

LÍGIA SANTOS PEDROSO

**EFEITO DOS METÓXI-CATECÓIS APOCININA, CURCUMINA E VANILINA
SOBRE A ATIVIDADE CITOTÓXICA DO TAMOXIFENO**

GUARAPUAVA

2011

LÍGIA SANTOS PEDROSO

**EFEITO DOS METÓXI-CATECÓIS APOCINIA, CURCUMINA E VANILINA
SOBRE A ATIVIDADE CITOTÓXICA DO TAMOXIFENO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, curso de Pós-Graduação da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil
Coorientadora: Prof. Dra. Rubiana Mara Mainardes

GUARAPUAVA

2011

*Remember when you were young,
You shone like the sun.
Shine on you crazy diamond.
Now there's a look in your eyes,
Like black holes in the sky.
Shine on you crazy diamond.
You were caught on the crossfire
Of childhood and stardom,
Blown on the steel breeze.
Come on you target for faraway laughter,
Come on you stranger, you legend,
You martyr, and shine!*

*You reached for the secret too soon,
You cried for the moon.
Shine on you crazy diamond.
Threatened by shadows at night,
And exposed to the light.
Shine on you crazy diamond.
Well you wore out your welcome
With random precision,
Rode on the steel breeze.
Come on you raver, you seer of visions,
Come on you painter, you piper,
You prisoner, and shine!*

*Nobody knows where you are,
How near or how far.
Shine on you crazy diamond.
Pile on many more layers and
I'll be joining you there.
Shine on you crazy diamond.
And we'll bask in the shadow
Of yesterday's triumph,
And sail on the steel breeze.
Come on you boy child,
You winner and loser,
Come on you miner for truth and delusion,
and shine!*

Pink Floyd

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho Henrique, companheiro de todas as horas, luz nos momentos de escuridão, anjo que auxilia a trilhar o meu caminho...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil, pela oportunidade, respeito, orientação, ensinamentos e competência que me levaram a finalizar este trabalho.

À Profa. Dra Rubiana Mara Mainardes, pela dedicação, orientação e grande contribuição durante a confecção do artigo.

Ao Prof. Dr. Giovani Marino Fávero, pelo apoio e contribuição para o desenvolvimento e realização dos experimentos da atividade antitumoral.

À Coordenação da Capes, pelo auxílio financeiro com a bolsa de estudos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Nanotecnologia, pela atenção e cooperação durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Às estagiárias em iniciação científica, Andressa, Thaysa e Loriangela pela amizade, orientação e boa vontade.

À todos os professores do Programa de Pós- Graduação, pela atenção e por compartilhar seus conhecimentos profissionais.

À funcionária Elisângela, pelo carinho, atenção e paciência com que mantinha-nos sempre informada.

À todas as colegas pós-graduandas, Carolina, Michele, Sheila, Luciana E., Luciana D. e Thuane pela convivência, aprendizado, troca de experiências, conversas e risadas. Em especial à Luciana E. e Sheila pela amizade, companheirismo, dedicação e cooperação, a qualquer hora, em todos os experimentos.

À minha família, pelo amor, carinho, dedicação, conselhos e paciência que me conduziram até o final deste trabalho. Em especial ao Klaus, meu marido e ao Henrique, meu filho, pelo companheirismo e amor incondicional.

RESUMO

O tamoxifeno (TAM) é um agente sintético, anti-estrogênico e não esteroide, que comumente é prescrito no tratamento de pacientes com câncer de mama. Vários efeitos colaterais estão associados ao seu uso, como alterações vaginais, irregularidade menstrual, formação de pólipos no endométrio, cistos ovarianos, tromboembolismo, hepatocarcinoma, entre outros. Alguns produtos naturais são uma excelente estratégia na busca de novas drogas antitumorais, devido ao conhecimento popular de seu uso. A associação de produtos naturais às drogas quimioterápicas clássicas tem mostrado um efeito sinérgico de grande interesse para a terapia antitumoral. A atividade citotóxica da curcumina é bem estabelecida em vários tipos de linhagens de células tumorais e tem sido amplamente estudada. A vanilina também tem mostrado atividade sobre as células tumorais devido aos seus efeitos citotóxicos e citostáticos. Já os efeitos da apocinina são devidos, principalmente, à sua eficiente inibição do complexo NADPH-oxidase, e consequentemente, de espécies reativas de oxigênio. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos metóxi-catecóis apocinina, curcumina e vanilina sobre a citotoxicidade em células normais, hemácias e leucócitos polimorfonucleares, e em células de leucemia mielóide crônica humana (K562) exercida pelo TAM, como também a atividade antioxidante destes compostos. A citotoxicidade foi analisada em hemácias através da liberação de hemoglobina e K^+ , e a curcumina foi o único composto que diminuiu a citotoxicidade do TAM sobre essas células. Em relação aos leucócitos polimorfonucleares foi possível observar que a apocinina, a curcumina e a vanilina aumentaram significativamente a viabilidade de células expostas ao TAM, avaliado pelo teste de exclusão do azul de tripan. A atividade citotóxica sobre a linhagem celular de leucemia mielóide crônica humana (K562) através do (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil-tetrazólio, brometo de MTT) em intervalos de 24, 48 e 72 h mostrou que entre os metóxi-catecóis (em associação com o TAM), a vanilina apresentou a maior atividade seguida pela apocinina e curcumina. A atividade antioxidante também foi verificada a fim de observar se havia relação com os efeitos evidenciados. Esta atividade foi analisada através do radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), ABTS^{•+}, e a apocinina foi a que apresentou atividade mais pronunciada, seguida por curcumina e vanilina; entretanto não houve relação entre a atividade antioxidante dos metóxi-catecóis com os resultados citados. Os resultados apontam para o potencial terapêutico do TAM em associação com os metóxi-catecóis testados, especialmente a curcumina, que além de potencializar o efeito citotóxico sobre as células K562 foi capaz de diminuir a citotoxicidade exercida pelo TAM sobre hemácias.

Palavras-chave: tamoxifeno, apocinina, curcumina, vanilina, citotoxicidade

ABSTRACT

Tamoxifen (TAM) is a synthetic nonsteroidal anti-estrogen, commonly prescribed to treat patients with breast cancer. Documented adverse effects of chronic TAM use include vaginal changes, menstrual irregularities, formation of endometrial polyps, ovarian cyst formation, thromboembolism, liver cancer, among others. Natural products are excellent candidates for new antitumor drugs, as they are widely-available and generally display low toxicity. Natural products may be more useful in combination with other chemotherapeutic drugs to obtain synergistic antitumor effects. The cytotoxic activity of curcumin has been shown in multiple tumor cell lines and has been widely studied. The vanillin has also shown activity on tumor cells due to their cytotoxic and cytostatic. Since the effects of apocynin are primarily due to its efficient inhibition of NADPH oxidase complex, and consequently, reactive oxygen species. It was studied the effect of treatment with the methoxy-catechols apocynin, curcumin and vanillin on tamoxifen (TAM)-induced cytotoxicity in normal and tumor cells. By assessing the release of hemoglobin and K^+ , the curcumin to be the only compound that decreased the cytotoxicity of TAM in red blood cells; however, in polymorphonuclear leukocytes, it was observed that apocynin, curcumin and vanillin all significantly increased the viability of cells exposed to TAM. Cytotoxic activity was assessed in the human chronic myeloid leukemia (K562) cell line by (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) at 24, 48 and 72 h post-treatment. Among the methoxy-catechols (in association with TAM), vanillin presented the highest cytotoxic activity, followed by apocynin and curcumin. Measurement of antioxidant activity by the 2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay revealed apocynin to have the highest activity, followed by curcumin and vanillin. No relationship was found between the antioxidant activities of the methoxy-catechols and the ability of these compounds to influence TAM-associated cytotoxicity. These results point to the potential therapeutic value of the tested methoxy-catechols in combination with TAM, particularly that of curcumin, which potentiates the cytotoxic effects of TAM on tumor cells (K562) and also decreases TAM-associated cytotoxicity in red blood cells.

Keywords: tamoxifen, apocynin, curcumin, vanillin, cytotoxicity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. Câncer.....	7
1.1.1. Carcinogênese.....	7
1.1.2. Vias de sinalização.....	8
1.1.2.1. NF- <i>kappa</i> B.....	9
1.2. Tamoxifeno.....	10
1.3. Metóxi-catecóis.....	13
1.3.1. Apocinina.....	13
1.3.2. Curcumina.....	16
1.3.3. Vanilina.....	18
1.4. Sinergismo.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivos gerais.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. ARTIGO.....	23
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
5. REFERÊNCIAS.....	50
6. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas da carcinogênese.....	8
Figura 2 – Ilustração da <i>Picrorhiza kurroa</i>	13
Figura 3 – Mecanismo de inibição da NADPH-oxidase pela apocinina	15
Figura 4 – Ilustração da <i>Curcuma longa</i>	16
Figura 5 – Ilustração da <i>Vanilla planifolia</i>	19

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1 – Processo de metabolização do TAM	11
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

NF- κ B	Fator nuclear kappa B
I κ B	Proteína inibitória kappa B
TAM	Tamoxifeno
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
MPO	Mieloperoxidase
ABTS ^{•+}	Radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
K ⁺	Íons Potássio

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é considerado um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (GUERRA *et al.*, 2005). O seu surgimento caracteriza-se pelo crescimento desordenado de células anormais que escapam dos mecanismos de restrição, que normalmente controlam a expansão desfavorável dessas células. Esta proliferação celular tende a ser rápida, agressiva e incontrolável, favorecendo a propagação (metástase) para outros tecidos do organismo (RUMYANTSEV, 2010).

Segundo um relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS, foi estimado para o ano de 2011 a ocorrência de 12,4 milhões de novos casos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Destes, destacam-se o câncer de pulmão (1,52 milhões), mama (1,29 milhões), cólon e reto (1,15 milhões); prevalecendo o câncer de próstata entre os homens e o câncer de mama entre as mulheres (INCA, 2011).

1.1.1. Carcinogênese

O câncer é ocasionado por alterações no DNA, através da ação de fatores físicos, biológicos, químicos ou hereditários (BERTRAM, 2001). Entre os genes passíveis de sofrer mutações genéticas, podem-se citar os proto-oncogenes, genes supressores, genes que regulam a apoptose e genes que regulam o reparo do DNA danificado. Os proto-oncogenes são responsáveis por codificar proteínas essenciais ao crescimento e diferenciação celular. Quando alterados, também chamados de oncogenes, podem ocasionar a oncogênese e o crescimento descontrolado. Os genes supressores são responsáveis por inibir o processo de divisão e diferenciação das células que sofreram mutação. Outra classe de genes que podem sofrer alterações são os genes reguladores de apoptose, responsáveis por ocasionar a morte de células danificadas e que não foram reparadas. Por fim, a classe dos genes que regulam o reparo do DNA danificado, se alterados, influenciam na capacidade de regenerar erros ocasionados ao DNA durante a divisão celular (FILHO & GATTÁS, 2001; WARD *et al.*, 2002).

A carcinogênese é um processo lento e consiste em três etapas principais: iniciação, promoção e progressão (Figura 1). A iniciação ocorre através da ação de carcinógenos que modificam um ou mais genes. Na fase da promoção, é necessária a exposição contínua ao carcinógeno para que a célula iniciada seja transformada em célula maligna, logo podemos dizer que esta fase é reversível. Já a progressão é uma etapa irreversível, em que ocorre a multiplicação celular desordenada das células tumorais (BERTRAM, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2005).

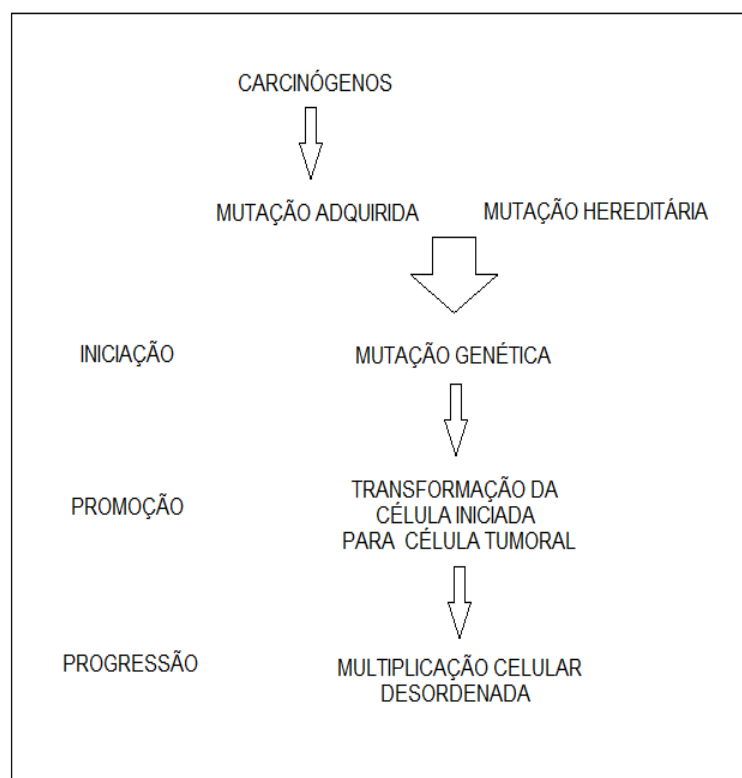


Figura 1. Etapas da Carcinogênese.

Concomitante à multiplicação celular desordenada, o desenvolvimento de vasos sanguíneos (angiogênese) é essencial para nutrir e suprir as células tumorais, garantindo seu crescimento e desenvolvimento (CARMELIET & JAIN, 2000).

1.1.2. Vias de sinalização

A proliferação e o crescimento celular são regulados por inúmeras vias de sinalização. A exposição das células ao estresse contínuo (fatores internos e/ou externos) associado à falha no sistema de homeostasia favorece a ocorrência de

alterações nestas vias de sinalização, contribuindo para o surgimento do câncer. Entre as muitas vias de sinalização que estão relacionadas ao câncer, como fatores de transcrição, fatores de crescimento, receptores e enzimas (HANAHAN & WEINBERG, 2000), a via do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) é uma das mais estudadas e compreendidas. Compostos como a curcumina e a vanilina têm sua atividade antitumoral atribuída à regulação desta via (BAVA *et al.*, 2011; LIRDPRAPAMONGKOL *et al.*, 2010).

1.2.1.1. NF- κ B

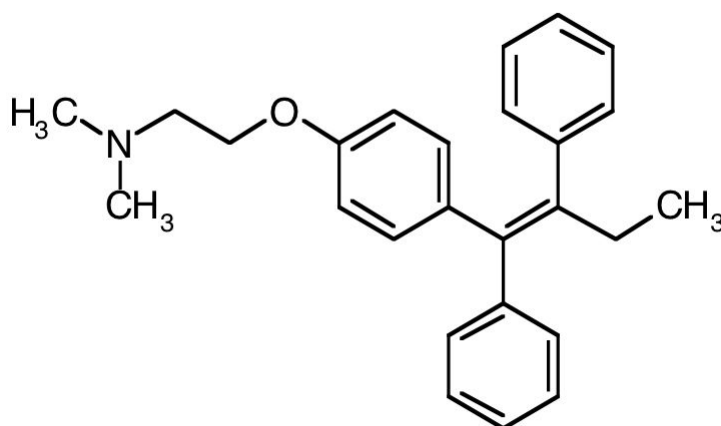
O NF- κ B é um fator de transcrição nuclear que regula a expressão do gene que codifica a cadeia β da imunoglobulina dos linfócitos B (GLEZER *et al.*, 2000). Este complexo é formado por dímeros que podem se recombinar entre cinco subunidades (p65, p50, cRel, RelB e p52). Essa associação tende a ser específica dependendo do tipo de célula (NAUGLER & KARIN, 2008). O NF- κ B fica ancorado no citoplasma, ligado a proteína inibitória (I κ B), que regula a sua atividade (LIN *et al.*, 1998). Alguns dos fatores que ativam o NF- κ B são citocinas, fator de necrose tumoral, lipopolissacarídeos, neurotransmissores, medicamentos, radiação ultra-violeta, entre outros (GLEZER *et al.*, 2000; AHN & AGGARWAL, 2005). Quando ativado, ocorre uma fosforilação na I κ B, degradando-a e consequentemente permitindo a translocação do NF- κ B para o núcleo (GLEZER *et al.*, 2000). O NF- κ B tem atribuições na regulação da transcrição (ativador); regulação da apoptose (anti-apoptótico); e regulação da proliferação (promotor) (LIN *et al.*, 1998). A ativação do NF- κ B está diretamente relacionada ao câncer, induzindo a proliferação celular, inibindo a apoptose, participando da metástase e da angiogênese, assim como à resistência ao tratamento quimioterápico (PARRONDO *et al.*, 2010; NAUGLER & KARIN, 2008). Inibidores do complexo NF- κ B representam um interessante foco na pesquisa de estratégias terapêuticas para prevenção e tratamento de tumores. Um exemplo é a curcumina, um produto natural cuja atividade anticarcinogênica está associada à sua capacidade de inibir o NF- κ B (SINGH & AGGARWAL, 1995; THANGAPAZHAN *et al.*, 2006).

1.2. Tamoxifeno

A cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia são algumas das formas de tratamento para o câncer. Utilizadas isoladamente ou combinadas, o objetivo é curar e/ou melhorar a qualidade de vida do paciente. Entre elas, a quimioterapia é a forma de tratamento mais utilizada e consiste na administração de fármacos que atuam a nível celular, reduzindo e/ou impedindo o crescimento das células tumorais. A grande maioria dos agentes quimioterápicos, não somente provocam a morte das células tumorais, como também induzem o surgimento de severos danos às células normais do homem, causando grandes dificuldades na adesão ao tratamento devido aos sérios efeitos colaterais (SANTOS & CRUZ, 2001).

O tamoxifeno (TAM) é um agente sintético anti-estrogênico não esteroideamente comumente prescrito no tratamento de pacientes com câncer de mama ou como paliativo em mulheres com alto risco de desenvolver o tumor (PETINARI *et al.*, 2004).

Quimicamente, o TAM 1-[4-(2-dimetil-aminoetoxi)fenil]-1, 2-difenil-1-buteno) (**1**) (TABASSUM *et al.*, 2006) é um isômero derivado do trifeniletileno, sendo encontrado tanto na configuração *cis* quanto *trans*, mas somente a forma *trans* é farmacologicamente ativa (LAZARUS *et al.*, 2009).

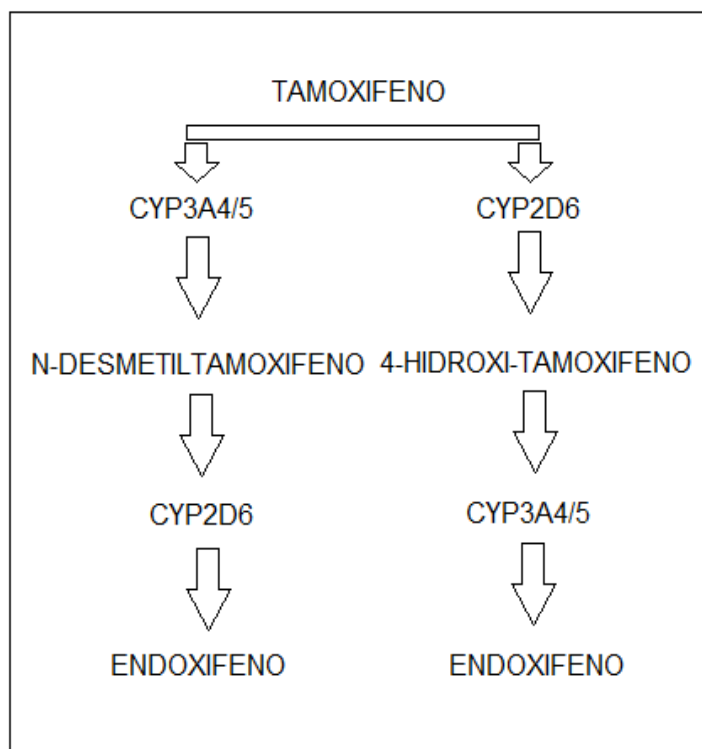


1

O TAM pertence à família dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênio, que representam moléculas que se ligam com alta seletividade e

afinidade pelos receptores de estrogênio, resultando na atividade molecular e biológica (MOCANU & HARRISON, 2004)

O TAM é um fármaco lipofílico, facilmente absorvido, e possui alta afinidade pela albumina, sendo encontrada fortemente ligado à esta proteína na corrente sanguínea. Quando o TAM é metabolizado, dá origem a outros compostos farmacologicamente ativos. Primeiramente é formado o *N*-desmetiltamoxifeno, composto menos ativo e posteriormente, o endoxifeno e 4-hidroxitamoxifeno, compostos com maior atividade devido à alta afinidade pelos receptores de estrogênio. A metabolização do TAM (Esquema 1) ocorre através da ação de enzimas citocromo P-450, sendo a isoforma CYP3A4/5 responsável pela formação do metabólito *N*-desmetiltamoxifeno e endoxifeno e a isoforma CYP2D6, pela formação do 4-hidroxitamoxifeno e endoxifeno (OSEN *et al.*, 2008; BRAUCH & JORDAN, 2009).



Esquema 1. Processo de metabolização do TAM.

Após a difusão pela membrana celular, o TAM e seus metabólitos ligam-se aos receptores de estrogênio no núcleo. Há duas isoformas de receptores de estrogênio, α e β . Os receptores de estrogênio α são encontrados na mama, útero,

hipotálamo, hipófise e ovários. Já os receptores de estrogênio β estão presentes nos pulmões, rins, timo, hipotálamo, próstata, ovário, testículos, sistema digestório e mama (OSENÍ *et al.*, 2008). Quando ligados aos receptores de estrogênio, o TAM e seus metabólitos alteram sua conformação espacial, resultando na exposição de diferentes aminoácidos, facilitando a ligação de moléculas regulatórias. Estas moléculas podem tanto ativar (co-ativadores) quanto reprimir (co-repressores) a transcrição gênica, promovendo a resposta estrogênica (MOCANU & HARRISON, 2004; OSENÍ *et al.*, 2008).

Segundo Goetz *et al.* (2008), a ligação do TAM e seus metabólitos aos receptores de estrogênio produzem um complexo que possui ação tanto agonista (ossos e sistema cardiovascular) quanto antagonista (células mamárias); entretanto sua atividade efetiva ou tóxica é dependente da concentração.

O TAM e seus metabólitos são eliminados por glucuronidação, através da enzima UDP-glucuronosiltransferase, sendo excretados predominantemente através da bile (LAZARUS *et al.*, 2009).

A ação antitumoral do TAM não se deve somente a ação agonista e antagonista aos receptores de estrogênio. Entre os mecanismos propostos pode-se citar a interação com biomembranas (lipídios e proteínas). Estas modificações morfológicas e estruturais propiciam tanto a atividade antitumoral (SILVA *et al.*, 1999) quanto a atividade antifúngica (DOLAN *et al.*, 2009), e também os efeitos tóxicos, como anemia hemolítica. Outros efeitos do TAM como inibição da proteína C quinase, inibição AMPc fosfodiesterase, indução da apoptose, ainda não tem seus mecanismos de ação completamente elucidados (SILVA *et al.*, 1999; ENGELKE *et al.*, 2001).

O uso do TAM induz vários efeitos colaterais, como irregularidade menstrual, fadiga, depressão, risco de gravidez múltipla (MUNSHI & SINGH, 2008), hiperplasia, formação de pólipos do endométrio (SENKUS-KONEFKA *et al.*, 2004), adenocarcinoma, cistos ovarianos, tromboembolismo, hepatocarcinoma (MOCANU & HARRISON, 2004; SINGH & KHAR, 2006) e retinopatia (HUANG *et al.*, 2009).

1.3. Metóxi-Catecóis

1.3.1. Apocinina

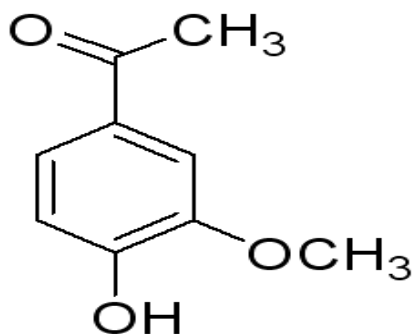
A apocinina é um composto isolado das raízes da *Picrorhiza kurroa* (Figura 2), uma planta nativa das montanhas da Índia, Nepal, Tibet e Paquistão (STEFANSKA & PAWLICZAK, 2008). A *Picrorhiza kurroa*, tradicionalmente, tem sido utilizada para tratamento de desordens hepáticas, gastrointestinais (BANERJEE *et al.*, 2008) e patologias associadas ao trato respiratório (WANG *et al.*, 2008).



Figura 2. Ilustração da *Picrorhiza kurroa*.

(<http://www.nacop.in/picrorhiza-kurroa.htm>)

A apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) (2) é uma acetofenona que possui algumas características, como um leve odor de baunilha, capacidade de formar cristais na água, baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais (STEFANSKA & PAWLICZAK, 2008).



2

A apocinina é conhecida devido a sua capacidade de inibir o complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase. A NADPH-oxidase é a enzima que catalisa a formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), um precursor de várias espécies reativas, as quais são produzidas para destruir microorganismos invasores e/ou tecidos danificados (BABIOR, 1999).

A enzima NADPH oxidase é formada por cinco subunidades ($p40^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$, $p67^{PHOX}$, $p22^{PHOX}$ e $gp91^{PHOX}$). Quando a enzima está inativa, as subunidades, $p40^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$, $p67^{PHOX}$ encontram-se complexadas no citosol e as subunidades, $p22^{PHOX}$ e $gp91^{PHOX}$ encontram-se na membrana. Através de estímulos fisiológicos, as subunidades do citosol migram para se juntar às subunidades da membrana, ativando o complexo NADPH-oxidase e iniciando a transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio, formando o $O_2^{\bullet-}$ (BABIOR, 1999).

A enzima mieloperoxidase (MPO), expressa por neutrófilos (células fagocíticas), é extremamente importante para a ação inibitória da apocinina (XIMENES *et al.*, 2007). Na célula fagocítica, em presença da MPO e peróxido de hidrogênio, a apocinina forma um dímero e conseqüentemente inativa o complexo NADPH-oxidase (Figura 3) (TOUYZ, 2008). Em células não-fagocíticas (células vasculares, células endoteliais), ou seja, células que não apresentam MPO, a apocinina atua como antioxidante, reduzindo as espécies reativas já formadas (TOUYZ, 2008; HEUMULLER *et al.*, 2008).

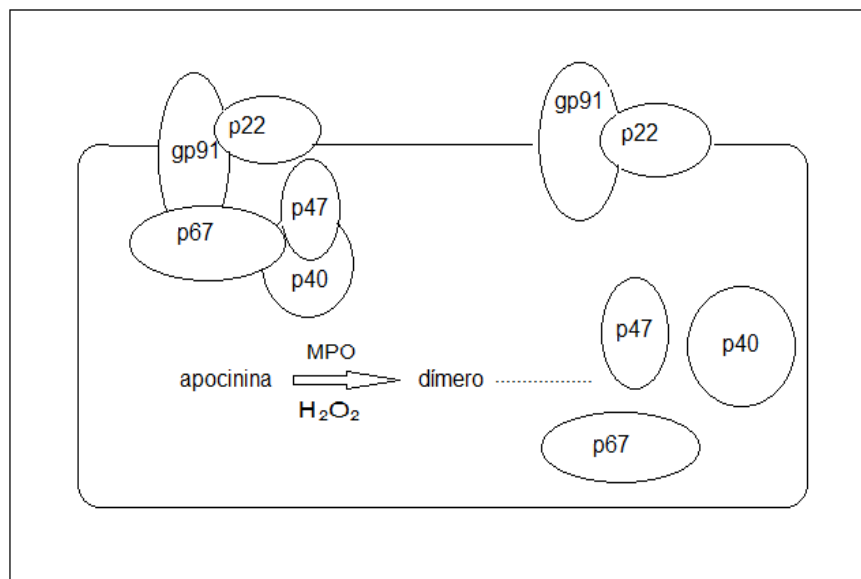


Figura 3. Mecanismo de inibição do complexo NADPH-oxidase pela apocinina. Adaptado de TOUYZ (2008).

Múltiplos processos fisiopatológicos estão associados às espécies reativas, como envelhecimento, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, respiratórias e tumorais (BABIOR, 2000). Esses processos inflamatórios ocorrem devido ao aumento da atividade NADPH-oxidase ou ao desequilíbrio no balanço redox.

Na hipertensão e aterosclerose, devido à atividade NADPH-oxidase aumentada, ocorre um desequilíbrio no balanço redox. A apocinina, nestas células, atua como antioxidante, prevenindo os riscos dessas doenças, ou até mesmo, tratando-as (HEUMULLER *et al.*, 2008; TOUYZ, 2008). A apocinina também inibe a formação do radical peroxinitrito. Este radical está relacionado às lesões no epitélio, hiperresponsividade e liberação de mediadores químicos, fatores característicos de inflamação no trato respiratório como ocorre na asma e que podem ser amenizados com o uso da apocinina (STEFANSKA & PAWLICZAK., 2008).

Segundo Lafeber *et al.* (1999), a apocinina poderia ser um possível alvo terapêutico no tratamento da artrite reumatóide devido a sua capacidade de inibir algumas citocinas importantes neste processo inflamatório, como as interleucinas (IL-1, IL-4, IL-10) e interferons (TNF- α , TNF- γ).

A formação de espécies reativas ocasionado pela atividade da NADPH-oxidase tem um papel importante na fisiopatologia do câncer, estimulando o crescimento e a angiogênese das células tumorais (USHIO-FUKAI & NAKAMURA, 2008). Inibidores deste complexo, NADPH-oxidase, poderiam ser uma efetiva estratégia terapêutica para o tratamento desta patologia, melhorando a qualidade de vida destes pacientes.

1.3.2. Curcumina

A curcumina é um pigmento extraído da raiz do açafrão-da-índia (*Curcuma longa*). A *Curcuma longa* (Figura 4) é a espécie mais freqüente do gênero, amplamente cultivada em regiões tropicais, principalmente da Ásia. É utilizada como um estimulante aromático e confere ao açafrão-da-índia a sua cor amarela (ARAÚJO & LEON, 2001).



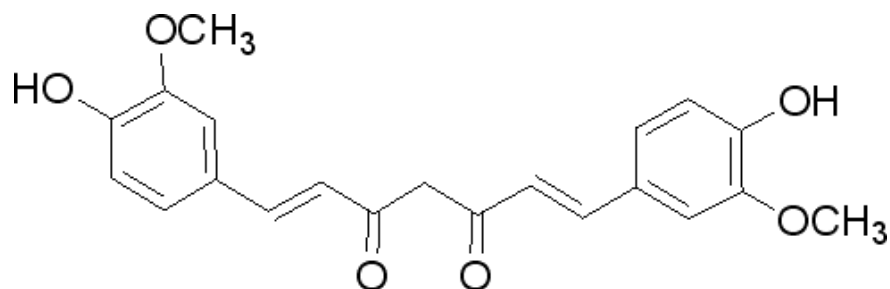
Figura 4. Ilustração da *Curcuma longa*

(<http://www.amrutaherbals.com/specifications/Haldi/detail.htm>)

Quimicamente, a curcumina [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 6-heptadiene-3, 5-dione] (**3**) é um bis- α,β -insaturada β -dicetona, a qual exhibe tautomerismo ceto-enol, predominando a forma ceto em meio neutro e ácido e a estável forma enol em meio alcalino (ANAND *et al.*, 2008).

Diversos fatores afetam a sua biodisponibilidade, como a sua baixa

absorção intestinal e rápida metabolização e excreção (ANAND *et al.*, 2008).



3

As propriedades antiinflamatórias da curcumina são conhecidas há bastante tempo na Índia, China e Indonésia, e têm despertado a atenção dos pesquisadores para o estudo dos mecanismos moleculares associados à sua atividade biológica. A ação antiinflamatória da curcumina deve-se, especialmente, à inibição da produção de citocinas, agentes mediadores do processo inflamatório (CHAN, 1995).

A curcumina também possui atividade antimalárica (REDDY *et al.*, 2005), atividade antioxidante (RUBY *et al.*, 1995), capacidade de inibir a atividade da monoamino-oxidase B (RAJESWARI & SABESAN, 2008), ação antifúngica (CHO *et al.*, 2006) e antimicrobiana (PÉRET-ALMEIDA *et al.*, 2008).

Há relatos de que a curcumina pode reduzir a incidência e a prevalência da doença de Alzheimer através da redução dos danos oxidativos (BEGUM *et al.*, 2008); e inibir a apoptose de células neuronais através da redução de espécies reativas de oxigênio, via α -sinucleína, demonstrando ser uma possível terapia para a doença de Parkinson (WANG *et al.*, 2010).

A curcumina está entre os mais promissores e eficazes agentes quimiopreventivos (SINGH & KHAR, 2006) e tem se mostrado potencialmente efetiva contra inúmeros tipos de câncer. Já foram descritas propriedades antiproliferativas sobre os tumores de pele (LU *et al.*, 1994; LIMTRAKUL *et al.*, 1997; HUANG *et al.*, 1997), cólon (KIM *et al.*, 1999; RAO *et al.*, 1995; KAWAMORI *et al.*, 1999), fígado (CHUANG *et al.*, 1992), células pituitárias (MILLER *et al.*, 2008), próstata (BARVE *et al.*, 2008) e pâncreas (LEV-ARI *et*

al., 2007).

Os múltiplos efeitos terapêuticos da curcumina devem-se a sua habilidade de modular a atividade de diversas enzimas, a expressão gênica das células tumorais (WU *et al.*, 2007), e especialmente por ser um potente inibidor de NF- κ B, um fator de transcrição implicado na patogênese de diversos tumores malignos (SINGH & AGGARWAL, 1995).

A curcumina também pode atuar no DNA, modulando a expressão de genes supressores (BRCA-1; p53) e de genes que regulam a apoptose (Bax). Em experimentos utilizando células de câncer de mama (MCF-7) e incubando-as com curcumina, foi possível observar um aumento da expressão da proteína BRCA-1, e conseqüente aumento da apoptose (JI, 2010); aumento da expressão do gene p53, induzido pelo aumento da expressão do gene Bax, promovendo, também, a apoptose celular (CHOUDHURI *et al.*, 2002). A efetividade da curcumina em promover a apoptose foi demonstrada em outros estudos, utilizando diferentes linhagens celulares como, células de câncer ovariano (SHI *et al.*, 2006) e células de câncer de pulmão (PILLAI *et al.*, 2004).

Segundo Banerjee *et al.* (2008), os inúmeros efeitos benéficos da curcumina podem ser afetados dependendo da sua concentração. Utilizando um modelo para hemácias e observando a hemólise, lipoperoxidação, concentração da glutathiona reduzida e íons potássio (K^+), foi possível constatar a atuação da curcumina, em baixas concentrações ($<10\mu\text{M}$) como agente antioxidante, e em altas concentrações como agente pró-oxidante.

1.3.3. Vanilina

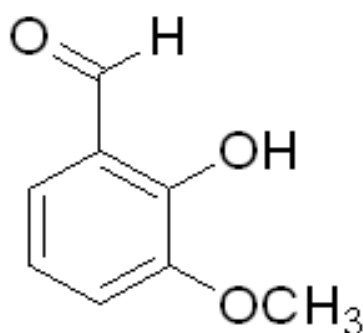
A vanilina é um composto natural encontrado na vagem da orquídea da *Vanilla planifolia* (Figura 5) e amplamente cultivada em Madagascar, México, Taiti e Indonésia, seus principais produtores mundiais (PACHECO & DAMASIO, 2010).



Figura 5. Ilustração da *Vanilla planifolia*.

(<http://gardening.savvy-cafe.com/a-few-interesting-facts-about-the-vanilla-orchids-2008-03-13>)

A vanilina, quimicamente conhecida como 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído (**4**), é um composto cristalino de cor branca, solúvel em etanol, ésteres, água (20°C), entre outros. Um flavorizante muito utilizado em indústrias alimentícias (bolos, sorvetes e bebidas), indústrias cosméticas (hidratantes, sabonetes e perfumes) e indústrias farmacêuticas (CLARK, 1990).



4

A vanilina possui múltiplos efeitos terapêuticos, como antimicrobiano (CERRUTI *et al.*, 1997), antioxidante (TAI *et al.*, 2011) e anticarcinogênico (CHENG *et al.*, 2007; HO *et al.*, 2009).

Alguns estudos observaram a atividade antimicrobiana da vanilina em frutas processadas, como banana, maçã e morango, sobre o crescimento de bactérias como *S. cerevisiae*, microorganismos aeróbios mesófilos, bolores e leveduras (CERRUTI & ALZAMORA, 1996; CERRUTI *et al.*, 1997; CASTAÑÓN *et al.*, 1999).

O efeito anticarcinogênico da vanilina foi observado em células de hepatocarcinoma, células carcinógenas do cólon retal e células de câncer de mama. Entre alguns mecanismos propostos estão a inibição da migração células tumorais, indução da apoptose, inibição do crescimento celular (CHENG *et al.*, 2007; HO *et al.*, 2009; LIRDPRAPAMONGKOL *et al.*, 2005), a supressão da atividade enzimática da metaloproteinase-9 e inibição da enzima DNA-PK (LIANG *et al.*, 2008; DURANT & KARRAN, 2003).

1.3.4. Sinergismo

Sinergismo é a combinação de dois ou mais compostos, onde o efeito dessa associação se torna benéfico, com o objetivo de ter um valor superior ao valor da soma dos agentes isolados (adição ou potencialização). Independente da atividade ou mecanismo de ação, diversos trabalhos tem sido publicados, mostrando essas associações.

Inúmeras associações de compostos naturais com agentes antitumorais clássicos têm provado ser um eficiente alvo terapêutico. Essa combinação busca principalmente reduzir os efeitos citotóxicos, ocasionados por estes fármacos. Este efeito foi observado, em alguns trabalhos, combinando o TAM com alguns compostos, como o α -tocoferol e acetato de α -tocoferol (SILVA *et al.*, 1999), o chá-verde (EL-BESHBISHY, 2005) e a taurina (TABASSUM *et al.*, 2006). Em um modelo utilizando hemácias, foi possível observar que o α -tocoferol e acetato de α -tocoferol foram capazes de reduzir a hemólise induzida pelo TAM (SILVA *et al.*, 1999); já o chá-verde e a taurina foram eficientes quimioprotetores, uma vez que demonstraram reduzir a hepatotoxicidade induzida pelo TAM (EL-BESHBISHY, 2005; TABASSUM *et al.*, 2006).

A apocinina e a curcumina, são compostos naturais que têm apresentado uma eficiente atividade quimiopreventiva. Esta atividade foi observada

combinando a apocinina com a isoniazida e a rifampicina, no qual a apocinina foi capaz de reduzir o dano hepático ocasionado por estes fármacos (JEYAKUMAR *et al.*, 2007). Em outro estudo, a associação da apocinina à cisplatina reduziu a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina (CHIRINO *et al.*, 2008). Já a atividade quimioprotetora da curcumina foi evidenciada sobre a hepatotoxicidade induzida pelo metotrexato, onde a curcumina foi capaz de reduzir a hepatotoxicidade ocasionado pelo metotrexato (HEMEIDA & MOHAFEZ, 2008).

Muitas associações têm a capacidade de potencializar a atividade antitumoral de diversos fármacos. A curcumina tem demonstrado uma eficiente atividade sinérgica antitumoral quando associada à outros fármacos anticarcinogênicos. Segundo Kunnumakkara *et al.* (2007), os efeitos antitumorais da gemcitabina foram potencializados pela curcumina em células do câncer de pâncreas. A associação da curcumina à epigallocatequina galato acarretou em um efeito sinérgico, diminuindo a proliferação do câncer oral (KHAFIF *et al.*, 1998). Outro estudo observou que a combinação da curcumina com o TAM aumentou a liberação da fosfatidilserina, a despolarização das mitocôndrias e a geração de espécies reativas de oxigênio, em pacientes com melanoma quimio-resistente, sensibilizados pelo TAM, melhorando sua atividade anticarcinogênica (CHATTERJEE & PANDEY, 2011).

Nos últimos anos, produtos naturais vêm se tornando objeto de vários estudos clínicos, que relatam sobre suas atividades preventiva e terapêutica em diversas doenças crônicas, como o câncer. Sabemos que a grande maioria dos agentes quimioterápicos não somente induzem a morte celular das células tumorais, mas também severos danos às células normais do homem, causando sérios efeitos colaterais como também grandes dificuldades na adesão ao tratamento. Logo, a proposta deste trabalho é analisar a associação dos metóxi-catecóis apocinina, curcumina e vanilina ao TAM a fim de promover redução nos efeitos toxicológicos induzidos pelo TAM e maximizar a efetividade terapêutica sobre as células tumorais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito dos metóxi-catecóis apocinina, curcumina e vanilina, sobre a citotoxicidade em células normais, hemácias e leucócitos polimorfonucleares, e sobre a atividade antitumoral em células de leucemia mielóide crônica humana (K562) exercida pelo TAM.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar o efeito dos metóxi-catecóis apocinina, curcumina e vanilina sobre a citotoxicidade induzida pelo TAM em hemácias, através da liberação de hemoglobina e K^+ ; em LPMN, através do teste de exclusão do azul de tripan; e em linhagens de células de leucemia mielóide crônica (K562), através do (3 - [4, 5-dimetiltiazol-2-il] -2, 5-difenil-tetrazólio, brometo de MTT) e

2.2.2. Avaliar a atividade antioxidante do TAM e dos metóxi-catecóis sobre o radical 2, 2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).

3. ARTIGO

Effect of the methoxy-catechols apocynin, curcumin and vanillin on the toxicity activity of tamoxifen

¹Lígia Santos Pedroso, ²Giovani Marino Fávero, ¹Luciana Erzinger Alves de Camargo, ¹Rubiana Mara Mainardes, *¹Najeh Maissar Khalil.

¹Departamento de Farmácia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná, 85040-080, Brasil.

²Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, 84030-900, Brasil.

* Address: Departamento de Farmácia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Rua Simeão Camargo Varelá de Sá, 03 - Guarapuava, Paraná, 85040-080, Brasil; Tel.: +55-4236298160; Fax: +55-4236298102.

E-mail address: najeh@unicentro.br

Abstract

The effect of treatment with the methoxy-catechols apocynin, curcumin and vanillin on tamoxifen (TAM)-induced cytotoxicity in normal and tumor cells was studied. Measurement of antioxidant activity by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay revealed apocynin to have the highest activity, followed by curcumin and vanillin. No relationship was found between the antioxidant activities of the methoxy-catechols and the ability of these compounds to influence TAM-associated cytotoxicity. By assessing the release of hemoglobin and K^+ , the curcumin to be the only compound that decreased the cytotoxicity of TAM in red blood cells; however, in polymorphonuclear leukocytes, it was observed that apocynin, curcumin and vanillin all significantly increased the viability of cells exposed to TAM. Cytotoxic activity was assessed in the human chronic myeloid leukemia (K562) cell line by (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) at 24, 48 and 72 h post-treatment. Among the methoxy-catechols (in association with TAM), vanillin presented the highest cytotoxic activity,

followed by apocynin and curcumin. These results point to the potential therapeutic value of the tested methoxy-catechols in combination with TAM, particularly that of curcumin, which potentiates the cytotoxic effects of TAM on tumor cells (K562) and also decreases TAM-associated cytotoxicity in red blood cells.

1. Introduction

Cancer is considered a public health problem in developed and developing countries alike (Guerra, Gallo, Azevedo & Mendonça, 2005). According to the latest report from the International Agency for Research on Cancer/WHO, the incidence was estimated at 12.7 million new cases annually, with cancer causing the deaths of 7.6 million people worldwide per year (INCA, 2011).

Tamoxifen (TAM) is a synthetic nonsteroidal anti-estrogen, it is commonly prescribed to treat patients with breast cancer (Petinari, Kohn, Carvalho & Genari, 2004). TAM belongs to the family of selective modulators of estrogen receptors. These are molecules that bind with high selectivity and affinity to estrogen receptors, resulting in molecular and biological activity (Singh & Khar, 2006). Additionally, TAM has been proposed to function via an interaction with lipids and proteins (Silva, Madeira, Almeida & Custodio, 1999), inhibition of protein kinase C and cAMP phosphodiesterase or induction of apoptosis; however, the exact mechanisms of TAM action have not been fully elucidated (Engelke, Bojarski, Blob & Diehl, 1999).

Most chemotherapeutic agents not only induce cell death in tumor cells but also induce severe damage to normal cells, causing serious side effects as well as major difficulties in treatment adherence. Documented adverse effects of chronic TAM use include hyperplasia, formation of endometrial polyps (Senkus-Konefka,

Konefka & Jassem, 2004), adenocarcinoma, ovarian cyst formation, thromboembolism, liver cancer (Mocanu & Harrison, 2004) and retinopathy (Huang *et al.*, 2009).

Studies have shown that some natural compounds possess chemopreventive activity and, when combined with TAM, minimize its cytotoxic effects on normal cells without decreasing its antitumor activity. Among such compounds are α -tocopherol and α -tocopherol acetate (Silva, Madeira, Almeida & Custodio, 1999), green tea (El-Beshbishy, 2005) and taurine (Tabassum, Rehman, Banerjee, Raisuddin & Parvez, 2006). Indeed, many natural products have been studied as potential chemopreventive agents in combination with antitumor compounds. Apart from exerting protective effects on normal cells, such compounds may also enhance the anti-proliferative activity of antitumor drugs.

Curcumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-Dione] (Figure 1-C) is among the most promising and effective chemopreventive agents (Singh & Khar, 2006). Curcumin is a pigment that is a component of turmeric (*Curcuma longa*). The multiple therapeutic effects of curcumin are due to its ability to modulate the activities of various enzymes as well as gene expression in tumor cells, thereby affecting cell proliferation and apoptosis (Zhang, Li, Zhang, Hazarika, Aggarwal & Duvic, 2010).

Apocynin (1-[4-hydroxy-3-methoxyacetophenone) (Figure 1-A) is a compound extracted from the roots of *Picrorhiza kurroa*, a plant native to the mountains of India, Nepal, Tibet and Pakistan. Apocynin has the ability to inhibit the enzyme complex NADPH oxidase (Stefanska & Pawliczak, 2008).

Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) (Figure 1-B) is widely used due to its pleasant aroma and flavor. It can be found in the berries and seeds of

Vanilla planifolia (Pacheco & Damasio, 2010). Some of the mechanisms proposed for the antitumoral activity of vanillin involve its ability to suppress the enzymatic activity of matrix metalloproteinase-9 and inhibit DNA-PK (Liang, Wu, Lo, Hsiang & Ho, 2009; Durant & Karran, 2003).

Based on these data, this work aims to evaluate the effects of the combined treatment of the methoxy-catechols curcumin, apocynin or vanillin with TAM on normal red blood cells and polymorphonuclear leukocytes, as well as cytotoxic activity through use of the human chronic myeloid leukemia K562 cell line.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Apocynin, curcumin, vanillin, (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) and 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All of the reagents used for solutions were of analytical grade.

2.2. Antioxidant Activity

2.2.1 ABTS^{•+} Decolorization Assay

An aqueous mixture of ABTS (7 mM) was added to a solution of potassium persulfate (2.45 mM) and incubated at room temperature in the dark for 12 h to obtain ABTS^{•+}. Subsequently, the ABTS^{•+} solution was diluted to an absorbance of 0.80 at 734 nm in 50 mM PBS (pH 7.4). Following solution preparation, curves were constructed using different concentrations of methoxy-catechols (3.9-500 µg/mL) +/- TAM (31.2-500 µg/mL) in the presence of radical ABTS^{•+} for 30 min at room temperature. After, the absorbance was measured at 734 nm in a microplate reader (Molecular Devices

Spectra Max 190) (Cataneo, Caliari, Gonzaga, Kuskoski & Fett, 2008). The radical scavenging activity was calculated as % inhibition. The mean of two IC_{50} (concentration causing 50% inhibition) values of each compound were determined graphically. Resveratrol was used as standard antioxidant control.

2.3. Cytotoxicity Activity

2.3.1. Preparation of Red Blood Cells

Heparinized venous blood was collected from healthy volunteers. Whole blood was centrifuged at $1200 \times g$ at $4^{\circ}C$ for 5 min to separate plasma from red blood cells. The red blood cells were washed three times in cold phosphate buffered saline (PBS) (0.15 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate, pH 7.4), and the buffy coat was removed with each wash. The red blood cells were resuspended in 50 mM PBS (pH 7.4) to obtain a hematocrit of 1% (Silva, Madeira, Almeida & Custodio, 1999). All experiments involving human blood were approved by the Ethics Committee of the University (protocol 128/2010).

2.3.2. Hemolysis Measurements

In the presence or absence of TAM (28 $\mu g/mL$), each methoxy-catechol (concentration range: 0.06–1.66 $\mu g/mL$) was incubated with a 1% red blood cell suspension for 90 min at $37^{\circ}C$ with constant shaking. After incubation, the red blood cell suspension was centrifuged at $1200 \times g$ at $4^{\circ}C$ for 5 min. Hemolysis was determined by measuring the absorbance at 540 nm in a microplate reader (Molecular Devices Spectra Max 190) (Silva, Madeira, Almeida & Custodio, 1999). The results were calculated and expressed as % inhibition.

2.3.3. K⁺ Release

Red blood cells were incubated with different concentrations of methoxy-catechols (0.06-1.66 µg/mL) in the presence or absence of TAM (28 µg/mL) for 90 min at 37°C with constant shaking. After the incubation, the red blood cells were centrifuged at 1200 x g at 4°C for 5 min, and K⁺ release was measured with an ion-selective electrode (Roche/AVL 9180) (Silva, Madeira, Almeida & Custodio, 1999). The results were calculated and expressed as % inhibition.

2.3.4. Cytotoxicity in Polymorphonuclear Leukocytes (LPMN)

Heparinized whole blood was collected, mixed with a solution of 1.5% dextran in a 2:1 ratio and then incubated at 37°C for 1 h. Following incubation, the mixture was centrifuged for 5 min at 750 x g at 4°C to isolate LPMN. The supernatant was discarded, and the cell pellet was washed three times with 50 mM PBS (pH 7.4) in the absence of Ca²⁺. The cells were resuspended in PBS buffer (Dulbecco) and counted in a Newbauer chamber (Ciz & Lojek, 1997).

The cytotoxicity of TAM in LPMNs was measured using the trypan blue dye exclusion test, in which viable cells do not incorporate the dye and appear brighter than dead cells upon observation with an optical microscope. The LPMNs (1x10⁶ cells/mL in PBS-Dulbecco) were incubated at 37°C for 30, 60 and 90 min with each methoxy-catechol (50 µg/mL) in the presence and absence of TAM (14 µg/mL). After incubation, the suspension was mixed with a solution of 0.5% trypan blue in a 1:1 ratio for 5 min. The cells were observed in a Newbauer chamber via microscopy. The total number of stained and unstained cells was calculated, and the results were expressed as the percentage of unviable cells (Phillips, 1973). As a control, an equal number of cells was

suspended in PBS-Dulbecco and similarly analyzed.

2.3.5. Cell Culture

The Human Chronic Myeloid Leukemia (K562) cell line was obtained from American Type Cell Culture (Rockville, MD, USA). Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, 100 U/mL of penicillin and 100 mg/mL of amikacin at 37°C in a humidified atmosphere containing CO₂ (5%).

2.3.6. Cell Viability

Briefly, human chronic myeloid leukemia (K562) cells were plated at a density of 4×10^4 in 96-well tissue culture plates (Corning, NY). Cells were treated with the methoxy-catechols (3.1, 6.2 and 12.5 µg/mL) in the presence or absence of TAM (1.5, 3.2 and 6.4 µg/mL) for different time intervals (24, 48 and 72 h). Cell proliferation and viability were determined by the MTT method. For this assay, following treatment, 0.5 mg/mL MTT in fresh medium was added to the cultures. After 4 h of incubation, the formazan crystals were dissolved in 100 µL of a 10% sodium dodecyl sulfate/10 mM HCl solution, and the absorbance was measured at 570 nm in a microplate reader (BioTek Instruments). Experiments were done in triplicate. For the curcumin groups, a cell-free blank was performed to subtract for background absorbance.

2.4. Formula of % Inhibition

Values for % inhibition were calculated as follows:

% inhibition = $(A_c - A_t) / A_c \times 100$, where A_c is the control absorbance and A_t is the test absorbance.

2.5. Statistical Analysis

Results are presented as the mean \pm SD (n=3). Statistical comparisons were made by the ANOVA method using a 95% confidence interval, and differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

a. Determination of Total Antioxidant Activity

The ability of different concentrations of TAM (31.2-500 $\mu\text{g/mL}$) and apocynin, curcumin and vanillin (3.9-500- $\mu\text{g/mL}$) to scavenge the radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ was analyzed. The dose-response curves revealed that TAM alone did not show significant antioxidant activity (data not shown). After determination of the IC_{50} for the methoxy-catechols (Table 1), we found that apocynin showed the most efficient inhibitory activity, followed by curcumin and vanillin. No significant differences in antioxidant activity were observed for the methoxy-catechols alone or in combination with TAM.

3.2. Cytotoxic Activity *in vitro* in Red Blood Cells

The hemolysis assay was used to determine the effects of each methoxy-catechol on the cytotoxicity of TAM in red blood cells. The ability of the methoxy-catechols to inhibit hemolysis was calculated in reference to the positive control (TAM alone). The absorbance for TAM treatment alone was 1.31 ± 0.05 , which was higher than that for the negative control (absorbance of 0.008 ± 0.0007 , 1% red blood cells only). It observed curcumin to be the only methoxy-catechol that presented a protective effect against the cytotoxicity of TAM in red blood cells (Fig. 2). This inhibitory effect of curcumin on TAM-induced hemolysis was concentration-dependent. Apocynin and

vanillin, at all tested concentrations showed no significant inhibitory activity ($p > 0.05$). The concentration of K^+ release was calculated as $4.13 \text{ mM} \pm 0.22$ for the positive control (TAM alone). In comparison, the negative control (1% red blood cells only) exhibited a concentration of K^+ release of $0.008 \text{ mM} \pm 0.0007$ (Fig. 3). Consistent with the hemolysis assay, it observed that only curcumin presented a concentration-dependent, cell-protective effect. At all concentrations tested, apocynin and vanillin did not affect K^+ release.

3.3. Cytotoxicity on Polymorphonuclear Leukocytes (LPMN)

LPMN viability was measured following incubation with apocynin, curcumin or vanillin ($50 \text{ } \mu\text{g/mL}$) in the presence or absence of TAM ($14 \text{ } \mu\text{g/mL}$) during different time intervals (Fig. 4). LPMN death was observed to increase with the time of exposure to TAM. The percentage of unviable cells after 30 min was 19 ± 5.66 , 46.5 ± 3.53 after 60 min, and 100 ± 0.0 after 90 min). After 30 min, it was observed that apocynin, curcumin and vanillin were able to reduce TAM-mediated cytotoxicity in LPMNs, with the percentage of unviable cells being 12.5 ± 2.12 , 15.5 ± 2.12 and 14.0 ± 2.83 , respectively, but did not significantly. It was observed for apocynin, curcumin and vanillin treatment at 60 min with the percentage of unviable cells being 20.5 ± 2.12 , 19.0 ± 2.83 and 22.5 ± 2.12 , respectively ($p < 0.05$). After 90 min, the methoxy-catechols exhibited a cytotoxic effect on LPMNs similar to that observed for TAM at the 30 min time point; however, apocynin and curcumin still showed a protective effect against TAM-induced cytotoxicity at this time point, with the percentage of unviable cells calculated as 59.5 ± 10.6 for apocynin and 55.5 ± 2.12 for curcumin ($p < 0.05$). Vanillin did not have a pronounced effect on TAM-induced cytotoxicity in LPMNs after 90 min of treatment (% unviable cells = 77.0 ± 12.72).

3.4. Cytotoxicity in K562 cells

It was investigated the effect of treatment with TAM and each methoxy-catechol on K562 cell viability at different time intervals (24, 48 and 72 h). The results are expressed in Table 1. After 24 h, the TAM/methoxy-catechol did not significantly effect K562 cell viability. However, it was observed significant effects on cell death, when TAM/methoxy-catechol combination. With regards to curcumin, increased death was only observed at the highest tested concentrations for both TAM and the methoxy-catechol (12.5 $\mu\text{g/mL}$ curcumin + 6.2 $\mu\text{g/mL}$ TAM). For apocynin, synergistic effects on cell viability were observed at the two highest concentrations tested (6.2 $\mu\text{g/mL}$ apocynin + 3.1 $\mu\text{g/mL}$ TAM and 12.5 $\mu\text{g/mL}$ apocynin + 6.2 $\mu\text{g/mL}$ TAM). Significant effects were seen at the lowest tested concentrations for vanillin (3.1 $\mu\text{g/mL}$ vanillin + 1.5 $\mu\text{g/mL}$ TAM), however at the highest tested concentrations (6.2 $\mu\text{g/mL}$ vanillin + 3.1 $\mu\text{g/mL}$ TAM, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ vanillin + 6.2 $\mu\text{g/mL}$ TAM) it was observed significant synergistic effects on cell death. Thus, after 48 h of treatment, the methoxy-catechols showed a significant decrease in K562 cell viability at the two highest concentrations tested (12.5 and 6.2 $\mu\text{g/mL}$ methoxy-catechol). TAM treatment alone had a similar effect on K562 cells regardless of concentration. With regards to TAM concentration, significant effects were observed at the lowest concentrations (1.5 $\mu\text{g/mL}$ TAM + 3.1 $\mu\text{g/mL}$ methoxy-catechol), while at the two highest concentrations (3.1 $\mu\text{g/mL}$ TAM + 6.2 $\mu\text{g/mL}$ methoxy-catechol and 6.2 $\mu\text{g/mL}$ TAM + 12.5 $\mu\text{g/mL}$ methoxy-catechol) it was observed significant synergistic effect on cell death. Lastely, after 72 h of treatment, the methoxy-catechols alone showed a similar effect on cell death than 48 h. With regards to TAM concentration, the three methoxy-catechols at the all concentrations tested had significant synergistic effect(1.5 $\mu\text{g/mL}$ TAM + 3.1 $\mu\text{g/mL}$ methoxy-catechol,

3.1 $\mu\text{g/mL}$ TAM + 6.2 $\mu\text{g/mL}$ methoxy-catechol and 6.2 $\mu\text{g/mL}$ TAM + 12.5 $\mu\text{g/mL}$ methoxy-catechol. In the absence of TAM, vanillin had the greatest effect on cell death, followed by curcumin and apocynin. In the presence of TAM, vanillin again exhibited the greatest effect on cell death, followed by apocynin and curcumin. These data show that combined treatment with methoxy-catechols and TAM has a synergistic effect on K562 cell death in comparison to treatment with TAM or methoxy-catechol alone.

4. Discussion

Natural products are excellent candidates for new antitumor drugs, as they are widely-available. Methoxy-catechols constitute one of the largest groups of phytochemicals that exhibit anti-cancer biological properties. Studies have related the high consumption of natural products that are rich in phenolic groups with lower rates of cancer incidence; however, studies have also shown that high concentrations of natural products are required to achieve effective antitumor activity. For this reason, natural products may be more useful in combination with other chemotherapeutic drugs, with the aim being to obtain synergistic antitumor effects. This would be greatly valuable in cancer therapy, as lower doses of chemotherapy could be used, and the harmful side-effects caused by treatment could be reduced.

Curcumin, a diferuloylmethane derived from the plant *Curcuma longa*, has several antitumor effects. In particular, it has been demonstrated to be an anti-proliferative agent and induces tumor cell apoptosis. Curcumin is known to function by directly interfering with cell survival signaling pathways such as the nuclear factor-kappa-B (NF- κ B) pathway (Bava *et al.*, 2011). The cytotoxic activity of curcumin has been shown in multiple tumor cell lines. Curcumin has been widely studied in recent years in combination with other chemotherapeutic agents. The cytotoxic effects of

gemcitabine are potentiated by curcumin in pancreatic cancer through the suppression of NF- κ B-regulated gene products or through effects on other cell signaling pathways (Kunnumakkara, Guha, Krishnan, Diagaradjane, Gelovani & Aggarwal, 2007). Curcumin and epigallocatechin gallate have been shown to act synergistically, decreasing proliferation in oral cancer (Khafif, Schantz, Chou, Edelstein & Sacks, 1998). Recent studies have shown that other methoxy-catechols have effects on tumor cells. For example, 4-methylcatechol (a metabolite of quercetin) has been shown to induce the intrinsic apoptotic pathway in metastatic melanoma cells (Payton, Bose, Alworth, Kumar & Ghosh, 2011). Serving as an example of the beneficial effects of curcumin in the medical clinic, the combination of curcumin and TAM has been shown to increase phosphatidylserine flipping, mitochondria depolarization and the generation of reactive oxygen species in chemo-resistant melanoma (Chatterjee & Pandey, 2011). Part of the cytotoxic activity of vanillin on tumor cells is also due to its inhibition of NF- κ B activation, which results in enhanced TRAIL-induced apoptotic cell death (Lirdprapamongkol *et al.*, 2010) as well as cytolytic and cytostatic effects (Ho *et al.*, 2009). Through the use of models phagocytic and non-phagocytic cell models, the effects of apocynin have been attributed to its ability to efficiently inhibit the NADPH-oxidase complex, resulting in the production of reactive oxygen species (Stefanska & Pawliczak, 2008).

TAM has several detrimental effects on red blood cells, causing hemolytic anemia *in vivo* and hemolysis *in vitro* (Silva, Madeira, Almeida & Custodio, 1999). These effects are mainly due to the ability of TAM to induce a structural disruption of biomembranes. Using red blood cells as a model, we demonstrated that curcumin presented dose-dependent decreases in TAM-associated hemolysis. This effect was not observed with the other methoxy-catechols tested, vanillin and apocynin. These results

are in agreement with those we obtained through the measurement of potassium ion release. The protective effect of curcumin does not appear to be due to its antioxidant properties, since apocynin, despite having the highest antioxidant activity, did not show an effect on hemolysis. In LPMN, treatment with TAM resulted in time-dependent increases in toxicity; however, the three methoxy-catechols were able to protect against LPMN cell death, particularly after 60 min of treatment.

These studies demonstrated the synergistic effect of the combination of TAM with the methoxy-catechols on K562 tumor cell death. This effect was concentration- and time-dependent. After 72 h of treatment, a synergistic effect was observed even at the lowest tested concentrations of TAM and the methoxy-catechols. Interesting to note the effect of apocynin, a compound that has not been well-studied effects on tumor cells. Apocynin had the least effect of the three on K562 cell death but, when combined with TAM, showed greater increases in cell death than curcumin/TAM.

The use of compounds with antioxidant properties as chemoprotective agents has become a subject of interest; however, some authors relate that a drug's antioxidant properties can decrease its antitumor activity in therapy (Pagano *et al.*, 2001). Here, it was measured the antioxidant activities of the methoxy-catechols in an effort to determine if a relationship exists between the antioxidant activity and the cytotoxic or cyto-protective activities of the drug. It was observed an inverse relationship between the antioxidant activity and the cytotoxic activity of the methoxy-catechols. Vanillin presented the lowest antioxidant efficiency, followed by curcumin and apocynin, but presented the highest cytotoxic activity (followed by curcumin and apocynin). In association with TAM, vanillin presented the higher cytotoxic activity on tumor cells (K562), followed by apocynin and curcumin. Although the methoxy-catechols showed antioxidant properties, they also exhibited cytotoxic activity. In addition, their

combination with TAM produced not an additive effect, but a synergistic effect.

Reactive oxygen intermediates have been demonstrated to play an etiological role in anti-cancer drug-induced toxicity. As oxygen radical overproduction occurs during TAM's metabolic activation, studies have suggested that oxidative stress might contribute to the pathogenesis of TAM-induced toxicity (Dragan *et al.*, 1996, Pagano *et al.*, 2001). In the present study, TAM presented a concentration-dependent toxic effect in red blood cells and LPMNs. All of the tested methoxy-catechols were able to decrease the TAM-induced LPMN death after 60 min of incubation; however, vanillin was not able to maintain this protective effect after 90 min. This may be explained by differences in the antioxidant efficacy among the compounds, as vanillin exhibited the lowest efficacy among the three tested. In red blood cells, we were unable to associate antioxidant efficacy with the observed protective effects. In this system, only curcumin was able to protect the cells from the deleterious effects of TAM. Furthermore, apocynin, which exhibited the highest antioxidant efficiency, also was unable to protect against cell death.

These results point to the potential therapeutic value of TAM in association with the tested methoxy-catechols, particularly curcumin, which potentiates the cytotoxic effects of TAM on tumor cells (K562) while also decreasing TAM-associated cytotoxicity in normal, healthy red blood cells and LPMNs. Further studies will be necessary to clarify the mechanisms by which the methoxy-catechols and TAM act synergistically in these processes.

Acknowledgments:

This work was supported in part by Capes, CNPq (processes 577183/2008-7) and Fundação Araucária (Chamada de Projetos 08/2009-Programa de Pesquisa para o SUS:

Gestão Compartilhada em Saúde).

References

Bava, S.V., Sreekanth, C.N., Thulasidasan, A.K.T., Anto, N.P., Cheriyan, V.T., Puliappadamba, V.T., Menon, S.G., Ravichandran, S.D., & Anto, R.J. (2011). Akt is upstream and MAPKs are downstream of NF- κ B in paclitaxel-induced survival signaling events, which are down-regulated by curcumin contributing to their synergism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 43, 331–341.

Cataneo, C.B., Caliari, V., Gonzaga, L.V., Kuskoski, E.M., & Fett, R. (2008). Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. *Ciências de Alimentos*. 29, 93-102.

Chatterjee, S.J., & Pandey, S. (2011). Chemo-resistant melanoma sensitized by tamoxifen to low dose curcumin treatment through induction of apoptosis and autophagy. *Cancer Biology & Therapy*. 11, 216-228.

Ciz, M., & Lojek, A. (1997). Improved dextran preparation of human leucocytes for chemiluminescence analysis of the oxidative burst of polymorphonuclear cells. *Clinical & Laboratory Haematology*. 19, 49-51.

Dragan, Y., Fahey, S., Nuwaysir, E., Sattler, C., Babcock, K., Vaughan, J., McCague, R., Pitot, & H. (1996). The effect of tamoxifen and two of its non-isomerizable fixed-ring analogues on multistage rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*. 17, 585–594.

Durant, S., & Karran, P. (2003). Vanillins – a novel family of DNA-PK inhibitors. *Nucleic Acids Research*. 31, 5501-5512.

Engelke, M., Bojarski, P., Blob, R., & Diehl, R. (1999). Tamoxifen perturbs lipid bilayer order and permeability: comparison of DSC, fluorescence anisotropy, laurdan generalized polarization and carboxyfluorescein leakage studies. *Biophysical Chemistry*.

90, 157-173.

El-Beshbishy, H. (2005). Hepatoprotective effect of green tea (*Camelia sinensis*) extract against tamoxifen-induced liver injury in rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 38, 563-570.

Guerra, M.R., Gallo, C.V.M., Azevedo, G., & Mendonça, S. (2005). Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 51, 227-234.

Ho, K., Yazan, L.S., Ismail, N., & Ismail, M. (2009). Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. *Cancer Epidemiology*. 33, 155-60.

Huang, C., Cheng, H., Lin, K., Cheng, J., Tsai, J., Liao, W., Fang, Y., & Jan, C. (2009). Tamoxifen-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise and apoptosis in corneal epithelial cells. *Toxicology*. 255, 58-64.

Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. Estimativa/2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2009. [homepage na internet]. [citado em 08 jun 2011]. Disponível em <http://www.inca.gov.br/>

Khafif, A., Schantz, S.P., Chou, T.C., Edelstein, D., & Sacks, P.G. (1998). Quantitation of chemopreventive synergism between (2)-epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells. *Carcinogenesis*. 19, 419-424.

Kunnumakkara, A.B., Guha, S., Krishnan, S., Diagaradjane, P., Gelovani, J., & Aggarwal, B.B. (2007). Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products. *Cancer Research*. 67, 3853-3861.

Liang, J., Wu, S., Lo, H., Hsiang, C., & Ho, T. (2009). Vanillin inhibits matrix

metalloproteinase-9 expression through down regulation of nuclear factor-kB signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Pharmacology*. 75, 151-157.

Lirdprapamongkol, K., Sakurai, H., Suzuki, S., Koizumi, K., Prangsaengtong, O., Viriyaroj, A., Ruchirawat, S., Svasti, J., & Saiki, I. (2010). Vanillin enhances TRAIL-induced apoptosis in cancer cells through inhibition of NF-kappaB activation. *In Vivo*. 24, 501-506.

Mocanu, E. V., & Harrison, R. F. (2004). Tamoxifen in gynaecology. *Gynaecological Practice*. 4, 37-45.

Pacheco, S.M.V., & Damasio, F. (2010). Vanilina: origem, propriedades e produção. *Química Nova Escola*. 32, 215-219.

Pagano, G., Biase, A., Deeva, I.B., Degan, P., Doronin, Y.K., Iaccarino, M., Oral, R., Trieff, N.M., Warnau, M., & Korkina, L.G. (2001). The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. *Life Sciences*. 68, 1735-1749.

Payton, F., Bose, R., Alworth, W.L., Kumar, A.P., & Ghosh, R. (2011). 4-Methylcatechol-induced oxidative stress induce intrinsic apoptotic pathway in metastatic melanoma cells. *Biochemical Pharmacology*. 81, 1211-1218.

Petinari, L., Kohn, L.K., Carvalho, J.E., & Genari, S.C. (2004). Cytotoxicity of tamoxifen in normal and tumoral cell lines and its ability to induce cellular transformation in vitro. *Cell Biology International*. 28, 531-539.

Phillips, H.J. (1973). Dye exclusion test for viability. In P. F. Kruse Jr., & M. H. Patterson Jr. (Eds.), *Tissue culture: methods and application*. (pp. 406-408). New York: Academic Press.

Senkus-Konefka, E., Konefka, T., & Jassem, J. (2004). The effects of tamoxifen on the female genital tract. *Cancer Treatment Reviews*. 30, 291-301.

Singh, S., & Khar, A. (2006). Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*. 6, 259-270.

Silva, M.M.C., Madeira, V.M.C., Almeida, L.M., & Custodio, J.B.A. (1999). Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1464, 41-61.

Stefanska, J., & Pawliczak, R. (2008). Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflammation*. 2008, 1-107.

Tabassum, H., Rehman, H., Banerjee, B.D., Raisuddin, S., & Parvez, S. (2006). Attenuation of tamoxifen-induced hepatotoxicity by taurine in mice. *Clinica Chimica Acta*. 370, 129-136.

Zhang, C., Li, B., Zhang, X., Hazarika, P., Aggarwal, B.B., & Duvic, M. (2010). Curcumin selectively induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines and patients' PBMCs: potential role for STAT-3 and NF-kappaB signaling. *Journal of Investigative Dermatology*. 130, 2110-2119.

Figure Captions

Figure 1. Chemical structures of apocynin (A), vanillin (B) and curcumin (C).

Figure 2. Effect of methoxy-catechols on TAM induced hemolysis. Red blood cells (1%) were incubated with the indicated concentrations of apocynin, curcumin and vanillin in the presence of TAM (28 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 37°C for 90 min. Hemolysis was determined by measuring the release of hemoglobin via spectrophotometry at a wavelength of 540 nm. (n=3)

Figure 3. Inhibition of the TAM-induced release of K^+ ions [mM] by methoxy-catechols. Red blood cells (1%) were incubated in the indicated concentrations of apocynin, curcumin or vanillin in the presence of TAM (28 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 37°C for 90 min. K^+ release was measured by an ion-selective electrode. (n=3)

Figure 4. Inhibition of the TAM-induced cytotoxicity on LPMN by methoxy-catechols. Samples of methoxy-catechols (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the absence or presence of TAM (14 $\mu\text{g}/\text{mL}$), were incubate in different times (30, 60 and 90 min). The LPMN viability was analyzed by trypan blue exclusion assay. *Significantly different from control cells treated with TAM ($p < 0.05$). (n=3)

Figure 1

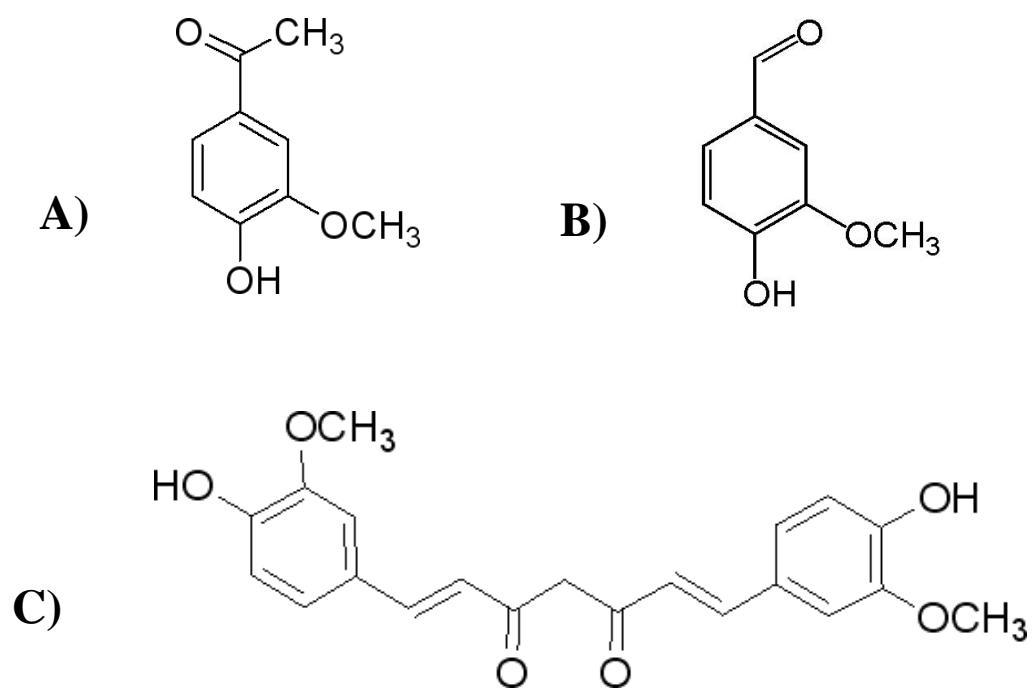


Figure 2

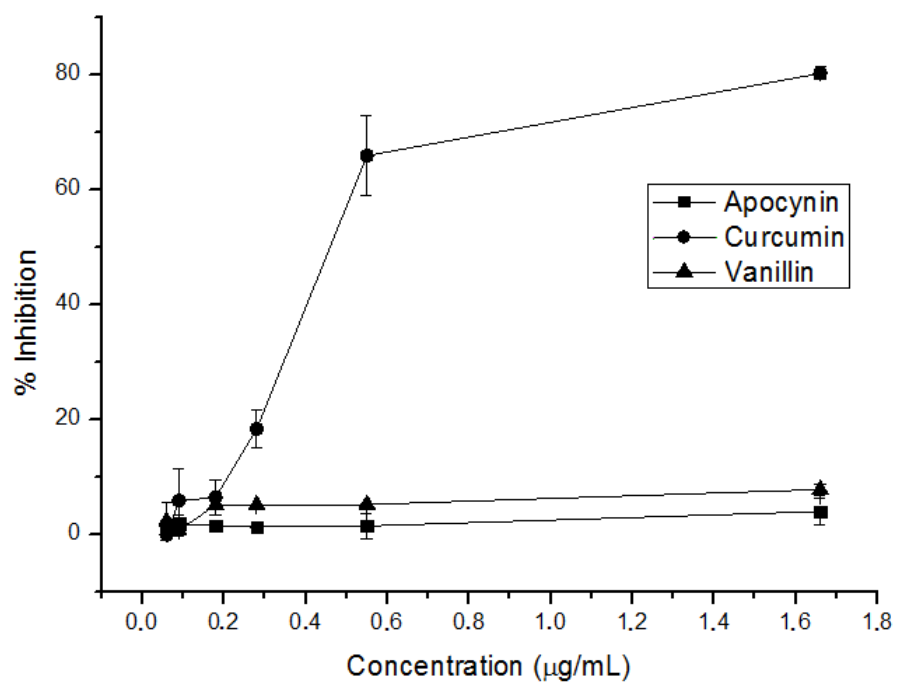


Figure 3

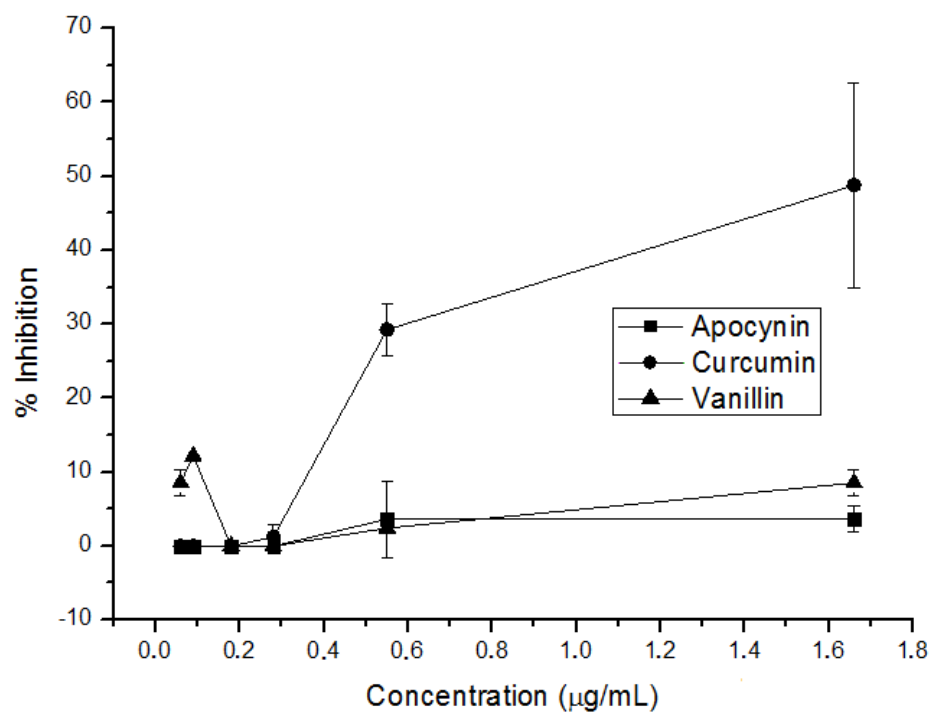


Figure 4

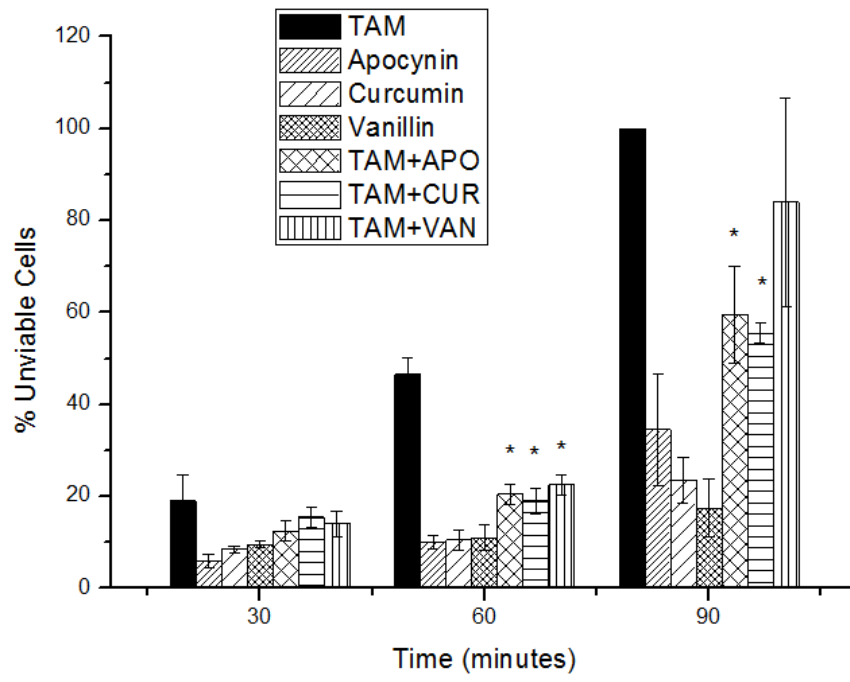


Table 1. Quantitative analysis of the IC_{50} of the $ABTS^{•+}$ obtained by exposure to different concentrations the methoxy-catechols apocynin, curcumin and vanillin.

(n=3)

Methoxy-Catechol	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Apocynin	5.86 ± 0.53
Curcumin	8.43 ± 0.61
Vanillin	15.10 ± 0.44
Control	2.44 ± 0.09

Table 2. Effects of TAM, apocynin (APO), curcumin (CUR) and vanillin (VAN) (single or in combination) on the viability of K562 cells *in vitro*. Cells ($\times 10^4$) were treated with different concentrations of the drug for different time intervals. After the time intervals, the viabilities were determined using MTT test. *Significantly different from control cells ($p < 0.05$) and ** significantly different the sum of the individual effect of the compounds ($p < 0.05$). (n=3)

SAMPLE	VIABLES CELLS ($\times 10^4$)		
	24h	48h	72h
Control	4.54±0.92	6.27±0.81	7.36±0.63
TAM 1.5 µg/mL	4.95±1.20	3.96±0.26*	4.74±0.7*
TAM 3.1 µg/mL	4.79±0.47	3.89±0.40*	4.19±0.7*
TAM 6.2 µg/mL	3.99±0.12	3.68±0.60*	5.24±0.8*
APO 3.1 µg/mL	4.95±0.63	6.08±0.85	6.99±0.23
APO 6.2 µg/mL	5.28±0.23	5.60±1.03*	6.53±0.8*
APO 12.5 µg/mL	5.05±0.96	5.21±1.01*	5.55±0.7*
TAM 1.5 µg/mL + APO 3.1 µg/mL	3.10±0.12	2.89±0.41*	2.19±0.2**
TAM 3.1 µg/mL + APO 6.2 µg/mL	2.26±0.3**	1.79±0.31**	1.56±0.31**
TAM 6.2 µg/mL + APO 12.5 µg/mL	1.75±0.4**	1.18±0.24**	0.84±0.17**
CUR 3.1 µg/mL	4.86±0.32	6.12±0.13	7.01±0.68
CUR 6.2 µg/mL	5.09±1.05	4.69±0.62*	5.86±0.70*
CUR 12.5 µg/mL	4.49±0.49	3.77±0.33*	3.36±0.34*
TAM 1.5 µg/mL + CUR 3.1 µg/mL	3.60±0.40	3.53±0.43*	2.76±0.49**
TAM 3.1 µg/mL + CUR 6.2 µg/mL	3.30±0.19	2.85±0.47**	2.12±0.14**
TAM 6.2 µg/mL + CUR 12.5 µg/mL	2.58±0.59*	1.47±0.28**	1.15±0.07**
VAN 3.1 µg/mL	4.86±0.49	5.94±0.17	6.31±0.55
VAN 6.2 µg/mL	4.39±0.39	4.43±0.59*	5.33±0.39*
VAN 12.5 µg/mL	4.13±0.21	3.45±0.55*	2.95±0.25*
TAM 1.5 µg/mL + VAN 3.1 µg/mL	2.67±0.42*	2.05±0.31*	1.99±0.20**
TAM 3.1 µg/mL + VAN 6.2 µg/mL	1.78±0.17**	1.54±0.21**	1.17±0.23**
TAM 6.2 µg/mL + VAN 12.5 µg/mL	1.27±0.18**	0.79±0.13**	0.41±0.18**

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os produtos naturais são uma excelente alternativa na busca de novas drogas antitumorais. O consumo elevado de produtos naturais, principalmente os que contêm grupos fenólicos, tem sido relacionado à redução da incidência de câncer. No entanto, vários trabalhos têm mostrado que são necessárias altas concentrações desses compostos para alcançar uma atividade efetiva. Logo, no tratamento do câncer seria interessante a associação de produtos naturais às drogas quimioterápicas clássicas, pois devido ao efeito sinérgico, doses mais baixas de quimioterápicos poderiam ser utilizadas, reduzindo vários efeitos colaterais, e contribuindo para uma melhor adesão ao tratamento.

A curcumina tem vários efeitos sobre as células tumorais, como antiproliferativo, apoptótico; e interfere diretamente nas vias de sinalização celular de sobrevivência, como o NF- κ B (BAVA *et al.*, 2011). Sua atividade citotóxica é bem estabelecida em vários tipos de linhagens de células tumorais e tem sido amplamente estudada, nos últimos anos, em combinação com outros agentes quimioterápicos. A vanilina também deve parte de sua atividade citotóxica sobre células tumorais pela inibição do NF- κ B, e consequente aumento da morte celular (LIRDPRAPAMONGKOL *et al.*, 2010); e aos efeitos citotóxicos e citostáticos (HO *et al.*, 2009). Já o foco principal dos efeitos da apocinina é como um eficiente inibidor do complexo NADPH-oxidase, e consequentemente de espécies reativas de oxigênio, em modelos que envolvem células fagocíticas e não-fagocíticas (STEFANSKA & PAWLICZAK, 2008).

O TAM possui efeitos sobre as células vermelhas do sangue, como alterações na membrana, hemólise *in vitro* e anemia hemolítica (SILVA *et al.*, 1999). Estes efeitos ocorrem devido ao TAM induzir uma descontinuidade estrutural nas biomembranas. Em células vermelhas do sangue, foi demonstrado que a curcumina apresenta um efeito significativo, dose-dependente, na inibição da hemólise mediada pelo TAM. Este efeito não foi observado pelos outros metóxi-catecóis testados, apocinina e vanilina. Estes resultados corroboram com o obtido pela determinação da liberação de K^+ . O efeito protetor evidenciado pela curcumina não parece ser devido a suas propriedades antioxidantes, já que apocinina não mostrou efeito semelhante, apesar de ter a maior atividade antioxidante, observado pela atividade sequestrante sobre o ABTS^{•+}. Em LPMN, o

TAM apresentou toxicidade tempo-dependente, sendo que os três metóxi-catecóis foram capazes de proteger essas células.

Os resultados apresentados demonstram um efeito sinérgico da associação do TAM com os metóxi-catecóis em células K562. Este efeito foi concentração e tempo-dependente. Em 72 h observou-se que mesmo na menor concentração do TAM e metóxi-catecóis associados, houve o efeito sinérgico. É interessante notar o efeito da apocinina, um composto que possui poucos estudos sobre sua atividade citotóxica sobre células tumorais, apresentou menor efeito, quando isolada, sobre as células K562, mas em combinação com o TAM mostrou resultados mais significativos que a curcumina.

O uso de compostos com propriedades antioxidantes tem sido explorado por sua aplicação quimiopreventiva. Eles têm sido estudados na prevenção e tratamento do câncer, mas alguns autores relatam que esta propriedade pode diminuir sua atividade sobre células tumorais (PAGANO *et al.*, 2001). A determinação da atividade antioxidante dos metóxi-catecóis foi avaliada para verificar se há uma relação entre essa propriedade com atividade sobre as células tumorais e o efeito quimioprotetor nas células. Os resultados da atividade citotóxica dos compostos isolados mostraram uma relação inversa, uma vez que entre os metóxi-catecóis (isolados), a vanilina apresentou a menor eficiência antioxidante (seguido pela curcumina e apocinina), mas a maior atividade citotóxica (seguido pela apocinina e curcumina). Em associação com o TAM, a vanilina apresentou a maior atividade antitumoral, seguido por apocinina e curcumina.

Os resultados indicam o potencial terapêutico do TAM em associação com os metóxi-catecóis testados, especialmente a curcumina, que potencializa o efeito citotóxico sobre as células tumorais (K562) e concomitantemente diminui a citotoxicidade exercida pelo TAM em dois modelos de células testadas. Mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos no sinergismo observado neste estudo.

5. REFERÊNCIAS

AHN, K.S.; AGGARWAL, B.B.; Transcription factor NF- κ B, a sensor for smoke and stress signals; *New York Academy of Sciences*; v. 1056; p. 218-233; 2005.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P.; Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução; *Química Nova*; v. 28; p. 118-129; 2005.

ANAND, P.; SUNDARAM, C.; JHURANI, S.; KUNNUMAKKARA, A.B.; AGGARWAL, B.B.; Curcumin and câncer: an “old-age” disease with an “age-old” solution; *Cancer Letters*; v. 267; p. 133-164; 2008.

ARAÚJO, C.A.C.; LEON, L.L.; Biological activities of *Curcuma longa L*; *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; v. 96; p. 723-728; 2001.

BABIOR, B.M.; NADPH oxidase: an update; *Blood*; v. 93; p. 1464-1476; 1999.

BABIOR, B.M.; Phagocytes and oxidative stress; *The American Journal of Medicine*; v. 109; p. 33-44; 2000.

BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K.I.; Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs; *Chemico-Biological Interactions*; v. 174; p. 134-139; 2008.

BARVE, A.; KHOR, T.O.; HAO, X.; KEUM, Y.S.; YANG, C.S.; REDDY, B.; KONG, A.N.; Murine prostate cancer inhibition by dietary phytochemicals--curcumin and phenylethylisothiocyanate; *Pharmaceutical Research*; v. 25; p. 2181-2189; 2008.

BAVA, S.V.; SREEKANTH, C.N.; THULASIDASAN, A.K.T.; ANTO, N.P.; CHERIYAN, V.T.; PULIYAPPADAMBA, V.T.; MENON, S.G.; RAVICHANDRAN, S.D.; ANTO, R.J.; Akt is upstream and MAPKs are downstream of NF- κ B in paclitaxel-induced survival signaling events, which are down-regulated by curcumin contributing to their synergism; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; v. 43; p. 331–341; 2011.

BEGUM, A.N.; JONES, M.R.; LIM, G.P.; MORIHARA, T.; KIM, P.; HEATH, D.D.; ROCK, C.L.; PRUITT, M.A.; YANG, F.; HUDSPETH, B.; HU, S.; FAULL, K.F.; TETER, B.; COLE, G.M.; FRAUTSCHY, S.A.; Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's Disease; *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; v. 326; p. 196-208; 2008.

BERTRAM, J.S.; The molecular biology of cancer; *Molecular Aspects of Medicine*; v. 21; p. 167-223; 2001.

BRAUCH, H.; JORDAN, V.C.; Targeting of tamoxifen to enhance antitumour action for the treatment and prevention of breast cancer: the 'personalized' approach?; *European Journal of Cancer*; v. 45; p. 2274-2283; 2009.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K.; Angiogenesis in cancer and other diseases; *Nature*; v. 407; p. 249-257; 2000.

CASTAÑÓN, X.; ARGAIZ, A.; MALO-LÓPEZ, A.; Effect of storage temperature on the microbial and color stability of banana purée with addition of vanillin or potassium sorbate; *Food Science and Technology International*; v. 5; p. 51-58; 1999.

CERRUTI, P.; ALZAMORA, S.M.; Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purées; *International Journal of Food Microbiology*; v. 29; p. 379-386; 1996.

CERRUTI, P.; ALZAMORA, S.M.; VIDALES, S.L.; Vanillin as an antimicrobial

for producing shelf-stable strawberry puree; *Journal of Food Science*; v. 62; p. 608-610; 1997.

CHAN, M.M.; Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical; *Biochemical Pharmacology*; v. 49; p. 1551-6; 1995.

CHATTERJEE, S.J.; PANDEY, S.; Chemo-resistant melanoma sensitized by tamoxifen to low dose curcumin treatment through induction of apoptosis and autophagy; *Cancer Biology & Therapy*; v. 11; p. 216-228; 2011.

CHENG, W.; HSIANG, C.; BAU, D.; CHEN, J.; SHEN, W.; LI, C.; LO, H.; WU, S.; CHIANG, S.; HO, T.; Microarray analysis of vanillin-regulated gene expression profile in human hepatocarcinoma cells; *Pharmacological Research*; v. 56; p. 474-482; 2007.

CHIRINO, Y.I.; SANCHÉZ- GONZÁLEZ, D.J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, C.M.; CRUZ, C.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; Protective effects of apocynin against cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity; *Toxicology*; v. 245; p. 18-23; 2008.

CHOUDHURI, T.; PAL, S.; AGGARWAL, M.L.; Das, T.; Sa, G.; Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction; *FEBS Letter*; v. 512; p. 334-340; 2002.

CHO, J.; CHOI, G.; LEE, S.; JANG, K.S.; KYONGLIM, H.; LIM, C.H.; LEE, S.O.; CHO, K.Y.; KIM, J.; Antifungal activity against *Colletotrichum* spp. curcuminoids isolated from *Curcuma longa* L. rhizomes; *Journal Microbiology Biotechnology*; v. 16; p. 280-285; 2006.

CHUANG, S.E.; KUO, M.L.; HSU, C.H.; CHEN, C.R.; LIN, J.K.; LAI, G.M.; HSIEH, C.Y.; CHENG, A.L.; Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis; *Carcinogenesis*; v. 21; p. 331-335; 1992.

CLARK, G.S.; Vanillin; *Perfumer & Flavorist*; v. 15; p. 45-54; 1990.

DOLAN, K.; MONTGOMERY, S.; BUCHHEIT, B.; DIDONE, L.; WELLINGTON, M.; KRYSAN, D.J.; Antifungal activity of tamoxifen: in vitro and in vivo activities and mechanistic characterization; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; v. 53; p. 3337-3346; 2009.

DURANT, S.; KARRAN, P.; Vanillins – a novel family of DNA-PK inhibitors; *Nucleic Acids Research*; v. 31; p. 5501-5512; 2003.

EL-BESHBISHY, H.; Hepatoprotective effect of green tea (*Camelia sinensis*) extract against tamoxifen-induced liver injury in rats; *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*; v. 38; p. 563-570; 2005.

ENGELKE, M.; BORJARSKI, P.; BLOB, R.; DIEHL, R.; Tamoxifen perturbs lipid bilayer order and permeability: comparison of DSC, fluorescence anisotropy, laurdan generalized polarization and carboxyfluorescein leakage studies; *Biophysical Chemistry*; v. 90; p. 157-173; 2001.

FILHO, V.W.; GATTÁS, G.J.F.; Biomarcadores moleculares do câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública; *Cadernos de Saúde Pública*; v. 17; 2001.

GUERRA, M.R.; GALLO, C.V.M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S.; Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes; *Revista Brasileira de Cancerologia*; v. 51; p. 227-234; 2005.

GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M.C.W.; GORENSTEIN, C.; SCAVONE, C.; O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos; *Revista Brasileira de Psiquiatria*; v. 22; 2000.

GOETZ, M.P.; KAMAL, A.; AMES, A.A.; Tamoxifen pharmacogenomics: the role of CYP2D6 as a predictor of drug response; *Clinical Pharmacology Therapy*; v. 83; p. 160-166; 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A.; The hallmarks of cancer; *Cell*; v. 100; p. 57-70; 2000.

HEMEIDA, R.A.M.; MOHAFAZ, O.M.; Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats; *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*; v. 20; p. 141-148; 2008.

HEUMULLER, S.; WIND, S.; BARBOSA-SICARD, E.; SCHMIDT, H.H.H.W.; BUSSE, R.; SCHRODER, K.; BRANDES, R.P.; Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant; *Hypertension*; v. 51; p. 211-217; 2008.

HO, K.; YAZAN, L.S.; ISMAIL, N.; ISMAIL, M.; Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin; *Cancer Epidemiology*; v. 33; p. 155-160; 2009.

HUANG, M.T.; MA, W.; YEN, P.; XIE, J.G.; HAN, J.; FRENKEL, K.; GRUNBERGER, D.; CONNEY, A.H.; Inhibitory effects of topical application of low doses of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and oxidized DNA bases in mouse epidermis; *Carcinogenesis*; v. 18; p. 83-88; 1997.

HUANG, C.; CHENG, H.; LIN, K.; CHENG, J.; TSAI, J.; LIAO, W.; FANG, Y.; JAN, C.; Tamoxifen-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise and apoptosis in corneal epithelial cells; *Toxicology*; v. 255; p. 58-64; 2009.

Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde; Estimativa/2010: Incidência de Câncer no Brasil; Rio de Janeiro; [homepage na internet]. [citado em 08 jun 2011]. Disponível em <http://www.inca.gov.br/>

JEYAKUMAR, R.; RAJESH, R.; MEENA, B.; RAJAPRABHU, D.; GANESAN, B.; BUDDHAN, S.; ANADAN, R.; Antihepatotoxic effect of *Picrorhiza kurroa* on mitochondrial defense system in antitubercular drugs (isoniazid and rifampicin)-

induced hepatitis in rats; *Journal of Medicinal Plants Research*; v. 2; p. 17-19; 2007.

Jl, Z.; Targeting DNA damage and repair by curcumin; *Breast Cancer*; v. 4; p. 1-3; 2010.

KAWAMORI, T.; LUBET, R.; STEELE, V.E.; KELLOFF, G.J.; KASKEY, R.B.; RAO, C.V.; REDDY, B.R.; Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer; *Cancer Research*; v. 59; p. 597-601; 1999.

KHAFIF, A.; SCHANTZ, S.P.; CHOU, T.C.; EDELSTEIN, D.; SACKS, P.G.; Quantitation of chemopreventive synergism between (2)-epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells; *Carcinogenesis*; v. 19; p. 419-424; 1998.

KIM, J.M.; ARAKI, S.; KIM, D.J.; PARK, C.B.; TAKASUKA, N.; BABATORIYAMA, H.; OTA, T.; NIR, Z.; KHACHIK, F.; SHIMIDZU, N.; TANAKA, Y.; OSAWA, T.; URAJI, T.; MURAKOSHI, M.; NISHINO, H.; TSUDA, H.; Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation; *Carcinogenesis*; v. 19; p. 81-85; 1999.

KUNNUMAKKARA, A.B.; GUHA, S.; KRISHNAN, S.; DIAGARADJANE, P.; GELOVANI, J.; AGGARWAL, B.B.; Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products; *Cancer Research*; v. 67; p. 3853-3861; 2007.

LAFEBER, F.P.J.G.; BEUKELMAN, C.J.; WORM, E.; ROY, J.L.A.M.; VIANEN, M.E.; ROON, J.A.G.; DIJK, H.; BIJLSMA, J.W.J.; Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis; *Rheumatology*; v. 38; p. 1088-1093; 1999.

LAZARUS, P.; BLEVINS-PRIMEAU, A.S.; ZHENG, Y.; SUN, D.; Potential role of UGT pharmacogenetics in cancer treatment and prevention: focus on tamoxifen; *Annals of the New York Academy of Sciences*; v. 1155; p. 99-111; 2009.

LEV-ARI, S.; VEXLER, A.; STARR, A.; ASHKENAZY-VOGHERA, M.; GREIF, J.; ADERKA, D.; BEN-YOSEF, R.; Curcumin augments gemcitabine cytotoxic effect on pancreatic adenocarcinoma cell lines; *Cancer Investigation*; v. 25; p. 411-418; 2007.

LIANG, J.; WU, S.; LO, H.; HSIANG, C.; HO, T.; Vanillin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression through down regulation of nuclear factor-kB signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells; *Molecular Pharmacology*; v. 75; p. 151-157; 2008.

LIMTRAKUL, P.; LIPIGORNGOSON, S.; NAMWONG, O.; APISARIYAKUL, A.; DUNN, F.W.; Inhibition of carcinogen induced c-Ha-ras and c-fos proto-oncogenes expression by dietary curcumin; *Cancer Letter*; v. 116; p. 197-203; 1997.

LIN, X.; MU, Y.; CUNNINGHAM, E.T.; MARCU, K.B.; GELEZIUNAS, R.; GREENE, W.; Molecular determinants of NF-kB inducing kinase action; *Molecular and Cellular Biology*; v. 18; p. 5899-5907; 1998.

LIRDPRAPAMONGKOL, K.; SAKURAI, H.; KAWASAKI, N.; CHOO, M.; SAITOH, Y.; AOZUKA, Y.; SINGHRUNNUSORN, P.; RUCHIRAWAT, S.; SVASTI, J.; SAIKI, I.; Vanillin suppresses *in vitro* invasion and *in vivo* metastasis of mouse breast cancer cells; *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; v. 25; p. 57-65; 2005.

LIRDPRAPAMONGKOL, K.; SAKURAI, H.; SUZUKI, S.; KOIZUMI, K.; PRANGSAENGTONG, O.; VIRIYAROJ, A.; RUCHIRAWAT, S.; SVASTI, J.; SAIKI, I.; Vanillin enhances TRAIL-induced apoptosis in cancer cells through

inhibition of NF- κ B activation; *In vivo*; v. 24; p.501-506; 2010.

LU, Y.P.; CHANG, R.L.; LOU, Y.R.; HUANG, M.T.; NEWMARK, H.L.; REUHL, K.R.; CONNEY, A.H.; Effect of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and ultraviolet B light-induced expression of c-Jun and c-Fos in JB6 cells and in mouse epidermis; *Carcinogenesis*; v. 15; p. 2363-2370; 1994.

MILLER, M.; CHEN, S.; WOODLIFF, J.; KANSRA, S.; Curcumin (Diferuloylmethane) inhibits cell proliferation, induces apoptosis, and decreases hormone levels and secretion in pituitary tumor cells; *Endocrinology*; v. 149; p. 4158-4167; 2008.

MOCANU, E.V.; HARRISON, R.F.; Tamoxifen in gynaecology; *Gynaecological Practice*; v. 4; p. 37-45; 2004.

MUNSHI, A.; SINGH, P.; Tamoxifen in breast cancer: not so easy to write off; *The Breast*; v. 17; p. 121-124; 2008.

NAUGLER, W.E.; KARIN, M.; NF- κ B and cancer- identifying targets and mechanisms; *Current Opinion in Genetics & Development*; v. 18; p. 19-26; 2008.

OSANI, T.; PATEL, R.; PYLE, J.; JORDAN, V.C.; Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens; *Planta Medicinal*; v. 74; p. 1656-1665; 2008.

PACHECO, S.M.V.; DAMASIO, F.; Vanilina: origem, propriedades e produção; *Química Nova*; v. 32; p. 215-219; 2010.

PAGANO, G.; BIASE, A.; DEEVA, I.B.; DEGAN, P.; DORONIN, Y.K.; IACCARINO, M.; ORAL, R.; TRIEFF, N.M.; WARNAU, M.; KORKINA, L.G.; The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen; *Life Sciences*; v. 68; p. 1735-1749; 2001.

PARRONDO, R.; POZAS, A.; REINER, T.; RAI, P.; PEREZ-STABLE, C.; NF- κ B activation enhances cell death by antimetabolic drugs in human prostate cancer

cells; *Molecular Cancer*; v. 9; p. 1-13; 2010.

PETINARI, L.; KOHN, L.K.; CARVALHO, J.E.; GENARI, S.C.; Cytotoxicity of tamoxifen in normal and tumoral cell lines and its ability to induce cellular transformation in vitro; *Cell Biology International*; v. 28; p. 531-539; 2004.

PÉRET-ALMEIDA, L.; NAGHETINI, C.C.; NUNAN, E.A.; JUNGQUEIRA, R.G.; GLÓRIA, M.B.A; Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da *Cúrcuma longa L.*; *Ciência Agrotecnologia*; v. 32; p. 875-881; 2008.

PILLAI, G.R.; SRIVASTAVA, A.S.; HASSANEIN, T.I.; CHAUHAN, D.P.; CARRIER, E.; Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin; *Cancer Letters*; v. 208; p. 163-170; 2004.

RAJESWARI, A.; SABESAN, M.; Inhibition of monoamine oxidase-B by the polyphenolic compound, curcumin and its metabolite tetrahydrocurcumin, in a model of Parkinson's disease induced by MPTP neurodegeneration in mice; *Inflammopharmacology*; v. 16; p. 96-99; 2008.

RAO, C.V.; RIVENSON, A.; SIMI, B.; REDDY, B.S.; Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound; *Cancer Research*; v. 55; p. 259-266; 1995.

REDDY, R.C.; VATSALA, P.G.; KESHAMOUNI, V.G.; PADMANABAN; G.; RANGARAJAN, P.N.; Curcumin for malaria therapy; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; v. 326; p. 472-474; 2005.

RUBY, A. J.; KUTTAN, G.; DINESH, B.K.; RAJASEKHARAN, K.N.; KUTTAN, R.; Anti-tumor and antioxidant activity of natural curcuminoids; *Cancer Letters*; v. 94; p. 79-83; 1995.

RUMYANTSEV, S.; Hypothesis: towards the origin of cancer epidemics and pathogenesis; *Journal of Carcinogenesis*; v. 9; p. 1-2; 2010.

SANTOS, H.S.; CRUZ, W.M.S.; A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico; *Revista Brasileira de Cancerologia*; v. 47; p. 303-308; 2001.

SENKUS-KONEFKA, E.; KONEFKA, T.; JASSEM, J.; The effects of tamoxifen on the female genital tract; *Cancer Treatment Reviews*; v. 30; p. 291-301; 2004.

SILVA, M.M.C.; MADEIRA, V.M.C.; ALMEIDA, L.M.; CUSTODIO, J.B.A.; Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure; *Biochimica et Biophysica Acta*; v. 1464; p. 41-61; 1999.

SINGH, S.; AGGARWAL, B.B.; Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane); *The Journal of Biological Chemistry*; v. 270; p. 24995-5000; 1995.

SINGH, S.; KHAR, A.; Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy; *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*; v. 6; p. 259-270; 2006.

SHI, M.; CAI, Q.; YAO, L.; MAO, Y.; MING, Y.; OUYANG, G.; Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells; *Cell Biology International*; v. 30; p. 221-226; 2006.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R.; Apocynin: Molecular aptitudes; *Mediators of inflammation*; v. ; p. 1-10; 2008.

TABASSUM, H.; REHMANN, H.; BANERJEE, B.D.; RAISUDDIN, S.; PARVEZ, S.; Attenuation of tamoxifen-induced hepatotoxicity by taurine in mice; *Clinica Chimica Acta*; v. 370; p. 129-136; 2006.

THANGAPAZHAN, R.L.; SHARMA, A.; MAHESHWARI, R.K.; Multiple molecular targets in câncer chemoprevention by curcumin; *The AAPS Journal*; v.

8; p. 443-449; 2006.

TAI, A.; SAWANO, T.; YAZAMA, F.; ITO, H.; Evaluation of antioxidante activity of vanillin by using multiple antioxidante assays; *Biochimica et Biophysica Acta*; v. 1810; p. 170-177; 2011.

TOUYZ, R.M.; Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells: a complex matter; *Hypertension*; v. 51; p.172-174; 2008.

USHIO-FUKAI, M.; NAKAMURA, Y.; Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy; *Cancer Letters*; v. 266; p. 37-52; 2008.

WANG, Q.; SMITH, R.E.; LUCHTEFELD, R.; SUN, A.Y.; SIMONYI, A.; LUO, R.; SUN, G.Y.; Bioavailability of apocynin through its conversion to glycoconjugate but not to dyapocinin; *Phytomedicine*; v. 15; p. 496-503; 2008.

WANG, M.S.; BODDAPATI, S.; EMADI, S.; SIERKS, M.R.; Curcumin reduces α -synuclein induced cytotoxicity in Parkinson's disease cell model; *BMC Neuroscience*; v. 11; p. 1-10; 2010.

WARD, L.S.; Entendendo o processo molecular da tumorigênese; *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*; v. 46; 2002.

WU, J.Y.; LIN, C.Y.; LIN, T.W.; KEN, C.F.; WEN, Y.D.; Curcumin affects development of zebrafish embryo; *Biological & Pharmaceutical Bulletin*; v. 30; p. 1336-1339; 2007.

XIMENES, V.F.; KANEGAE, M.P.P.; RISSATO, S.R.; GALHIANE, M.S.; The oxidation of apocynin catalysed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition; *Archives of Biochemistry and Biophysics*; v. 457; p. 134-141; 2007.