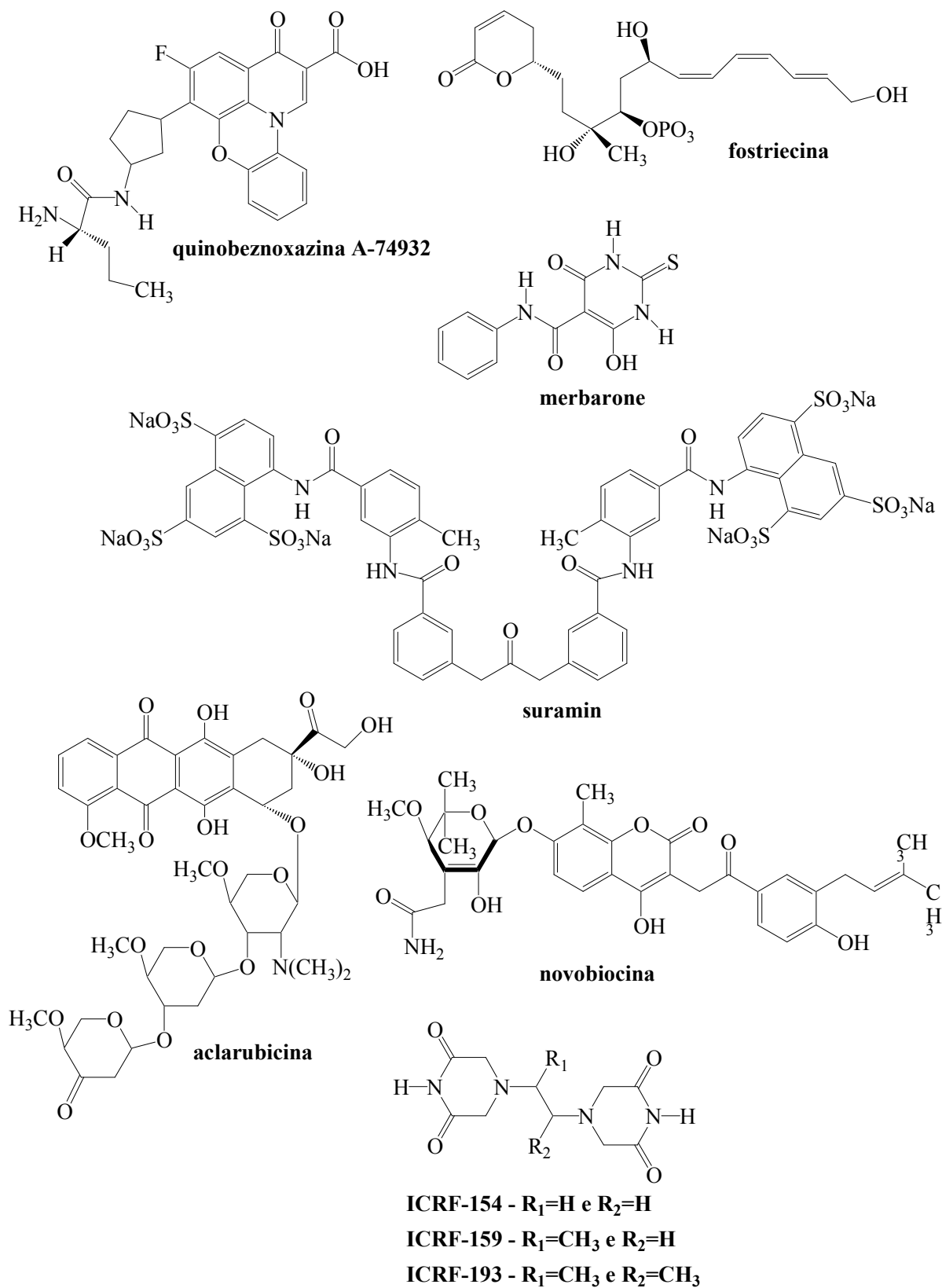


Figura 9: Estruturas químicas de diferentes inibidores catalíticos da DNA topoisomerase II.

2.6 Atividade Farmacológica Via Ciclo Redox

Dentre as classes de compostos de atividade antineoplásica mais estudados estão as quinonas, em especial as antraciclinas e naftoquinonas que além de funcionarem como intercaladores no DNA, também agem gerando radicais livres. Investigações sobre o mecanismo de ação de agentes quinoidais mostraram que, sob condições aeróbicas (em órgãos), predomina a redução por um elétron, resultando em intermediários do tipo radicais livres.

Sob condições anaeróbicas, o mecanismo de ativação envolve uma redução por dois elétrons da função quinona, que pode ser seguida pela sua desativação através da glucuronidação e/ou sulfação ou pela conversão da hidroquinona em um intermediário alquilante. O comportamento eletroquímico de diferentes classes de quinonas foi assunto do artigo de revisão de Silva e colaboradores (2003).

A redução por elétron de uma antraciclina, provavelmente catalisada por uma flavoenzima como a *NADPH-citocromo P-450 redutase*, produz um radical antraciclina semiquinona (Figura 10), que pode transferir um elétron para o oxigênio para gerar a antraciclina e produzir um superóxido ($O_2^{\cdot -}$). Tanto o superóxido quanto o anion radical semiquinona antraciclina podem gerar um radical hidroxil ($HO\bullet$), que causa a quebra das fitas do DNA (Figura 11) (SILVA et al., 2003).

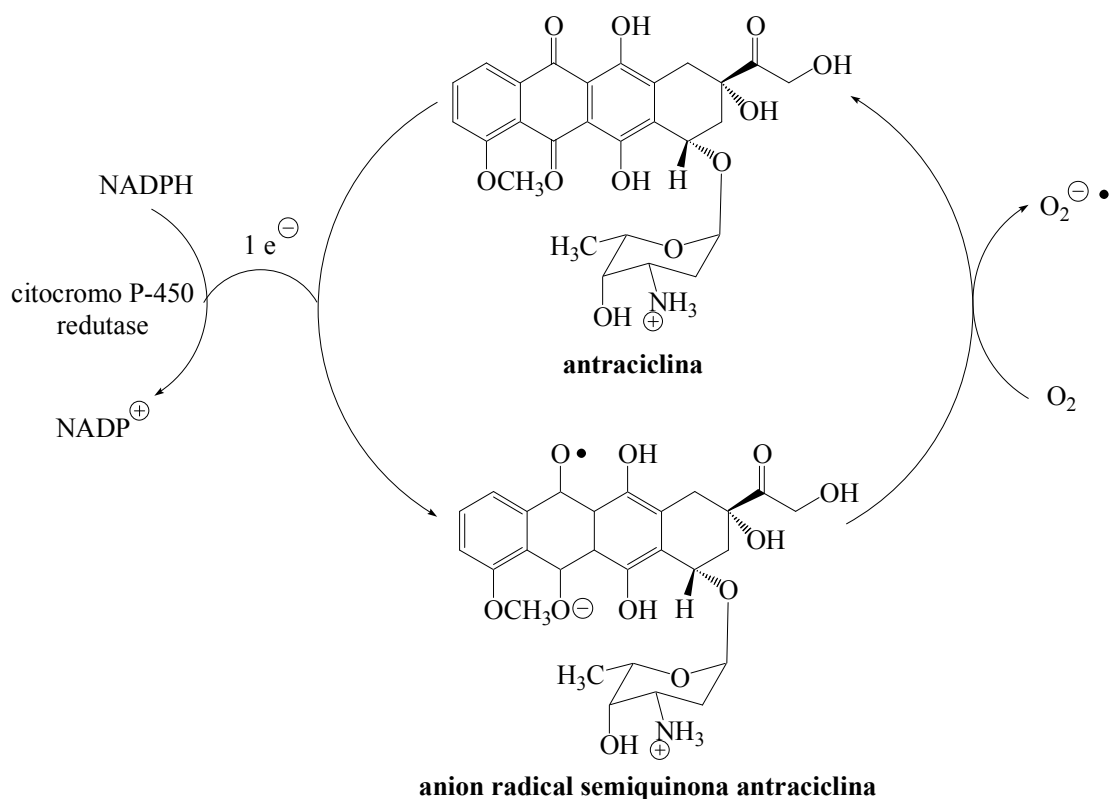


Figura 10: Mecanismo de transferência de elétron para a avaria do DNA pela antraciclina (SILVA et al., 2003).

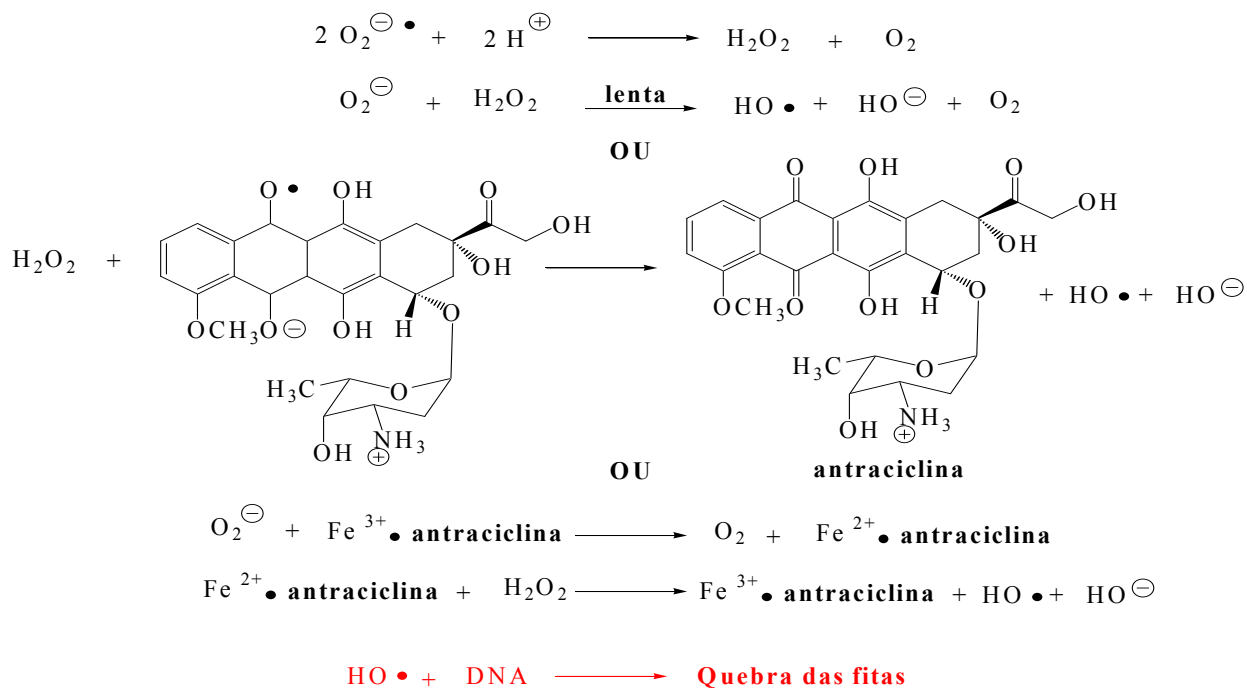


Figura 11: Mecanismos de geração de radical hidroxil (HO•). (SILVA et al., 2003).

Uma terceira possibilidade para o mecanismo de avaria do DNA pela antraciclina é a formação de um complexo férrico, que se liga ao DNA por um mecanismo diferente da intercalação. Esse complexo férrico deve reagir com o superóxido para formar oxigênio e o correspondente complexo ferroso (Figura 12). A reação do íon ferroso com o peróxido de hidrogênio é conhecida como reação de Fenton, que é uma metodologia padrão para gerar radicais hidroxil (SILVA et al., 2003).

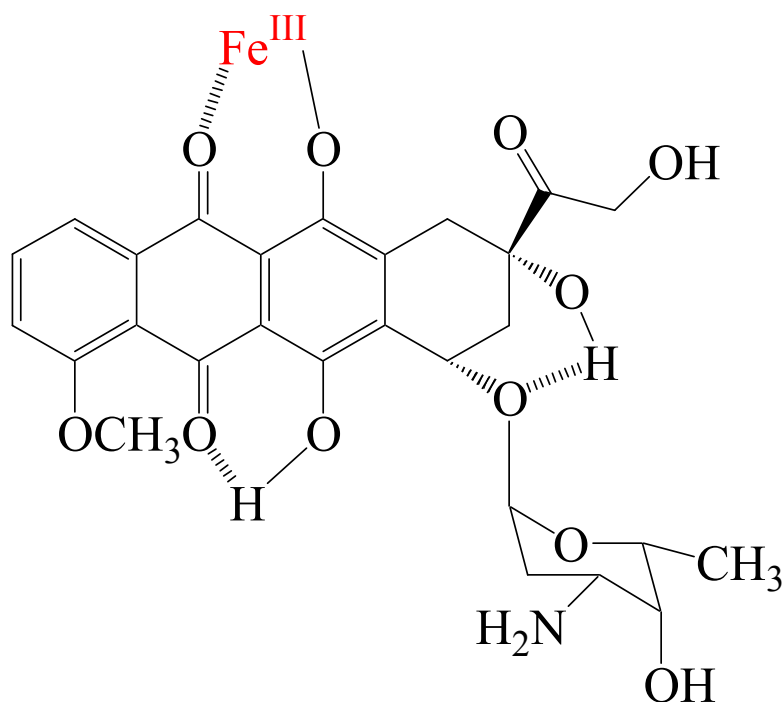


Figura 12: Complexo doxorubicina-férrico (SILVA et al., 2003).

Um quarto mecanismo proposto para a ação das antraciclina envolve uma redução via dois elétrons, que deve causar uma eliminação espontânea do açúcar. Essa eliminação deve gerar um aceptor de Michael que alquila o DNA (Figura 13). Provavelmente, a eliminação do açúcar da antraciclina ocorre no estado semiquinônico. (SILVA et al., 2003).

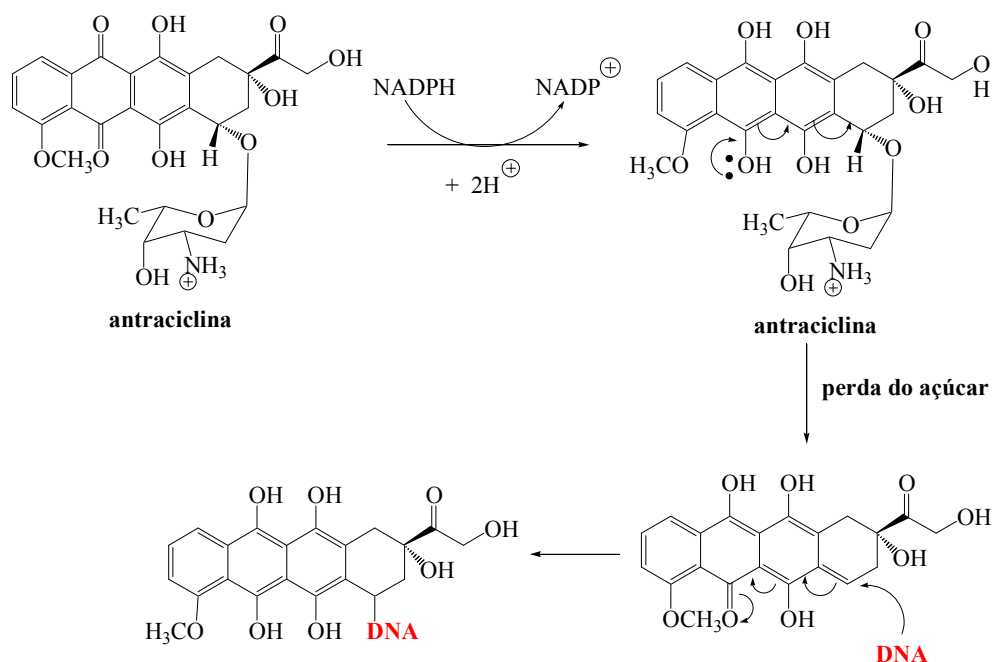


Figura 13: Mecanismo de redução das antraciclina via dois elétrons (SILVA et al., 2003).

Dentre as naftoquinonas naturais destaca-se o lapachol [2-hidroxi-3(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona] extraído do cerne do tronco de plantas da família das Bignoniáceas, em particular do gênero *Tabebuia*, e especialmente os seus derivados isoméricos α e β -lapachona, também possuem atividade antitumoral (Figura 14) (SILVA et al., 2003).

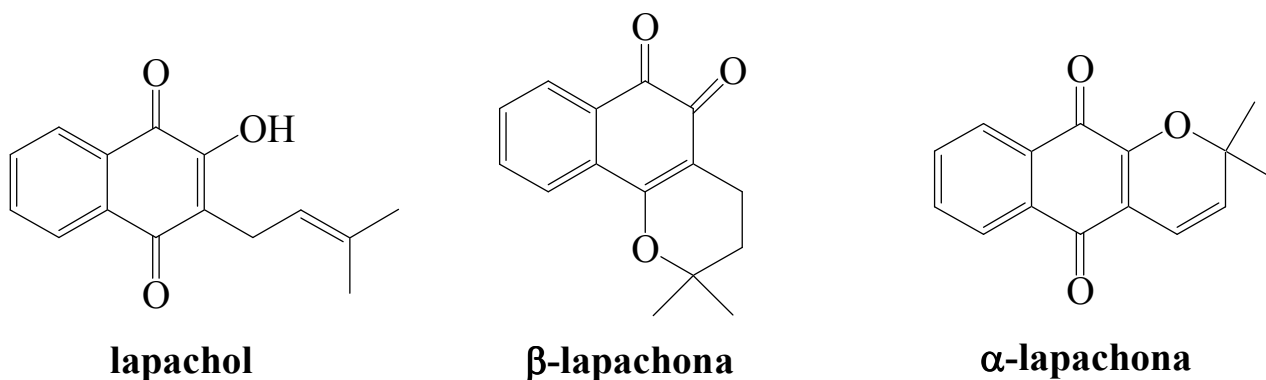


Figura 14: Naftoquinonas com atividade antitumoral (SILVA et al., 2003).

O principal interesse no lapachol e alguns de seus derivados residem na capacidade de induzir o estresse oxidativo, através da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion-radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil ($\text{HO}\bullet$). Estas espécies podem danificar alguns componentes celulares importantes, tanto de células normais como de malignas. A alteração da normalidade pode induzir a apoptose como alternativa, caso não se consiga eliminar por completo o estresse oxidativo.

Em resumo, uma série de processos de importância crucial para as células, como a indução da apoptose e os danos provocados pelo estresse oxidativo estão entre os principais efeitos que as quinonas provocam em sistemas biológicos. Ao que parece, as espécies reativas ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e (H_2O_2) estão sendo consideradas como dois importantes sinais reguladores de condições intracelulares. Acredita-se que o aumento de suas concentrações (condições mais oxidantes) favoreça a apoptose (Figura 15).

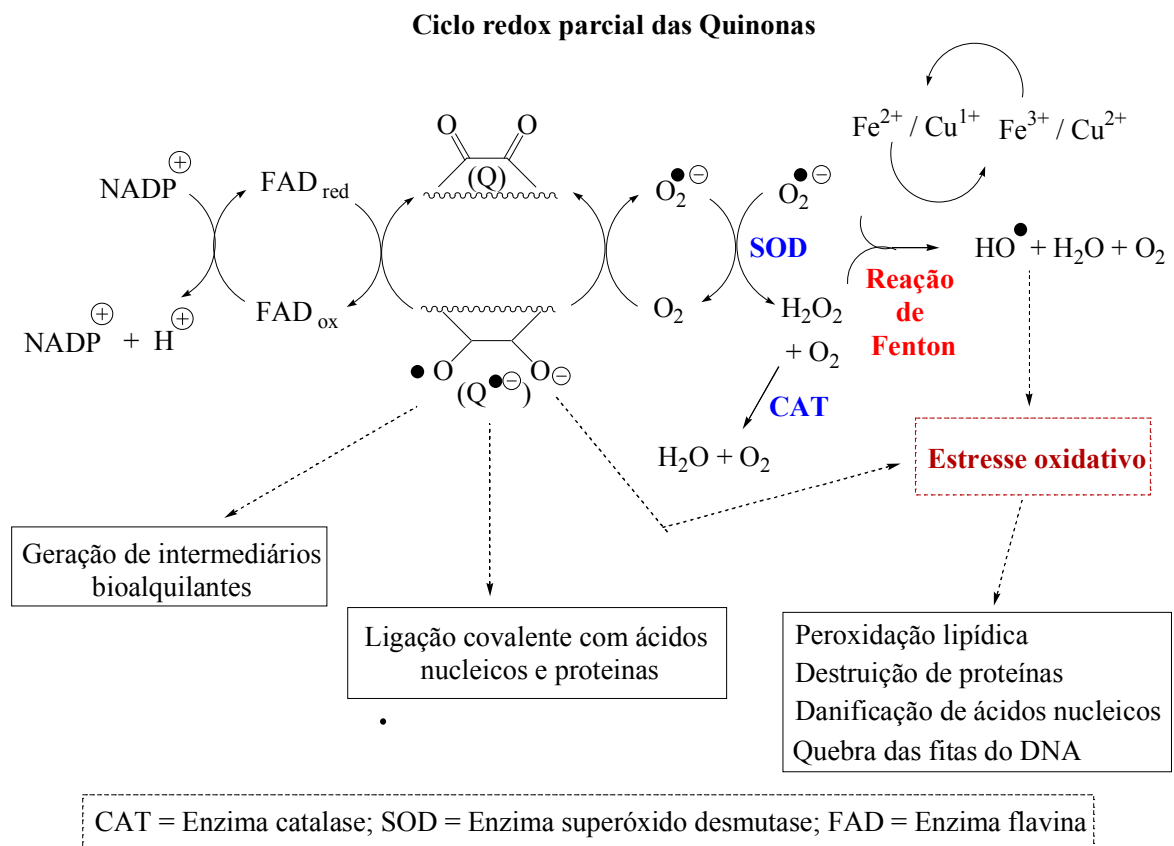


Figura 15: Ciclo redox induzido por quinonas. (SILVA et al., 2003).

O lapachol foi avaliado clinicamente nos tratamentos de carcinoma de Walker-256 e do sarcoma de Yoshida. Embora promova a regressão definitiva de neoplasias em aproximadamente 30% dos portadores destas patologias, além de agir como analgésico, os ensaios clínicos o desaprovam em decorrência de efeitos colaterais que, em muito, agravam o quadro clínico de pacientes com câncer: anemia, aumento do tempo de coagulação e problemas gastrintestinais. Já a β -lapachona exibe, *in vitro*, atividade contra diferentes linhagens de células, principalmente células malignas humanas dos cânceres de pulmão, mama, colo-retal, próstata, do melanoma e da leucemia. Acredita-se que ela, assim como o lapachol, induza o estresse oxidativo e ainda atue como inibidora da topoisomerase II (SILVA et al., 2003).

2.7 Compostos Contendo o Grupo Ferrocenila

As poliaminas naturais espermina e espermidina (Figura 16) desempenham papel essencial em células eucarióticas em desenvolvimento. Como se encontram protonadas em pH fisiológico estas poliaminas são catiônicas e, portanto, interagem com cargas negativas dos ácidos nucleicos. A associação dessas e de outras poliaminas com o DNA provoca mudanças conformacionais significativas nas suas formas. Embora ainda não completamente entendidas, sabe-se que essas mudanças são importantes no processo de diferenciação e divisão celular (SILVA et al., 2003).



Figura 16: Poliaminas naturais.

2.8 BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

Nos últimos anos um conjunto de ensaios biológicos foi desenvolvido e aperfeiçoado para avaliar a toxicidade e a genotoxicidade de agentes químicos. A Genética Toxicológica é a área que se dedica ao estudo dos efeitos adversos de agentes químicos ou físicos sobre o processo de hereditariedade.

Portanto, estudos toxicológicos para a verificação da toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e de antimutagenicidade de diversas substâncias, principalmente quando visam à produção de novos medicamentos, são realizados através de bioensaios que utilizam invertebrados como a *Artemia sp*, e vertebrados como, por exemplo, roedores. Estes ensaios permitem o monitoramento da bioatividade dos referidos fármacos, quanto a sua possível potencialidade tóxica e, além disso, a avaliação de efeitos antimutagênicos que oportuniza o desenvolvimento de novos medicamentos a serem utilizados no tratamento de neoplasias.

A identificação de agentes antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos naturais ou sintéticos é indispensável e extremamente importante na busca de estratégias para a prevenção do câncer.

Os estudos na área de toxicologia e genotoxicidade têm levado ao desenvolvimento de testes e procedimentos, para avaliação de produtos químicos ou radiação sobre os mecanismos genéticos e os consequentes riscos para os organismos, incluindo o ser humano (KRISHNA & HAYASHI, 2000).

O potencial mutagênico e/ou antimutagênico de uma substância pode ser avaliado em sistemas biológicos diversos (ANTUNES et al.,200). Os sistemas celulares de mamíferos, utilizados para a avaliação da mutagenicidade e/ou antimutagenicidade, abrangem os testes *in vitro* e *in vivo*. Nos testes *in vivo* são utilizados freqüentemente ratos e camundongos. Nos testes *in vitro* são usadas diferentes linhagens celulares, inclusive células humanas. As mais comumente utilizadas são os linfócitos humanos e as células de ovário de *hamster* chinês (CHO), como

ferramenta na avaliação da antimutagenicidade de diversos agentes químicos (ANDERSON et al., 1995; WATERS et al., 1996). Em qualquer um desses sistemas-teste, o tratamento com os agentes mutagênicos, que induzem as mutações, e com o antimutagênico, que poderá inibir o aparecimento de lesões no DNA, pode ocorrer simultaneamente ou em momentos diferentes.

Os estudos de citotoxicidade e mutagenicidade de substâncias também podem ser realizados *in vivo* com o teste do micronúcleo em medula óssea de roedores. A avaliação da frequência de micronúcleos *in vivo* é um teste inicial na bateria de testes de genotoxicidade.

2.8.1 Ensaio *in vivo* com Larvas de *Artemia salina*

Artemia sp é um crustáceo da ordem Anostraca (sem carapaça) que vive em lagos de água salgadas e salinas de todo o mundo, estando adaptada para sobrevivência em corpos de água que sofrem grandes variações sazonais, podendo tolerar salinidades que flutuam de 3,5 a 70%.

Por ser amplamente utilizada como alimento vivo para peixes e outros crustáceos, seus ovos podem ser encontrados com facilidade em lojas de aquaristas. Além disso, os ovos não eclodidos são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos, se mantidos desidratados e de preferência em vácuo e a baixas temperaturas (IPIMAR apud ANDRIOLLI et al., 2007). Quando reidratados, os ovos de *Artemia sp* eclodem em cerca de 24 horas, se em condições ambientais adequadas, chegando à fase adulta com 20 a 30 dias de vida. Esse ciclo de vida relativamente curto favorece seu uso em testes de toxicidade aguda e crônica. (ANDRIOLLI et al., 2007).

O ensaio de toxicidade aguda com *Artemia sp* é um teste rápido, de baixo custo, eficiente e que requer uma pequena quantidade de amostra.

McLaughlin et al. (1998) relatam que esse ensaio tem boa correlação com a atividade citotóxica em alguns tumores humanos sólidos e levou à descoberta dos *Anmonaceous acetogenins* como nova classe de agentes antitumorais ativos e também propuseram que tal teste pode ser utilizado como uma primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos.

2.8.2 ENSAIOS *IN VIVO*: O ENSAIO DA TOXICIDADE AGUDA EM CAMUNDONGOS POR MEIO DA DETERMINAÇÃO DA DL₅₀.

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias, de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade, como estabelecido pela legislação.

Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação-dose resposta. Outras informações podem ainda ser obtidas numa avaliação de toxicidade aguda como: indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica; diagnóstico e tratamento das reações tóxicas; estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade; informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe (PURCHASE, et al., 1998; BLAAUBOER, 2003; PRIETO, et al., 2006; COECKE, et al., 2006 apud VALADARES 2006).

O teste da DL₅₀ foi inicialmente introduzido em 1927 por Trevan, para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos como a *digitallis* e a insulina. Entretanto, na década de setenta, este teste, o qual tinha como objetivo encontrar uma única dose letal de uma substância para metade dos animais do grupo teste começou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias. (VALADARES, 2006).

Este teste tornou-se gradativamente um teste pré-requisito estabelecido por várias agências reguladoras, como a americana Food and Drugs Administration (FDA), responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas (VALADARES, 2006).

2.8.3 ENSAIOS *IN VIVO*: O ENSAIO DO MICRONÚCLEO EM ROEDORES

O ensaio do micronúcleo tem sido amplamente utilizado para avaliação de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*. O ensaio *in vivo* é especialmente importante porque permite avaliar a genotoxicidade de substâncias químicas, considerando os fatores do metabolismo *in vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparo do DNA, sendo também útil na investigação posterior do efeito mutagênico detectado por um teste de genotoxicidade *in vitro* (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

A avaliação da frequência de micronúcleos *in vivo* é recomendada pelas agências internacionais e instituições governamentais para ser conduzida como parte da bateria de testes para avaliação da segurança de um produto. O ensaio detecta tanto agentes clastogênicos quanto agentes aneugênicos (CHOY, 2001; KRISHNA; HAYASHI, 2000).

A análise dos micronúcleos é realizada em eritrócitos policromáticos (PCE, eritrócitos jovens, que ainda contêm ribossomos) de medula óssea de camundongos ou ratos. Alternativamente, em camundongo, os micronúcleos podem ser analisados em eritrócitos normocromáticos circulantes (NCE, eritrócitos maduros, sem ribossomos), uma vez que o baço de camundongo não remove do sangue os eritrócitos micronucleados, como ocorrem em ratos e humanos (RIBEIRO, 2003).

Segundo Umegaki, Uramoto e Esashi (1997) as células de medula óssea são ideais para estudos de mutagenicidade e antimutagenicidade, uma vez que apresentam alto índice mitótico e uma extensa rede de vasos sanguíneos que permitem o contato entre as células em divisão e os agentes testados. A Figura 17 apresenta o

processo eritropoiético em medula óssea de roedores e a formação de eritrócitos policromáticos e normocromáticos.

Os PCE podem ser diferenciados dos NCE por coloração seletiva para ribossomos ou RNA.

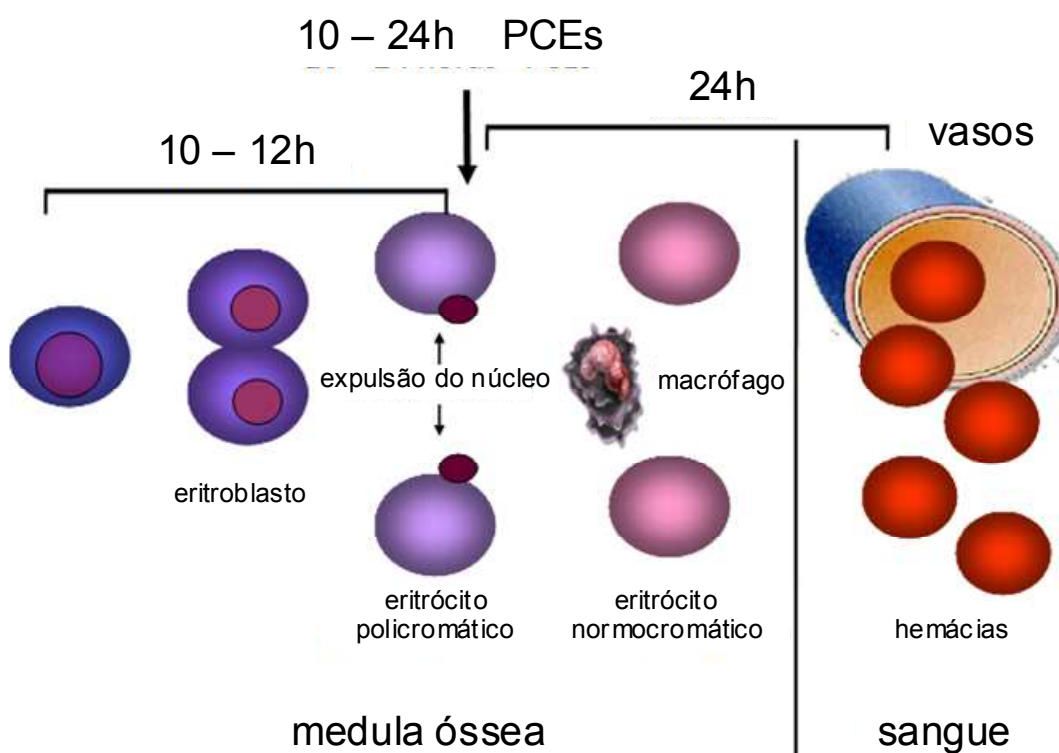


Figura 17 – Eritropoiese em medula óssea de roedores. Adaptado de RIBEIRO, 2003.

Segundo Ribeiro (2003), as características básicas do teste do micronúcleo *in vivo* são: o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos anucleados (PCE); o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado por exposição recente a um agente genotóxico; os micronúcleos são facilmente identificáveis e sua distribuição é bem definida e a frequência de micronúcleo induzida em eritrócito policromático é dependente do tempo de amostragem.

A citotoxicidade dos agentes testados pode ser avaliada pelo ensaio do micronúcleo em medula óssea de roedores por meio da relação entre o número de PCE e NCE. Uma redução significativa da razão (PCE:NCE) é um indício de toxicidade às células.

Diversos pesquisadores utilizaram o ensaio do MN em medula óssea para avaliar a mutagenicidade de substâncias químicas.

Ribeiro et al., (2010) demonstraram por meio do ensaio do micronúcleo em medula óssea de camundongos albinos Swiss que a polpa de açaí não apresenta genotoxicidade *in vivo*.

3 OBJETIVOS

Considerando a importância dos estudos de toxicidade de substâncias utilizadas pelo ser humano, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de Naftoquinonas sintéticas por meio de ensaios *in vivo*. Os resultados dos testes indicarão se tais Naftoquinonas apresentam algum risco à saúde humana advindo de um possível uso terapêutico.

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estabelecer a dose letal 50% (DL₅₀) de 3 arilaminonaftoquinonas 3 sintéticas por meio do teste de toxicidade aguda em camundongos;
- Analisar os efeitos citotóxicos de 3 arilaminonaftoquinonas sintéticas, através do teste de *Artemia salina*;
- Avaliar o efeito citotóxico de 3 arilaminonaftoquinonas sintéticas, *in vivo*, por meio da relação entre o número de eritrócitos policromáticos e o número de eritrócitos normocromáticos em células de medula óssea de camundongos albinos Swiss;
- Avaliar o efeito mutagênico de 3 arilaminonaftoquinonas sintéticas, *in vivo*, por meio da análise da frequência de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos albinos Swiss.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os principais reagentes utilizados neste estudo são citados a seguir: Arilaminonaftoquinonas 1-3 sintetizadas no Laboratório de Pesquisas em Química Orgânica, DQUI, UFES, sob a coordenação do professor Dr. Sandro José Greco; dimetilsulfóxido (Labsynth, Brasil); soro bovino fetal (Gibco-Invitrogen Ltda, Brasil); cisplatina (Incel[®], Darrow Laboratórios S/A, Brasil,); eosina azul-de-metileno segmento Leishman (Cinética, Brasil); metanol (Vetec, Brasil); ácido acético (Biotec, Brasil). Todos os outros reagentes eram de alto grau de pureza.

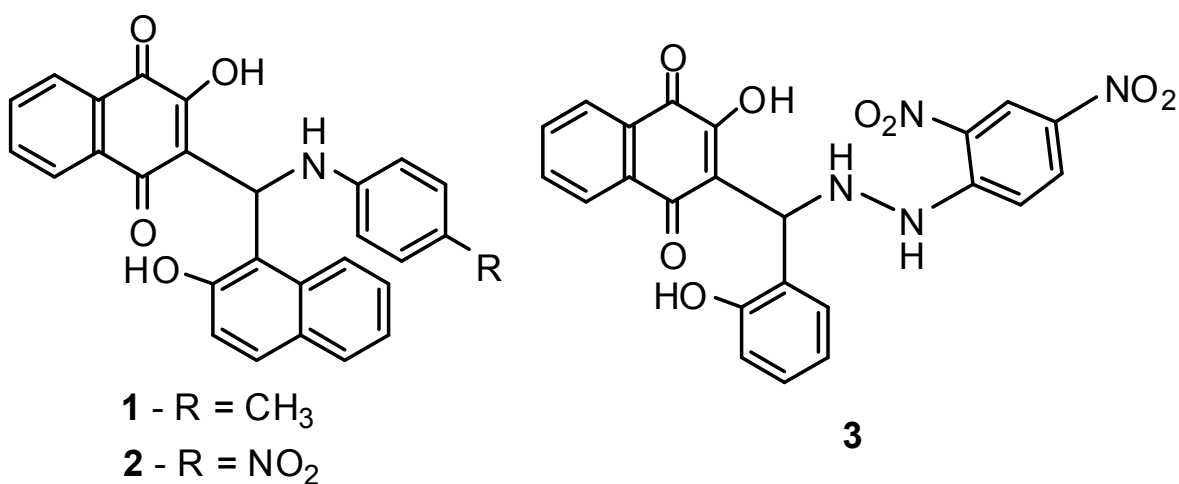


Figura 18: Arilaminonaftoquinonas 1-3

4.2 Animais

O projeto de estudo envolvendo animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e foi realizado em concordância com os Princípios Éticos de Experimentação Animal do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal.

Os animais foram obtidos do biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFES. Foram utilizados camundongos albinos da linhagem Swiss com idade variando entre 6 e 8 semanas, período em que os animais apresentam maior atividade de divisão celular (PRESTON; SAN SEBASTIAN; McFEE,1987) e camundongos albinos também da linhagem Swiss (todos machos), com idade de aproximadamente 3 semanas e pesando por volta de 25-45g, para o estabelecimento da Dose letal média (DL₅₀) no teste de toxicidade aguda .

Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno com grades de metal e maravalha, alimentados com ração comercial padrão e água *ad libitum* e mantidos em biotério climatizado sob temperatura constante de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos claro-escuro de 12h.

4.3 Teste de Toxicidade Aguda

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada pela determinação dos valores da dose letal média (DL₅₀), em camundongos e pela determinação da concentração letal média (CL₅₀) em experimentos de letalidade com *Artemia salina*.

4.3.1 Teste de Toxicidade Aguda em Camundongos

O ensaio para estabelecimento da dose letal média (DL₅₀) foi conduzido segundo a metodologia proposta por Litchfield e Wilcoxon (1949 apud GARÍN-AGUILAR et al., 2000, onde os camundongos com massa corpórea entre 25-45g foram divididos em grupos experimentais (n=10) e tratados, separadamente, com solução das arilaminonaftoquinonas 1-3 em DMSO/H₂O nas concentrações de 200, 500 e 1000 mg/Kg e, com o controle negativo (CN- solução salina 0,9%), por via intraperitoneal, em delineamento inteiramente casual. Os volumes administrados das substâncias teste e da solução salina foram proporcionais à massa corpórea de cada animal. Os

animais permaneceram em gaiolas por período de 24 horas, observando-se o comportamento dos mesmos e contando-se o número de óbitos.

4.3.2 Teste de Citotoxicidade com Larvas de *Artemia salina*.

O teste de letalidade a larvas de *A. salina* foi realizado de acordo com o método de Meyer *et al.* (1982), simplificado. Os ovos encistados de *A. salina* foram incubados em água marinha artificial. A cultura foi mantida a 28°C, sob luz e aeração constantes. As amostras foram dissolvidas em 0,2 mL de DMSO e completada a solução com 20 mL de água marinha artificial. Dessa solução foram preparadas diluições seriadas, em triplicata. Larvas em estágio metanauplii (10 unidades) foram adicionadas a cada tubo contendo as diluições e as culturas foram incubadas por 24 horas. Controles contendo 0,2 mL de DMSO e Lapachol + DMSO foram incluídos no teste (controles negativo e positivo, respectivamente), pois sabidamente são tóxicos para a *A. salina*.

4.4 Ensaio do Micronúcleo em Células de Medula Óssea de Camundongos

O ensaio de micronúcleo foi conduzido conforme metodologia descrita em Utesch *et al.* (2008) e Valadares *et al.* (2007), com modificações.

Para cada uma das arilaminonaftoquinonas testada, os animais foram divididos aleatoriamente em doze grupos (3 animais do mesmo sexo por gaiola) e mantidos durante 7 dias para aclimação, antes do início dos experimentos. Um mesmo tratamento foi aplicado a um grupo de machos e a um grupo de fêmeas para avaliação da possível interferência do sexo na ação da droga. A Tabela 1 resume as situações de cada tratamento.

Tabela1: Grupos submetidos aos tratamentos com arilaminonaftoquinonas 1, 2 e 3; DMSO; NaCl e Cisplatina.

Grupo	Sexo	N	Tratamento
I	♂	3	DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c. (CS)
II	♀	3	DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c. (CS)
III	♂	3	NaCl 0.9% (CN)
IV	♀	3	NaCl 0.9% (CN)
V	♂	3	CIS 3 mg.kg ⁻¹ m.c. (CP).
VI	♀	3	CIS 3 mg.kg ⁻¹ m.c. (CP).
VII	♂	3	Arilaminonaftoquinonas 50 mg.kg ⁻¹ m.c., DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c. (CS)
VIII	♀	3	Arilaminonaftoquinonas 50 mg.kg ⁻¹ m.c., DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c. (CS)
IX	♂	3	Arilaminonaftoquinonas 100 mg.kg ⁻¹ m.c., DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c.(CS)
X	♀	3	Arilaminonaftoquinonas 100 mg.kg ⁻¹ m.c., DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c.(CS)
XI	♂	3	Arilaminonaftoquinonas 200 mg.kg ⁻¹ m.c., DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c.(CS)
XII	♀	3	Arilaminonaftoquinonas 200 mg.kg ⁻¹ m.c., DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c.(CS)

♂= macho; ♀= fêmea; DMSO = dimetilsulfóxido; CIS = cisplatina; CS = controle do solvente; CP = controle positivo; CN= controle negativo
p.c. = peso corpóreo.

4.4.1 Delineamento Experimental

As massas corpóreas foram obtidas previamente para cada animal, para se calcular a dose a ser administrada das substâncias, não ultrapassando 0,01mL.g⁻¹ m.c. A administração das substâncias foi realizada da seguinte forma: Os dois grupos CS receberam, intraperitonealmente (IP), DMSO, solvente utilizado para diluição das arilaminonaftoquinonas. Os dois grupos CN receberam via gavagem NaCl 0,9%. As arilaminonaftoquinonas também foram administradas via gavagem, diluídas em DMSO nas concentrações de 50; 100 e 200mg/kg de massa corpórea. O grupo CP recebeu, 24 horas antes da eutanásia, uma dose de cisplatina (3mg/kg p.c., IP).

Ao final do período de experimentação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, de forma a evitar dor e sofrimento aos mesmos. Imediatamente após a eutanásia, foi realizada a dissecação dos fêmures de cada animal e coletada medula óssea, que foi acondicionada dentro de tubos de centrifugação com 0,5mL de soro bovino fetal. O material foi centrifugado a 1000rpm durante 10min, o sobrenadante descartado e o material celular ressuspendido

novamente em 0,5mL de soro bovino fetal. As amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em uma alíquota de 0,5mL do sobrenadante.

Foram preparadas duas lâminas por animal pela técnica de esfregaço. As Laminas foram fixadas com metanol e deixadas para secar a temperatura ambiente por 24h. As células foram coradas com Leishman eosina-azul de metileno puro por 3min sendo, posteriormente, transferidas para cubas de coloração contendo Leishman dissolvido em água destilada na proporção 1:6, por 15min. As lâminas foram lavadas em água destilada e deixadas secar a temperatura ambiente.

4.4.2 Análise Citológica

A análise de células foi realizada em microscópio de luz, aumento de 1000X, em teste cego. Tanto os eritrócitos normocromáticos (NCE) quanto os eritrócitos policromáticos (PCE) foram computados para verificar a presença de micronúcleos e contados separadamente até um total de 200 eritrócitos por animal. A partir de então, a contagem foi limitada apenas aos PCE, para um total de 2000 PCE por animal.

Para cada grupo de animal foram considerados os seguintes parâmetros: número de PCE; número de células micronucleadas/1000 PCE/animal; número de NCE e a relação NCE/PCE.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para todos os experimentos, os resultados foram tabulados e os valores expressos em números absolutos. A significância estatística comparando dados entre diferentes grupos de tratamento foi realizada por ANOVA (análise de variância) a um critério e pelo teste de Tukey *a posteriori*, a 5% de probabilidade. Para o ensaio

realizado com Larvas de *Artemia salina* os valores da concentração letal média (CL₅₀) foram determinados em g/mL, utilizando o programa PROBITOS e para a determinação da toxicidade aguda em camundongos a (DL₅₀) foi determinada em mg/Kg, utilizando o programa excel versão 2007.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA EM CAMUNDONGOS: DETERMINAÇÃO DA DL₅₀.

A avaliação da toxicidade aguda em camundongos foi realizada pela determinação dos valores da dose letal médiana (DL₅₀). Os animais foram monitorados, não sendo observado qualquer comportamento adverso ou agressivo. Após 24h da administração das drogas, se observou, somente para as doses de 500 e 1000 mg/Kg da arilonaftoquinona 2, óbitos nas proporções de 20% e 40% dos animais tratados, respectivamente.

Os resultados revelaram que, por via intraperitoneal, a DL₅₀ foi de 995,80mg/kg para a substância 2 e maiores que 1.000,00 mg/Kg para as arilaminonaftoquinonas 1 e 3 (Figura 19).

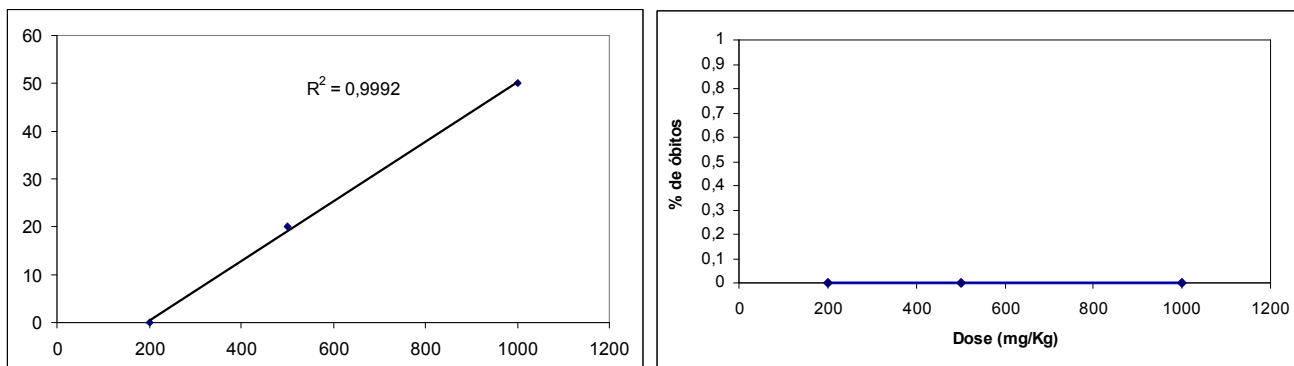


Figura 19: DL₅₀ da arilaminonaftoquinona 2 (esquerda) e arilaminonaftoquinona 1 e 3 (direita).

5.2 ENSAIO COM LARVAS DE ARTEMIA SALINA

Com a finalidade de avaliar o efeito citotóxico das Arilaminonaftoquinonas 1 e 3 aqui testadas, foram realizados, ensaios com larvas de *Artemia salina*, obtendo para este ensaio uma CL₅₀ (PPM) igual a 517.38 para a arilonaftoquinona 1 e de 701.15 para a arilonaftoquinona 2, resultado este que caracteriza tais substâncias como citotóxicas quando comparado com o lapachol, substância utilizada como padrão neste teste.

5.3 ENSAIO DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS *IN VIVO*.

O número e as freqüências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) foram determinados, a partir da contagem de 2000 eritrócitos policromáticos por animal, perfazendo um total de no mínimo 10.000 células, por grupo de tratamento. A avaliação da freqüência de micronúcleos em eritrócitos tem sido utilizada como ferramenta fundamental para a verificação da atividade mutagênica (SOUZA, 2006).

Devido a ausência de valores para a DL_{50} , no intervalo das doses avaliadas, estabeleceram-se as doses de 50, 100 e 200 mg/Kg para o experimento de mutagenicidade utilizando micronúcleos em camundongos.

A Tabela 2, 3 e 4 sumariza os resultados de freqüência de micronúcleos (MN), bem como a razão entre o número de eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE) de medula óssea de camundongos tratados com as Arilaminonaftoquinonas 1, 2 e 3, respectivamente, e dos testes controles.

Tabela 2: Freqüência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos Swiss tratados com três diferentes concentrações de arilonaftoquinona 1.

Tratamentos	Número de PCEs analisados	PCEMNs		Relação PCE/NCE
		N	%	
NaCl 0,9% (CN)	13625	13	0,10	1,30
DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c. (CS)	12910	20	0,15	1,99
CIS 3 mg.kg ⁻¹ m.c. (CP)	13520	572*	4,23*	0,31
Arilaminonaftoquinona 1 50 mg.kg ⁻¹	13412	22	0,16	2,82
Arilaminonaftoquinona 1 100 mg.kg ⁻¹	12965	26	0,20	3,62
Arilaminonaftoquinona 1 200 mg.kg ⁻¹	13004	29	0,22	3,14

Tabela 3: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos Swiss tratados com três diferentes concentrações de arilonaftoquinona 2.

Tratamentos	Número de PCEs analisados	PCEMNs		Relação PCE/NCE
		N	%	
NaCl 0,9% (CN)	13625	13	0,10	1,30
DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c. (CS)	12910	20	0,15	1,99
CIS 3 mg.kg ⁻¹ m.c. (CP)	13520	572*	4,23*	0,31
Arilaminonaftoquinona 2 50mg.kg ⁻¹	12272	4	0,03	4,06
Arilaminonaftoquinona 2 100mg.kg ⁻¹	12326	7	0,06	3,57
Arilaminonaftoquinona 2 200mg.kg ⁻¹	12441	26	0,21	3,42

Tabela 4: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos Swiss tratados com três diferentes concentrações de arilonaftoquinona 3.

Tratamentos	Número de PCEs analisados	PCEMNs		Relação PCE/NCE
		N	%	
NaCl 0,9% (CN)	13625	13	0,10	1,30
DMSO 0,005mL.g ⁻¹ m.c.(CS)	12910	20	0,15	1,99
CIS 3 mg.kg ⁻¹ m.c. (CP)	13520	572*	4,23*	0,31
Arilaminonaftoquinona 3 50 mg.kg ⁻¹	13345	21	0,16	3,00
Arilaminonaftoquinona 3 100 mg.kg ⁻¹	13079	26	0,20	4,03
Arilaminonaftoquinona 3 200 mg.kg ⁻¹	13305	32	0,24	3,57

Como em testes preliminares não foram observadas diferenças significativas nos resultados entre machos e fêmeas, os resultados desses grupos foram apresentados em conjunto nas tabelas 2, 3 e 4, seguindo a orientação de Ribeiro e colaboradores (2003) que considera que em estudos nos quais machos e fêmeas são testados,

usando o mesmo protocolo de tratamento e as mesmas doses, os dados de ambos os sexos podem ser combinados para a análise estatística, desde que não exista evidência de diferença de resposta entre os sexos.

A partir da análise das tabelas 2, 3 e 4 e das figuras 20, 21 e 22, observa-se uma percentagem de micronúcleos igual a 0,10% para o controle negativo (CN); 0,15% para o controle do solvente (CS); 4,23% para o controle positivo (CP) e de 0,16%, 0,03%, 0,16% para a concentração de 50 mg.kg⁻¹ das Arilaminonaftoquinonas 1, 2, 3 respectivamente e de 0,20%, 0,06% e 0,20% para a concentração de 100 mg.kg⁻¹ das Arilaminonaftoquinonas 1, 2, 3 respectivamente. Já para a concentração de 200 mg.kg⁻¹ os resultados observados foram de 0,22% para a Arilonaftoquinona 1; 0,21% para a Arilonaftoquinona 2 e de 0,24% para a Arilonaftoquinona 3.

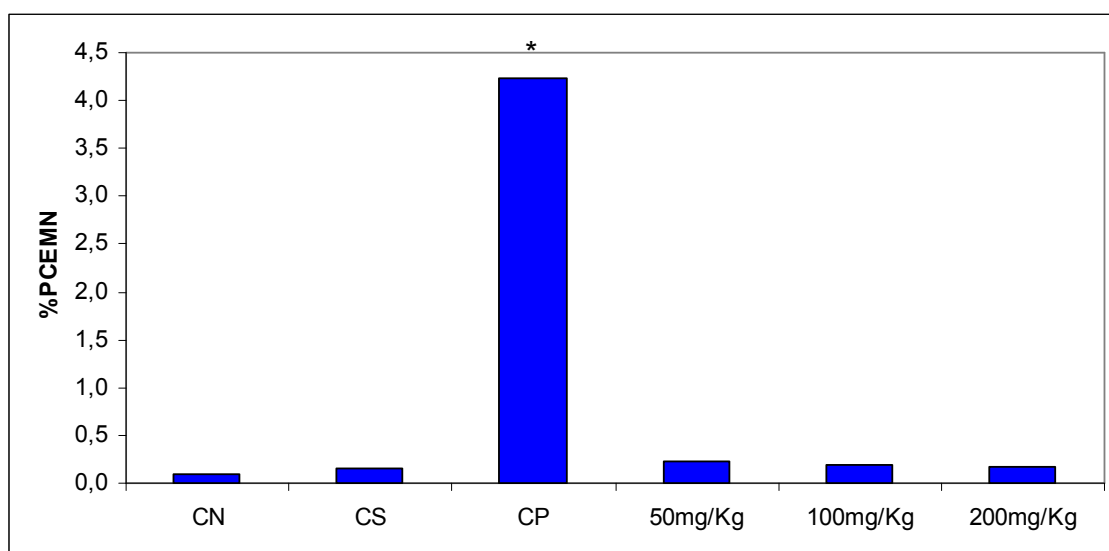


Figura 20: Percentagem de eritrócitos micronucleados em medula óssea de camundongos Swiss nos tratamentos CN, CS, CP e com arilonaftoquinona 1, nas doses de 50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg.

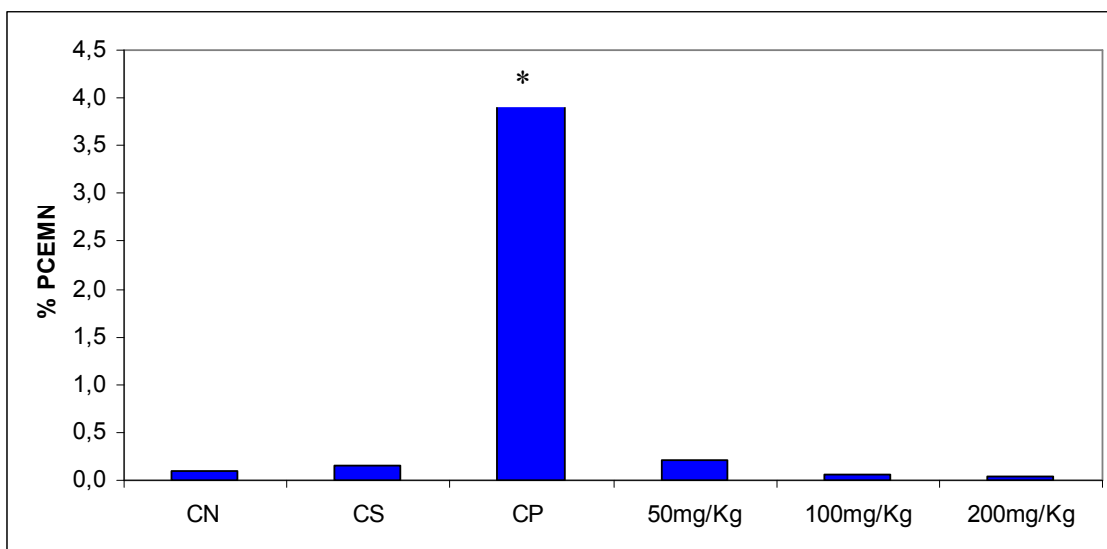


Figura 21: Porcentagem de eritrócitos micronucleados em medula óssea de camundongos Swiss, nos tratamentos CN, CS, CP e com arilonaftoquinona 2 nas doses de 50 mg/kg 100 mg/kg e 200 mg/kg.

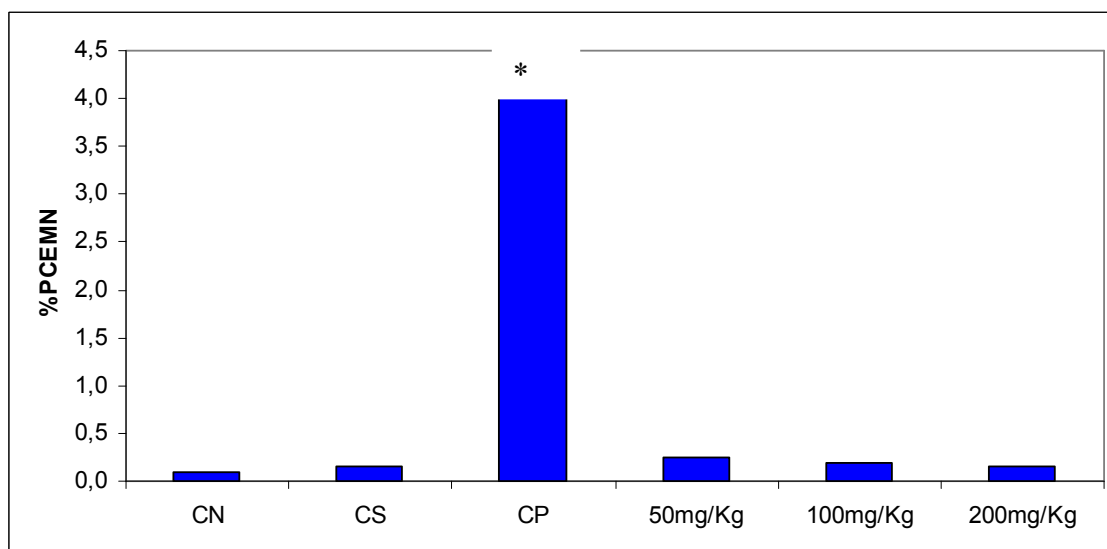


Figura 22: Porcentagem de eritrócitos micronucleados em medula óssea de camundongos Swiss, nos tratamentos CN, CS, CP e com arilonaftoquinona 3, nas doses de 50 mg/kg 100 mg/kg e 200 mg/kg respectivamente.

A redução drástica da porcentagem de PCE no total de eritrócitos (PCE+NCE), na medula óssea, também indicativa de toxicidade de substâncias, e, para verificar tal efeito das Arilaminonaftoquinonas 1, 2 e 3 sobre células da medula óssea, fez-se a relação PCE/NCE obtendo-se os seguintes resultados: 1,30 para o CN, 1,99 para o CS, 0,31 para o CP e de 2,82; 3,62 e 3,14 para as dosagens de 50, 100 e 200 mg.kg⁻¹ da arilonaftoquinona 1; 4,06; 3,57 e 3,42 para as dosagens de 50, 100 e 200 mg.kg⁻¹ da arilonaftoquinona 2 e de 3,00; 4,03 e 3,57 para as dosagens de 50, 100 e 200 mg.kg⁻¹ da arilonaftoquinona 3 respectivamente (Tabelas 2, 3 e 4).

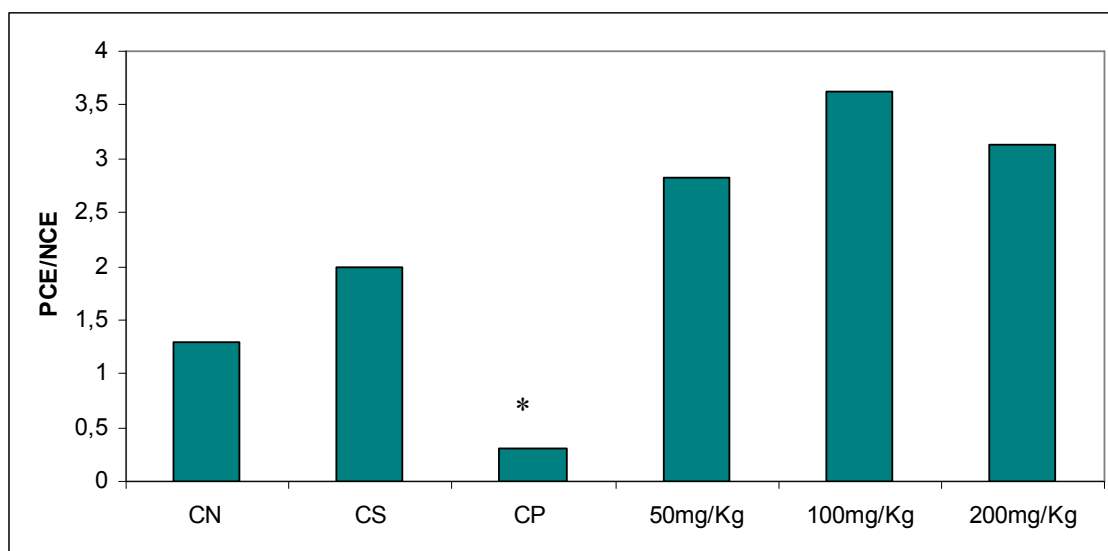


Figura 23: relação PCE/NCE em resposta ao tratamento com três concentrações diferentes de arilonaftoquinona 1 e controles negativo (CN), solvente (CS) e positivo (CP).

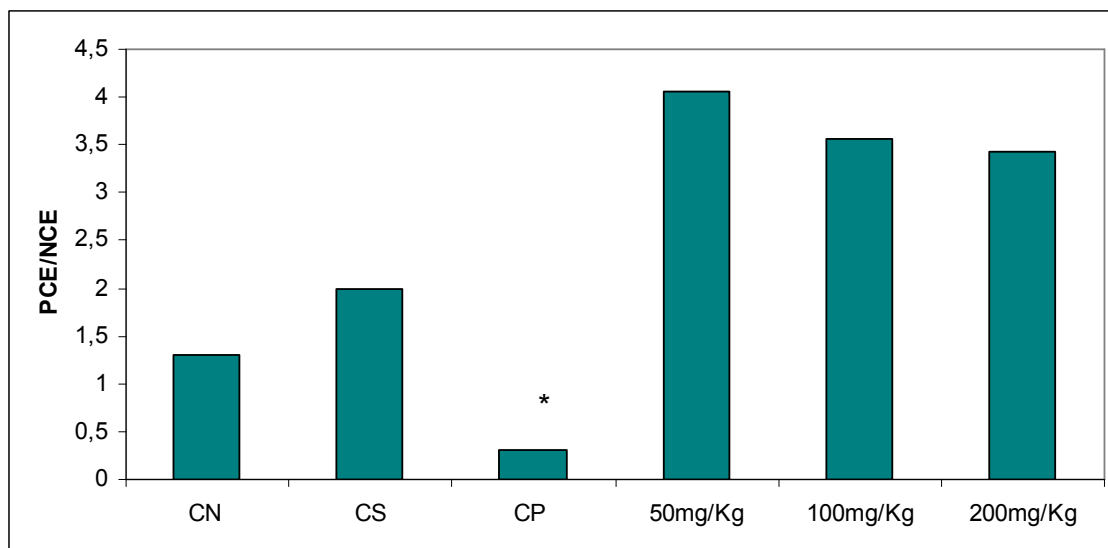


Figura 24: relação PCE/NCE em resposta ao tratamento com três concentrações diferentes de arilonaftoquinona 2 e controles negativo (CN), solvente (CS) e positivo (CP).

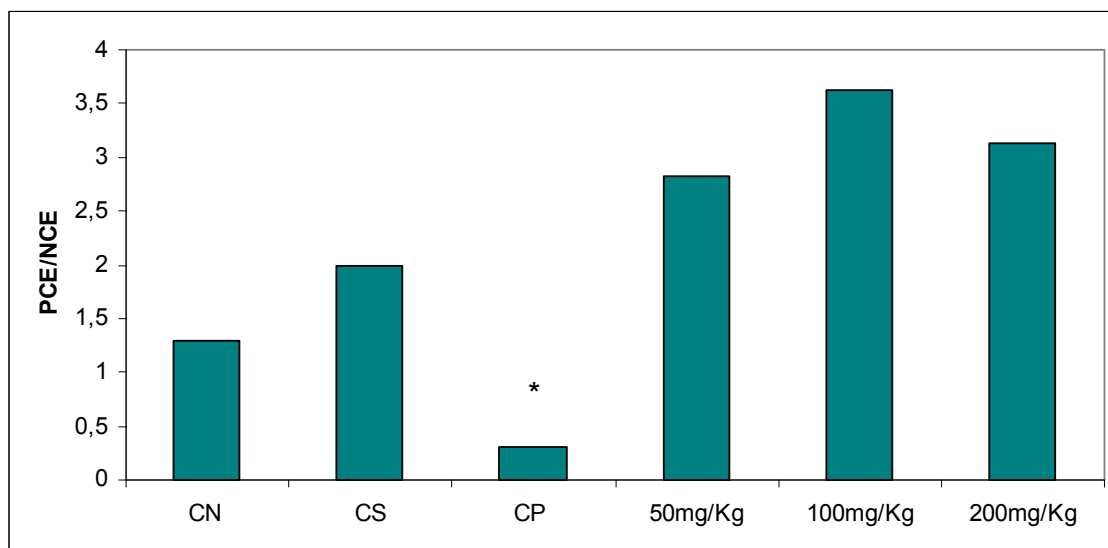


Figura 25: valores percentuais da relação PCE/NCE em resposta ao tratamento com três concentrações diferentes de arilonaftoquinona 3 e controles negativo (CN), solvente (CS) e positivo (CP).

A análise de variância a um critério, seguida do teste de Tukey a 5% de probabilidade, mostrou que os tratamentos com as Arilaminonaftoquinonas 1, 2 e 3 nas concentrações de 50; 100 e 200mg.kg⁻¹ m.c. ou com dimetilsulfóxido, na concentração de 0,005mg.g⁻¹ m.c. não induziram aumento significativo na frequência de PCEMN em relação aos grupos CN e CP, indicando ausência de mutagenicidade para essas concentrações. A razão entre o número de PCE e NCE nos mesmos grupos também não diferiu significativamente dos grupos CN e CS ($P>0,05$), evidenciando que a ipriflavona não apresentou citotoxicidade para as células de medula óssea de camundongos.

Entretanto, os animais tratados com Cisplatina 3 mg.kg⁻¹ m.c. , utilizada como controle positivo, apresentaram aumento significativo na frequência de PCEMN ($P<0,01$) e diminuição na razão PCE:NCE ($P<0,01$) em relação ao grupo controle negativo. Isso indica que a cisplatina foi tóxica para as células de medula óssea de camundongos utilizados neste estudo, o que demonstra a sensibilidade do ensaio em detectar genotoxicidade *in vivo*.

6 DISCUSSÃO

A toxicidade de substâncias químicas e/ou seus derivados, sejam elas sintéticas ou naturais, é um dos principais problemas na produção de fármacos e, por esse motivo a avaliação nos experimentos pré-clínicos se faz necessária, para assegurar a qualidade e a segurança de medicamentos. Devido a isso, estudos toxicológicos, para a verificação da toxicidade aguda de substâncias, principalmente quando visam à produção de novos medicamentos, são recomendados pelas agências reguladoras.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por exemplo recomenda, através do “Parágrafo 26” do Protocolo OECD 474 (1997), a realização de bioensaios em organismos testes, por exemplo com roedores. Estes testes permitem o monitoramento da bioatividade de substâncias químicas, no que diz respeito a sua possível potencialidade tóxica.

Nesse contexto, o presente estudo teve como principal objetivo a avaliação dos efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de derivados naftoquinônicos, em testes utilizando protocolos que envolveram organismos testes vertebrados e invertebrados, *in vivo*.

Os bioensaios para a análise de ações tóxicas, citotóxicas e mutagênicas foram realizados com as arilnaftoquininas 1-3 sintetizadas no Laboratório de Pesquisas em Química Orgânica, DQUI, UFES, sob a coordenação do professor Dr. Sandro José Greco.

Devido à baixa solubilidade em água, observada nos três compostos utilizados neste estudo, optou-se pela dissolução dessas drogas em dimetilsulfóxido, uma substância anfipática que apresenta baixa toxicidade para animais. Foram realizados testes de controle do solvente nos experimentos *in vivo*, para avaliar a influência do mesmo nos parâmetros avaliados.

Nesta pesquisa, foi realizada, além de testes controle com o solvente, testes controle positivo e negativo como forma de assegurar que o ensaio foi executado de acordo com padrões pré-estabelecidos e que as amostras foram analisadas acuradamente.

A cisplatina é um quimioterápico utilizado no tratamento de tumores sólidos, que apresenta efeitos colaterais graves sobre as células normais, devido à geração de radicais livres, que levam a danos no DNA (WEIJL et al., 2004). A cisplatina foi escolhida como substância indutora de micronúcleos (CP), devido aos seus reconhecidos efeitos citotóxico e mutagênico.

A avaliação da toxicidade é realizada para determinar o potencial de novas substâncias e produtos em causar danos à saúde humana e testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda, como a DL_{50} , que é utilizado para classificar e, apropriadamente, rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade, como estabelecido pela legislação brasileira (VALADARES 2006).

A importância da determinação da dose letal mediana de uma droga tem sido demonstrada por diferentes autores, por meio da DL_{50} , o que contribui para a validação desse método quando da investigação de toxicidade aguda em diferentes substâncias. Esse tipo de teste, além de avaliar a toxicidade de um potencial agente tóxico em um curto espaço de tempo (24 horas), também fornece dados para a seleção dos níveis de dose em estudos mais prolongados, porém não oferece informações mais detalhadas, como os mecanismos de efeitos e seleção de órgãos-alvo, sendo limitado pela rota e duração da exposição (BARILE, 2007).

Segundo a Comunidade Européia as substâncias tóxicas são classificadas em três categorias: muito toxica: substâncias com DL_{50} para roedores, menor do que 25 $mg.kg^{-1}$; tóxicas: DL_{50} para roedores entre 25 e 200 $mg.kg^{-1}$ e Nociva: DL_{50} para roedores entre 200 e 2000 $mg.kg^{-1}$. Usando este parâmetro, conforme os valores apresentados de DL_{50} para os compostos 1-3, podemos classificar estas substâncias na categoria de nocivas.

Porém, apesar de as substâncias 1, 2 e 3 terem se apresentado, em nossos testes como nocivas, segundo a classificação da comunidade europeia, elas são consideradas como substância, de baixa toxicidade em sistemas de avaliação de toxicidade aguda em roedores, uma vez que a dose letal média encontrada foi para concentrações acima de 1000 mg.kg^{-1} . Estes resultados sugere que estas substâncias podem ter atividade citotóxica e antitumoral, visto que as mesmas podem apresentar ações sobre o material genético e, conseqüentemente, sobre o ciclo celular, o que corrobora com os resultados encontrados em revisão bibliográfica feita por Silva e colaboradores em 2009. Esses autores verificaram que compostos das classes das quinonas, como as substâncias aqui testadas, provocam à redução dos níveis fisiológicos de NAD(p)H, a despolarização da membrana mitocondrial e também levam a uma depuração do DNA, através da formação de aductos, comprovando a relevância na toxicidade desses compostos.

Com a finalidade de avaliar o efeito citotóxico das Arilaminonaftoquinonas 1 e 3 aqui testadas, realizou-se o ensaio com larvas de *Artemia salina*, obtendo para este ensaio uma CL_{50} (PPM) igual a 517.38 para a arilonaftoquinona 1 e de 701.15 para a arilonaftoquinona 2, resultado este que caracteriza tais substâncias como citotóxicas, quando comparado com o lapachol, substância utilizada como padrão neste teste.

O mecanismo de ação das naftoquinonas nos sistemas biológicos ainda não foi totalmente esclarecido. Vários autores afirmam que a citotoxicidade destas substâncias pode ser explicada por dois mecanismos diferentes: 1) derivados de naftoquinonas que produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), como o superóxido ($O_2^- \cdot$) e o radical hidroxila ($HO\cdot$), 2) que reagem com componentes eletrofilicos das células como lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (MEDINA, 2006).

Medina (2006) afirma que o processo de formação de ROS pelas naftoquinonas nas células ocorre porque estes compostos são reduzidos enzimaticamente (figura 25), formando uma semiquinona pelo ganho de elétron. A semiquinona formada apresenta a capacidade de autooxidar-se e de reagir com o oxigênio para oxidar a

quinona. Tal processo, normalmente é promovido pelo citocromo P-450 redutase ou ainda pela DT- diaphorase.

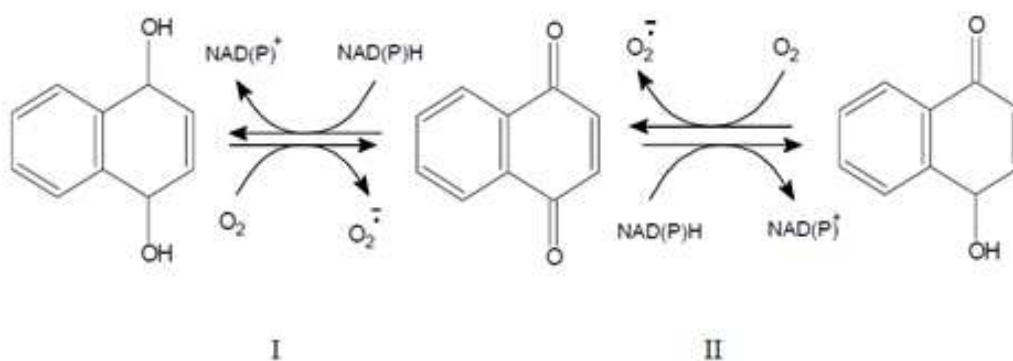


Figura 26: Processo de redução enzimática das naftoquinonas. A reação I demonstra o processo de redução que é realizado pela DT-diaphorase e na reação II pelo citocromo P-450 redutase (MEDINA, 2006).

Segundo Costa (2010), a β -lapachona, um derivado naftoquinônico, também possui efeito citotóxico que pode ser explicado pela sua atuação direta na enzima topoisomerase, inibindo a sua atividade. Estudos de Lee e colaboradores (2005) também verificaram ações biológicas da β -lapachona, incluindo atividades antibacterianas e antifúngicas além de ação citotóxica, para estes autores tais ações estão ligadas à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Sugerimos que o efeito citotóxico encontrado em nosso estudo também se deva à formação de espécies reativas de oxigênio e que na tentativa de eliminar estas espécies oxidantes, as células desencadeiam mecanismos de desintoxicação, através dos agentes antioxidantes intracelulares, levando a persistência do ciclo redox nas células do organismo testado.

Em sistemas onde ocorre uma persistência do ciclo redox, ou então faltam mecanismos de proteção, há aumento intracelular dos oxidantes O₂^{•-} e H₂O₂, o que promove os danos nos componentes celulares vitais, como as membranas, através da peroxidação dos lipídios e a diminuição da capacidade antioxidante celular. Desta

forma, a espécie radicalar HO• pode danificar o genoma, levando a consequências adversas, por alteração do sinal da transcrição na expressão de genes, mutagenicidade e/ou por ativação de fatores responsáveis pela indução da apoptose (SILVA, 2003).

Revisando a literatura encontra-se que o lapachol (substância utilizada como padrão em nosso ensaio com *A. salina*) foi avaliado clinicamente nos tratamentos de carcinoma 36 de Walker-256 e do sarcoma de Yoshida 37 e, embora, promova a regressão definitiva de neoplasias em aproximadamente 30% dos portadores destas patologias, além de agir como analgésico, o mesmo é desaprovado pelos ensaios clínicos em decorrência de efeitos colaterais que, em muito, agravam o quadro clínico de pacientes com câncer (OLIVEIRA, 1990).

Recentemente, o 5-hidroxi-lapachol isolado de *Tectona grandis* mostrou-se mais tóxico que o próprio lapachol, em teste de letalidade com *Artemia salina* (KHAN, 1999), suscitando a possibilidade de uma boa tolerância por exigir doses menores para a ação farmacológica desejada.

Nos ensaios desenvolvidos no presente estudo, verificamos que as Arilaminonaftoquinonas testadas também foram mais tóxicas que o lapachol. Acreditamos que estas substâncias possam ter um futuro promissor, dentro da pesquisa farmacológica, pois apresentam uma boa possibilidade de tolerância celular, o que exige menores doses que o lapachol para verificação de uma ação farmacológica semelhante como agentes anticancer.

No sentido de avaliar os possíveis efeitos citotóxicos e clastogênicos, em células animais, foram analisados respectivamente a relação de eritrócitos policromáticos e normocromáticos, bem como o número de eritrócitos micronucleados provenientes da ação das soluções de Arilaminonaftoquinonas testadas.

Nos ensaios com medula óssea de roedores a frequência de micronúcleos foi estipulada por meio da identificação e contagem de eritrócitos policromáticos

contendo micronúcleo (PCEMNs), segundo metodologia descrita em Utesch e colaboradores (2008) e Valadares e colaboradores (2007), com modificações, e eritrócitos policromáticos normais (PCEs).

A relação PCE/NCE indicativa de citotoxicidade é obtida pela razão entre PCE/PCE+NCE contados em 200 células. Pelo fato de os PCEs serem os precursores dos NCEs durante a maturação, em situações normais, considera-se que as quantidades de PCEs e NCEs sejam semelhantes e que maiores valores para essa relação indiquem ausência de citotoxicidade, isto é, o processo de maturação não é afetado pelos agentes tóxicos. (RIBEIRO, 2003)

Diferentemente, menores valores indicam que menos PCEs tornam-se NCEs e isso pode ser desencadeado ou pelo fato de não serem produzidos mais PCEs ou porque estes entram em apoptose antes da maturação, indicando a citotoxicidade em ambas situações. Portanto a redução drástica da porcentagem de PCE no total de eritrócitos (PCE+NCE), na medula óssea, também indicativa de toxicidade de substâncias (IAEMS), pois indica morte de células jovens ou depressão da proliferação da medula e, para verificar tal efeito das Arilaminonaftoquinonas 1, 2 e 3 sobre células da medula óssea, fez-se a relação PCE/NCE. (RIBEIRO, 2003)

Os resultados obtidos nesta pesquisa, por meio do ensaio do micronúcleo, mostraram ausência de citotoxicidade e mutagenicidade nos três diferentes compostos arilonaftoquinônicos testados, em células de medula óssea de camundongos que receberam três diferentes concentrações de cada uma das Arilaminonaftoquinonas, dissolvidas em dimetilsulfóxido, via gavagem, nas concentrações finais de 50; 100 e 200 mg.kg⁻¹ m.c. Nota-se que a frequência de micronúcleos entre os grupos que receberam as Arilaminonaftoquinonas dissolvidas em DMSO (Tabelas 2, 3 e 4 e figuras 20, 21 e 22) foram similares às aquelas apresentadas pelos grupos controles negativo e solvente. Isso pode estar relacionado ao rápido metabolismo da droga no organismo.

Através da análise das tabelas 2, 3 e 4 e das figuras 23, 24 e 25, notamos que

percentualmente a relação PCE/NCE dos tratamentos estão acima dos controles, mas não caracterizando em uma alta toxicidade de tais drogas sobre a medula óssea, já que esta é dada por uma depressão na percentagem de PCE. Geralmente, a toxicidade excessiva na medula óssea está associada com a depressão de 80% ou mais do valor do controle, o que não foi notado em nossos resultados.

As propriedades citotóxicas das naftoquinonas, embora não totalmente elucidadas, são melhores compreendidas que os mecanismos mutagênicos (MEDINA, 2006). Foram realizados nas últimas décadas vários trabalhos investigando a atividade mutagênica das naftoquinonas, tanto em procariotos como em eucariotos.

Em relação à mutagênese, os resultados encontrados em literatura são conflitantes para diferentes naftoquinonas. Tikkanen *et al.* (1983) constatou que a henna induzia mutações do tipo frameshift na linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium*, enquanto Hakura *et al.* (1994) e Kirkland (2003) diverge deste resultado para henna. Chesis *et al.* (1984) demonstram que a menadiona não induzia mutagênese na linhagem TA104 de *Salmonella typhimurium*, que é sensível a danos oxidativos e a enzima DT-diaforase, entretanto, ao realizar o mesmo ensaio na presença da enzima NADPH-citrocomo P-450 redutase, verificaram que a menadiona causava danos ao DNA pela produção de espécies reativas de oxigênio, Os autores propuseram que as naftoquinonas causam mutações em procariotos por danos oxidativos, pois observaram que ao adicionar as enzimas superóxido dismutase e catalase notaram que a mutagênese promovida pela menadiona em presença da enzima NADPH-citrocomo P-450 redutase era reduzida.

Hakura *et al.* (1994) sugeriu que, as naftoquinonas apresentam uma toxicidade elevada, e por esse fato, pode ter sido difícil identificar a dose exata para o efeito destes compostos, em nossos resultados para toxicidade aguda em camundongos e para toxicidade sobre as células de medula óssea de roedores. Não encontramos uma toxicidade elevada como é comum em compostos naftoquinônicos, o que sugerimos que seja uma vantagem pra que os compostos aqui analisados sejam no futuro testado como agentes antitumorais, uma vez que seus efeitos tóxicos não

devem ser elevados no organismo exposto às doses utilizadas.

Os hepatócitos de ratos apresentam uma grande quantidade de enzimas tais como o citocromo P-450 redutase, glutathiona redutase, entre outras que estão envolvidas na metabolização de uma série de substâncias, incluindo as naftoquinonas.

Os resultados desse estudo com as três diferentes arilaminonaftoquinonas corroboram com aqueles encontrados por Kirkland & Marzin (2003), que utilizando a lawsona ou henna (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) realizaram estudos avaliando a capacidade da henna de induzir mutagênese em diferentes linhagens de células de mamíferos. Os autores concluíram que a henna não é mutagênica nos sistemas testes utilizados por eles que incluíram ensaios *in vivo* e *in vitro*.

Os autores acima citados assim como em nosso estudo, administram a henna por via oral em camundongos e observaram que não houve um aumento significativo na formação de micronúcleos na medula óssea dos animais tratados, fato que também foi observado no presente estudo e que acreditamos que um dos motivos seja o fato de as naftoquinonas aqui testadas terem sido metabolizadas pelo fígado desses animais. Costa (2010) também observou que a β -lapachona não apresentou efeito genotóxico em *Drosophila melanogaster*.

Segundo Tikkanem et al. (1983), capacidade das naftoquinonas formarem ERO é influenciada pela natureza e posição dos substituintes na molécula. Em nosso estudo sugerimos que os substituintes encontrados nas arilaminonaftoquinonas 1, 2 e 3, respectivamente, são os responsáveis pela ausência de mutagenicidade encontrada em nossos resultados, uma vez que esses podem diminuir a formação de EROs.

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que apesar da ausência de genotoxicidade encontrada, o uso futuro dessas arilaminonaftoquinonas 1, 2 e 3 como agentes atumerais devem ser realizados com cautela, uma vez que seus riscos à saúde humana ainda não foram totalmente esclarecidos. Necessita-se de

futuros estudos com essas drogas, com vistas à avaliação dos seus potenciais mutagênicos e antimutagênicos, sobre outros sistemas teste expostos a diversas concentrações da mesma, a fim de validar sua segurança como potencial medicamento.

7 CONCLUSÃO

Considerando o objetivo de avaliar os possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de Naftoquinonas sintéticas por meio de ensaios *in vivo*, os resultados obtidos permitem concluir que:

- As arilaminonaftoquinonas 1, 2 e 3 apresentaram-se como substâncias nocivas, quando da avaliação por meio do teste de DL₅₀ em camundongos.
- As arilaminonaftoquinonas 1 e 3 apresentaram como substâncias citotóxicas quando testadas em larvas de *Artemia salina*.
- As concentrações das arilaminonaftoquinonas 1, 2 e 3 testadas nas concentrações de 50; 100 e 200 mg.kg⁻¹, não induziram citotoxicidade (diminuição da razão PCE:NCE) nem mutagenicidade (aumento da frequência de micronúcleos) às células de medula óssea de camundongos.

Sugere-se, contudo, que outros estudos *in vivo* e *in vitro*, com e sem ativação metabólica e com outras concentrações sejam desenvolvidos para validar a segurança das arilaminonaftoquinonas 1, 2 e 3, para períodos maiores de administração.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011. Disponível em: <<http://websphere.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/13e55c00439da8988617b607ebd78d7a/esclarecimento_paragrafo26.pdf?MOD=AJPERES>> acesso em 21/03/2011>>

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2008.

ALMEIDA, V.L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo celular específicos que interagem com o DNA:uma introdução. **Química Nova**, Vol. 28, No. 1, 118-129, 2005.

ANDRIOLLI, A.C. et al. Avaliação do potencial citotóxico de 2-piridiniformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fé (III) utilizando *Artemia salina*. **Health and Environment Journal**, v. 8, n. 2, 2007.

ANDERSON, D. et al. The effect of antioxidants on bleomycin treatment in *in vitro* and *in vivo* genotoxic assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v.329, n.1, p.37-47, 1995.

ANTUNES, L.M.G.; ARAUJO, M.C.P. Mutagenicity and antimutagenicity of the main food colorings. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.13(2),p. 81-88, maio/ago., 2000.

ARÊAS, P.C.F. **Avaliação da atividade antitumoral de naftoquinonas**. 2007 Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) Programa de Pós-graduação em Neuroimunologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.

BARILE, F. A. **Principles of toxicology testing**. New York: CRC Press, 2007.

CAVALCANTE, M.F. et al. Síntese de 1,3,5-Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v.23, n. 1, p.20-22, 2000.

CHESIS, P.L. et al. Mutagenicity of quinines: Pathways of metabolic activation and detoxification. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.81, p. 1696-1700, 1984.

CHOY, W.N. Regulatory genetic toxicology tests. In: _____. (Ed.) **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 93-113.

COSTA, W.F. **Avaliação da atividade genotóxica do Lapachol e β -Lapachona e anticarcinogênica do Lapachol, em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2010. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

GARÍN-AGUILAR, M. E. et al. Effect of crude extracts of *Erythrina americana* Mill. on aggressive behavior in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v.69, p.189-194, 2000.

HAKURA, A. et al. Mutagenic and cytotoxicity of naphthoquinones for Ames *Salmonella* tester strains. **Chemical Research Toxicology**. V.7 p. 559-567, 1994.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD L. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 2005.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ther.**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HUSSAIN, H. et al. Lapachol: an overview. Special Issue Reviews and Accounts – Arkivoc, p. 145 -171, 2007.

KHAN, R. M.; MLUNGWANA, S. M.; **Phytochemistry**. v.50, p. 439, 1999.

KIRKLAND, D.; MARZIN, D. An assessment of the genotoxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, the natural dye ingredient of Henna. **Mutation Research**. v. 537, p. 183-199, 2003.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**. v. 455, p. 155-166, 2000.

LEE, J.H. et al. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by β -lapachone in human prostate carcinoma cells. **Pharmacology Research**. V.51, p.553-560, 2005.

MCLAUGHLIN, J.L.; ROGERS, L.L.; ANDERSON, J.E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32 p.513-524, 1998.

MEDINA, L.F.C. **Avaliação das atividades bioquímica e genotóxica de aminonaftoquinonas**. 2006 Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MEYER B.N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**. V. 45 P. 31-34, 1982.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Integração de informações dos registros de câncer brasileiros Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde. **Ver. Saúde Pública**; 41(5): 865-68, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Integração de informações dos registros de câncer brasileiros. **Revista de Saúde Pública**, v. 41(5), p. 865-68, 2007.

OLIVEIRA, A. B. et al. Estrutura química e atividade biológica de Naftoquinonas de bignoniáceas brasileiras. **Química Nova**, v.13, p.302, 1990.

Portal do Ministério da saúde. INCA. **Incidência de Câncer no Brasil**. 2005, 1-37. 2006b. Disponível em << <http://www.inca.gov.br>>>

Portal do Ministério da saúde. INCA. **Incidência de Câncer no Brasil**. 2008. Disponível em << <http://www.inca.gov.br>>>

Portal do Ministério da saúde. INCA. **O que é o câncer?** 2011. Disponível em << <http://www.inca.gov.br>>>

Portal do Ministério da saúde. INCA. **Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil**. 2010. Disponível em <<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>>>

Portal da Secretaria de Saúde do Espírito Santo. Disponível em << <http://www.saude.es.gov.br/>>> acesso em maio de 2009.

Portal da Secretaria de Saúde da Prefeitura de Vitória ES. Disponível em << <http://www.vitoria.es.gov.br/secretarias/saude/home.asp>>> acesso em março de 2011.

PRESTON, R. J.; SAN SEBASTIAN, J. R.; McFEE, A. F. The *in vitro* human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. **Mutation Research**, v. 189, p.175-183, 1987.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.S.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 173-200.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES,E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogenese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.S.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 21-28.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na lapachona e derivados. **Química Nova**, Vol. 26, No. 3, 407-416, 2003

TIKKANEN, L. et al. Mutagenicity of natural naphthoquinones and benzoquinones in *Salmonella*/microsoma test. **Mutation Research**, v.124,p. 25-34, 1983.

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

UMEGAKI, K.; URAMOTO, H.; ESASHI, T. Lack of influence of a long-term high or low vitamin E diet on oxidative DNA damage in the bone marrow of mice. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v. 67, p.149-154, 1997.

UTESCH, D. et al. Evaluation of the potential *in vivo* genotoxicity of quercetin. **Mutat. Res.**, v. 654, p. 38-44, 2008.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a “Era do teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3(2), p. 93-98, 2006.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C. de; CUNHA, L. C. da. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 631-638, 2007.

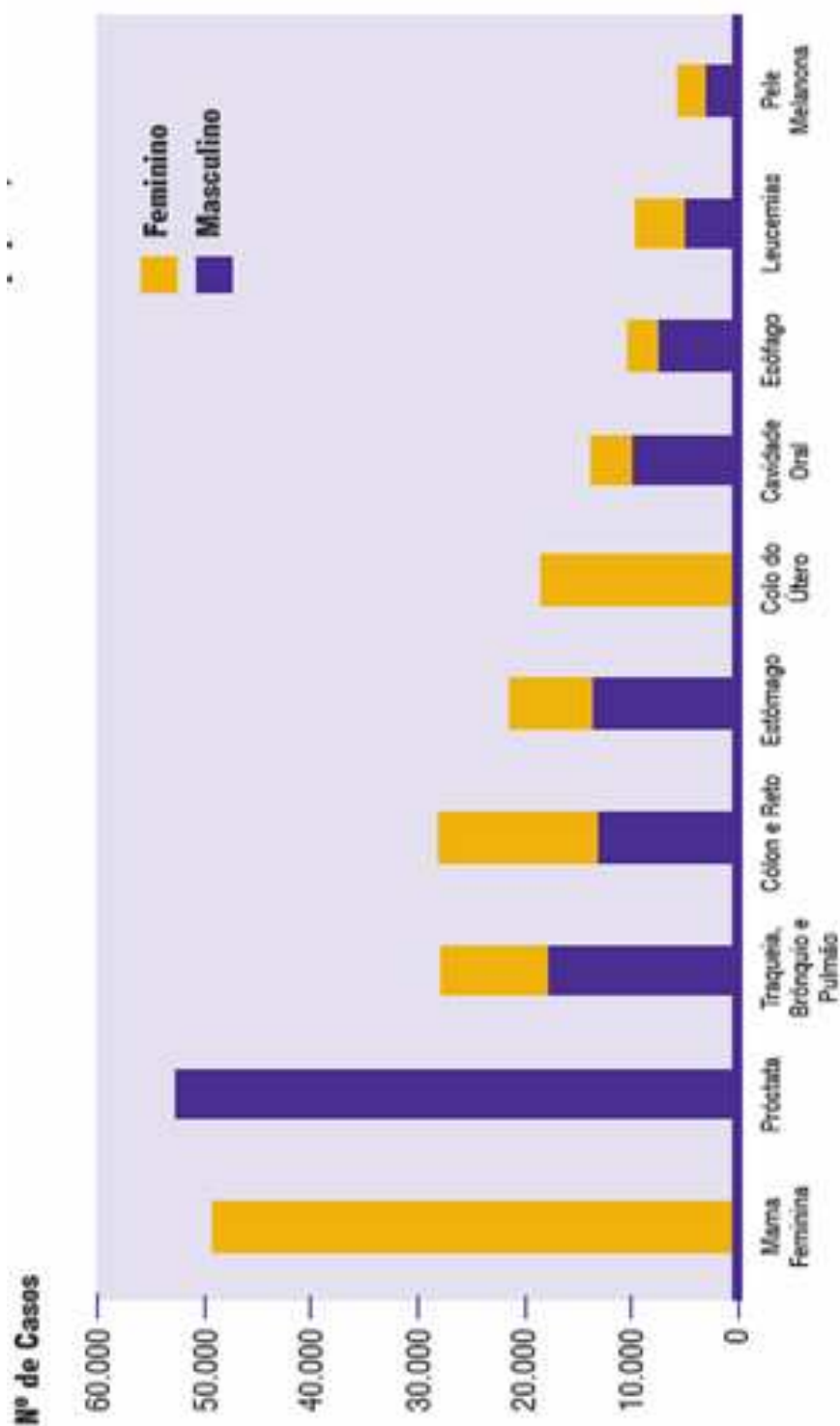
WATERS, M.D. et al. Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, n.1, p.109-129, 1996.

WEIJL, N. I. et al. Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated cisplatin-based

chemoterapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. **Eur. J. Cancer**, v. 40, p. 1713-1723, 2004.

WEI, P. et al. New potential inhibitors of DNA topoisomerase. Part II: Design and synthesis of alpha-lapachone derivatives under microwave irradiation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry letters**, Amsterdam, vol. 19, n°3, p. 828-830, 2009.

ANEXO A – TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES EM 2010, EXCETO PELE NÃO MELANONA, NA POPULAÇÃO BRASILEIRA.



Fonte: Instituto Nacional do câncer – INCA/MS

ANEXO B – TAXAS BRUTAS DE INCIDENCIA POR 100 MIL DE NÚMEROS DE CASOS NOVOS POR CÂNCER, EM HOMENS, SEGUNDO A LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA* PARA O ESTADO DO ES E SUA CAPITAL VITÓRIA EM 2010.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos					
	Estado			Capital		
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	1.040	57,03	130	79,24		
Traqueia, Brônquio e Pulmão	330	18,09	40	27,10		
Estômago	360	19,72	40	21,85		
Cólon e Reto	220	11,97	30	20,26		
Cavidade Oral	240	13,41	30	18,29		
Esôfago	220	12,05	20	12,71		
Leucemias	100	5,39	**	8,12		
Pele Melanoma	50	2,82	**	6,29		
Outras Localizações	1.170	64,13	220	134,18		
Subtotal	3.730	204,45	530	323,24		
Pele não Melanoma	970	53,30	80	47,07		
Todas as Neoplasias	4.700	257,60	610	369,41		

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

**menor que 15 casos.

Fonte: Instituto Nacional do câncer – INCA/MS

ANEXO C - TAXAS BRUTAS DE INCIDENCIA POR 100 MIL DE NÚMEROS DE CASOS NOVOS POR CÂNCER, EM MULHERES, SEGUNDO A LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA* PARA O ESTADO DO ES E SUA CAPITAL VITÓRIA EM 2010.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos					
	Estado			Capital		
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	820	44,14	130	69,17		
Colo do Útero	440	23,78	30	18,00		
Cólon e Reto	260	14,02	50	24,83		
Traqueia, Brônquio e Pulmão	170	9,01	20	13,08		
Estômago	160	8,62	20	12,56		
Leucemias	80	4,45	**	5,76		
Cavidade Oral	100	5,20	20	9,23		
Pele Melanoma	40	2,40	**	4,72		
Esôfago	70	3,55	**	3,05		
Outras Localizações	1.450	78,07	200	109,00		
Subtotal	3.590	193,30	500	272,49		
Pele não Melanoma	1.050	56,59	170	95,07		
Todas as Neoplasias	4.640	250,00	670	363,33		

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

**menor que 15 casos.

Fonte: Instituto Nacional do câncer – INCA/MS