



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

IVANA NOGUEIRA FERNANDES DANTAS

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTICÂNCER *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
TRITERPENOS CUCURBITANOS (CUCURBITACINAS) OBTIDOS DA
PLANTA *Cayaponia racemosa* COGN.**

FORTALEZA

2008

IVANA NOGUEIRA FERNANDES DANTAS

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTICÂNCER *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
TRITERPENOS CUCURBITANOS (CUCURBITACINAS) OBTIDOS DA PLANTA

Cayaponia racemosa COGN.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leticia Veras Costa-Lotufó

FORTALEZA

2008

D212e Dantas, Ivana.

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTICÂNCER IN VITRO E IN VIVO DE TRITERPENOS CUCURBITANOS (CUCURBITACINAS) OBTIDOS DA PLANTA Cayaponia racemosa COGN. /

Ivana Dantas. – 2008.

102 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de PósGraduação em Farmacologia, Fortaleza, 2008.

Orientação: Prof. Dr. Leticia Veras Costa-Lotufo.

1. Triterpenos. 2. Apoptose. I. Título.

CDD 615.1

IVANA NOGUEIRA FERNANDES DANTAS

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTICÂNCER *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
TRITERPENOS CUCURBITANOS (CUCURBITACINAS) OBTIDOS DA PLANTA
Cayaponia racemosa COGN.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

A transcrição de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Letícia Veras Costa-Lotufo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof^ª. Dr^ª. Gardenia Carmen Gadelha Militão (Examinador)
Universidade Federal do Piauí

Prof^ª. Dr^ª. Flávia Almeida Santos (Examinador)
Universidade Federal do Ceará

Aos que contribuíram para a realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Letícia Costa Lotufo, pela pessoa que ela é e pela exemplar profissional, mas acima de tudo pela orientação e pela força durante todos esses anos.

À Profa. Dra. Cláudia Pessoa, ao Prof. Dr. Odorico de Moraes e à Dra. Raquel Montenegro, pelo incentivo voltado ao crescimento do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) e, conseqüentemente, aos alunos que dele fazem parte.

À Profa. Ana Paula Negreiros, pelos ensinamentos e pelas análises em histopatologia.

Ao Prof. Francisco Monte, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, por ter cedido as substâncias objeto de estudo desse trabalho e pelas lições em Química, e quem esteve orientando Davina Camelo Chaves, responsável pelo isolamento e caracterização das cucurbitacinas.

À Profa. Dra. Gardenia Militão, pela ajuda e pelo auxílio em todas as fases dessa pesquisa, sempre acompanhando de perto o meu crescimento no laboratório.

Ao Michel, pela ajuda nos experimentos, e, especialmente, nos momentos difíceis de experimentos *in vivo* e posterior análise.

Às técnicas Silvana, Luciana e Fátima, pela ajuda durante a realização desse trabalho.

Aos amigos queridos do LOE, Elthon, Carla, Patrícia, Danilo, Washington, Daniel, José Roberto, Adriana, Hemerson, Bruno, Cecília, Arinice, Diego, Paula Jimenez, Paula Abreu, Delano, Jérsia, Kézia, Kristiana, Felipe, Vanesca, Daniel, Eveline, Marcio, Marne, pela ajuda nos experimentos, pelo companheirismo e, principalmente, por tornar os momentos no LOE inesquecíveis para mim!!!

À minha mãe Olaneide, pelos ensinamentos, pelo apoio incondicional, pelas horas difíceis ao meu lado, enfim... pelo seu amor!

Ao meu pai Ivan. Eu sei que ele se importa e que me ama.

Ao CNPq pela contribuição financeira a esse trabalho

RESUMO

As cucurbitacinas são triterpenos tetracíclicos altamente oxigenados. O presente trabalho visou a avaliar as propriedades anticâncer de três cucurbitacinas (2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona (**1**), 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5,23(E)-dien-22-ona (deacetilpicracina, **2**) e 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-11,22-diona (cucurbitacina P, **3**) em modelos *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente foi avaliada a atividade citotóxica em células mononucleadas de sangue periférico humano. Em seguida utilizou-se a linhagem tumoral HL-60 para determinar a viabilidade celular pelo método por exclusão por azul de tripan, a morfologia celular através da coloração diferencial com hematoxilina/eosina, a capacidade proliferativa através do método da incorporação do BrdU e a atividade indutora de apoptose através da coloração com laranja de acridina/brometo de etídeo (LA/BE), fragmentação do DNA e despolarização da mitocôndria por citometria de fluxo. Nenhuma das cucurbitacinas foi citotóxica para as células mononucleadas no ensaio do *alamar blue* (CI₅₀>25 μ g/mL). Os compostos reduziram o número de células HL-60 viáveis e nenhuma delas alterou o número de células não-viáveis na concentração de 5,0 μ g/mL. A análise morfológica das células tratadas com o composto **3** indicou a presença de muitas células com características apoptóticas. As células tratadas com o composto **1** e **2** apresentaram intensa deposição de grânulos no citoplasma (eosinofilia), fragmentação do DNA e irregularidades na membrana plasmática. O composto **1** inibiu de forma significativa a incorporação do BrdU (5,0 μ g/mL: 22%), seguido por **2** (5,0 μ g/mL: 17%). A coloração com LA/BE revelou drástica redução do número de células viáveis com aumento das células apoptóticas para os três compostos, sem aumento do número de células necróticas. Houve parada do ciclo celular em na fase S e despolarização da mitocôndria nas células tratadas com o composto **2** (5,0 μ g/mL). Apenas o composto **1** foi avaliado quanto à atividade anticâncer *in vivo* em camundongos *Mus musculus* Swiss transplantados com o tumor Sarcoma 180, sendo este capaz de causar 52 e 62% de inibição tumoral administrado isolado (25mg/Kg/dia) ou em associação com o quimioterápico 5-FU (10 + 10 mg/Kg/dia), respectivamente. A histopatologia do fígado, rins e baço dos animais tratados revelou alterações discretas e potencialmente reversíveis. Como conclusão, as cucurbitacinas estudadas apresentaram atividade antiproliferativa sobre células tumorais HL-60 associada à indução de apoptose. Adicionalmente, o composto **1** possuiu atividade anticâncer *in vivo* moderada no modelo do tumor Sarcoma 180.

Palavras-chave: Cucurbitacina. Citotoxicidade. Anticâncer. Apoptose.

ABSTRACT

STUDY ON THE ANTICANCER PROPERTIES *IN VITRO* AND *IN VIVO* OF CUCURBITAIN TRITERPENES (CUCURBITACINS) OBTAINED FROM THE PLANT *Cayaponia racemosa* COGN.

Cucurbitacins are a group of highly oxygenated tetracyclic triterpenoids. This study aimed to evaluate the anticancer properties of three cucurbitacins (2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahydroxy-cucurbita-5-ene-22-ona (**1**), 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahydroxy-cucurbita-5,23(E)-diene-22-ona (deacetylpicracin, **2**) and 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahydroxy-cucurbita-5-ene-11,22-dione (cucurbitacin P, **3**) on *in vitro* and *in vivo* models. First, the cytotoxic activity on human peripheral mononuclear blood cells (PMBC) by alamar blue method, cell viability by tripan blue exclusion method, morphological changes using hematoxylin/eosin (HE) staining, proliferative capability using BrdU incorporation method and the induction of apoptosis using acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining were evaluated. None of cucurbitacins was cytotoxic to PMBC in alamar blue test ($IC_{50} > 25 \mu\text{g/ml}$). The tripan blue exclusion test revealed that, except compound **3** (2.5 $\mu\text{g/ml}$), all cucurbitacins (2.5 and 5.0 $\mu\text{g/ml}$) reduced the number of viable HL-60 cells, and none of them changed the number of non-viable cells. The morphological analysis of cells treated with **3** indicated the presence of many apoptotic cells (cell retraction, DNA fragmentation and vacuoles) in both concentrations, confirming data obtained by AO/EB staining. Cells treated with **1** showed intense deposition of granules in the cytoplasm (eosinophilia), DNA fragmentation and irregularities in the plasma membrane. Compound **2** caused intense vacuolization, deposition of granules in the cytoplasm and plasma membrane disruption. Regarding the antiproliferative activity, compounds **1** and **2** were active. Compound **1** was the most active, showing BrdU incorporation inhibition of 17% (2.5 $\mu\text{g/ml}$) and 22% (5.0 $\mu\text{g/ml}$), followed by compound **2** (5.0 $\mu\text{g/ml}$: 17%). The AO/EB staining showed drastic reduction in the number of viable cells with increasing number of apoptotic cells for all compounds, without increasing the number of necrotic cells. Then, flow cytometry analyses were performed. The evaluation of cell membrane integrity showed membrane disruption only on those cells treated with compound **1** (5.0 $\mu\text{g/mL}$). The assessment of nuclear DNA content distribution revealed that compound **2** induced cell cycle arrest at S phase. Finally, mitochondrial membrane depolarization was observed in cells treated with compound **2** (5.0 $\mu\text{g/ml}$). On Sarcoma 180 tumor model, compound **1** showed 52% and 62% of antitumoral activity, alone (25mg/Kg/day) or in association to the chemotherapeutic agent 5-FU (10 + 10 mg/kg/day), respectively. Moreover, alone or associated with 5-FU, **1** caused increasing on spleens weight. Histopathological analysis of liver, kidneys and spleen showed signs of slight toxicity and potentially reversible and discrete alterations. In conclusion, cucurbitacins tested showed antiproliferative activity on HL-60 tumor cell line associated with induction of apoptosis. Additionally, compound **1** had moderate *in vivo* anticancer activity in Sarcoma 180 tumor model.

Keywords: Cucurbitacin. Cytotoxicity. Anticancer. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

1	O ciclo celular.....	18
2	Apoptose e necrose.....	19
3	Passos na sinalização das duas vias de apoptose.....	20
4	Estrutura química da vincristina, vimblastina e vinorelbina.....	22
5	Estrutura química da podofilotoxina, do etoposídeo e teniposídeo.....	23
6	Estrutura química do paclitaxel e docetaxel.....	24
7	Estrutura química da camptotecina, do topotecan e do irinotecan.....	26
8	Agentes anticâncer disponíveis, período de 1940 a 06/2006.....	27
9	Agentes anticâncer aprovados entre 1950 e 2006.....	28
10	Estrutura química do esqueleto cucurbitano [19-(10→9β)-abeo-10α-lanost-5-eno].....	31
11	Estrutura química das cucurbitacinas B, D, E, I e L (ou 23,24-diidrocucurbitacina I) e 23,24-diidrocucurbitacina E.....	33
12	Estrutura química da cucurbitacina R (23,24-diidrocucurbitacina D) e 23,24-diidrocucurbitacina B.....	34
13	Estrutura química das cucurbitacinas K, P e Q.....	37
14	Estrutura química da cucurbitacina F.....	38
15	Estrutura química da picracina e deacetilpicracina.....	39
16	Estrutura química de 2β,3β,16α,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5,23(E)-dien-22-ona (Deacetilpicracina), 2β,3β,16α,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-11,22-diona (Cucurbitacina P).....	47
17	Efeito da deacetilpicracina (A), da cucurbitacina P (B) e da 2β,3β,16α,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona (C) na viabilidade de células da linhagem tumoral HL-60.....	60
18	Fotomicrografia de células HL-60 após 24 horas de incubação com a cucurbitacina P coradas com hematoxilina/eosina.....	62
19	Fotomicrografia de células HL-60 após 24 horas de incubação com a cucurbitacina P coradas com hematoxilina/eosina.....	63

20	Fotomicrografia de células HL-60 após 24 horas de incubação com a cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona coradas com hematoxilina/eosina.....	64
21	Fotomicrografia de células HL-60 após 24 horas de incubação com a deacetilpicracina coradas com hematoxilina/eosina.....	65
22	Atividade da deacetilpicracina (A), da cucurbitacina P (B) e da 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona (C) expressa em percentual (%), sobre os eventos celulares.....	68
23	Efeito das cucurbitacinas sobre a viabilidade celular de células leucêmicas HL-60 determinada por citometria de fluxo.....	69
24	Efeito das cucurbitacinas sobre o potencial transmembrânico das mitocôndrias de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo.....	72
25	Massa tumoral úmida de camundongos <i>Mus musculus</i> Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento.....	73
26	Fotomicrografia dos rins de camundongos <i>Mus musculus</i> Swiss transplantados com Sarcoma 180.....	77
27	Fotomicrografia do fígado de camundongos <i>Mus musculus</i> Swiss transplantados com Sarcoma 180.....	78
28	Fotomicrografia do baço de camundongos <i>Mus musculus</i> Swiss transplantados com Sarcoma 180.....	79
29	Fotomicrografia dos tumores de camundongos <i>Mus musculus</i> Swiss transplantados com Sarcoma 180.....	80

LISTA DE TABELAS

- 1 Atividade citotóxica das cucurbitacinas em células normais humanas (PBMC - *peripheral blood mononuclear cell*), após 72 horas..... 59
- 2 Atividade antiproliferativa das cucurbitacinas expressa em percentual de células BrdU-positivas e percentagem de inibição da incorporação..... 66
- 3 Efeito das cucurbitacinas sobre a distribuição do conteúdo de DNA de células leucêmicas HL-60 determinada por citometria de fluxo..... 71
- 4 Efeito da cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona (10 e 25mg/Kg/dia) sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos (*Mus musculus*)..... 76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Produtos Naturais	13
1.2	Câncer	16
1.3	Produtos naturais com atividade anticâncer	21
1.4	Cucurbitacinas	28
2	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivo Geral	41
2.2	Objetivos Específicos	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Materiais Utilizados	42
3.1.1	Equipamentos.....	42
3.1.2	Soluções, reagentes e fármacos.....	43
3.1.3	Modelos biológicos.....	46
3.2	Metodologia experimental	46
3.2.1	Obtenção das cucurbitacinas de <i>Cayaponia racemosa</i>	46
3.2.2	Estudo da atividade citotóxica das cucurbitacinas.....	48
3.2.2.2	Avaliação da atividade antiproliferativa em células mononucleadas do sangue periférico – Método do Alamar Blue.....	48
3.2.3	Estudos do mecanismo de ação com a linhagem tumoral HL-60.....	49
3.2.3.1	Viabilidade por Exclusão por Azul de Tripan.....	49
3.2.3.2	Análise morfológica - Coloração por hematoxilina/eosina.....	50
3.2.3.3	Atividade antiproliferativa– Incorporação do BrDU.....	50
3.2.3.4	Estudo da indução de apoptose através de coloração por Laranja de Acridina Brometo de Etídio.....	51
3.2.3.5	Estudos de citometria de fluxo.....	52
3.2.3.5.1	Determinação da viabilidade celular.....	52
3.2.3.5.2	Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula.....	53
3.2.3.5.3	Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria.....	54

3.2.4	Avaliação da atividade antitumoral da cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 β ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona isolada ou em associação com o quimioterápico 5-Fluorouracil em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180.....	54
3.2.4.1	Análise histopatológica dos órgãos e tumores.....	56
3.2.5	Análise estatística dos dados.....	56
4	RESULTADOS	58
4.1	Estudo da atividade citotóxica das cucurbitacinas	58
4.1.2	Avaliação da atividade antiproliferativa em células mononucleadas do sangue periférico - Método do Alamar Blue.....	58
4.2	Estudos do mecanismo de ação com a linhagem tumoral HL-60	59
4.2.1	Viabilidade por Exclusão por Azul de Tripán.....	59
4.2.2	Análise morfológica - Coloração por hematoxilina/eosina.....	61
4.2.3	Atividade antiproliferativa – Incorporação do BrDU.....	66
4.2.4	Estudo da indução de apoptose através de coloração por Acridina Laranja/Brometo de Etídio.....	67
4.2.5	Determinação da viabilidade celular.....	69
4.2.6	Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula.....	70
4.2.7	Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria.....	72
4.3	Avaliação do efeito antitumoral da cucurbitacina PIR isolada e em associação com o quimioterápico 5-Fluorouracil em camundongos Mus musculus Swiss transplantados com tumor Sarcoma 180	73
5	DISCUSSÃO	81
6	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

A grande variedade estrutural e a promissora atividade biológica de muitos produtos naturais têm chamado a atenção de químicos e de grupos que desenvolvem drogas por décadas. Muitos dos produtos farmacêuticos mais vendidos mundialmente, rendendo bilhões de dólares em vendas por ano, são produtos naturais ou análogos semi-sintéticos de produtos naturais (MYLES, 2003). Tradicionalmente, os produtos naturais têm sido uma importante fonte de produtos farmacêuticos.

A importância dos produtos naturais para o tratamento de doenças no homem já foi destacada em diversos trabalhos e os produtos naturais continuam a desempenhar um relevante papel nos processos de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (BUTLER, 2004; BUTLER, 2005; CRAGG; NEWMAN, 2005; GALM; SHEN, 2007; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2006; NEWMAN; CRAGG, 2007). A utilização de plantas no tratamento de doenças no homem data de tempos remotos, com registro na antiga China há cerca de 2700 a.C. e em papiros egípcios por volta de 1500 a.C.. No entanto, apesar da grande importância que a natureza e seus produtos possuem para a humanidade, o desenvolvimento e a aplicação dos produtos naturais apresentaram pouco progresso até a década de 1940 (SOUZA *et al.*, 2007).

No final da década de 80 e início de 90, as companhias farmacêuticas, encorajadas pela competição para desenvolver novas classes de fármacos, passaram a procurar novos meios de acelerar esse processo e o desenvolvimento da tecnologia de *high-throughput screening* (HTS) foi um dos avanços. O HTS é o processo de analisar a interação de um grande número de efetores potenciais de atividades biológicas e seus alvos (um evento biológico). Gradualmente, as companhias farmacêuticas estão apostando nessa técnica como a principal forma de descoberta de novos compostos. A principal vantagem do HTS é a capacidade de processar milhares de ensaios por dia, e por isso, ele baseia-se na combinação de placas multipoços e processamentos robóticos. Por muitos anos, os ensaios de HTS foram realizados em placas de 96 poços (volume de trabalho de até 250 μ L). O objetivo atual das

companhias farmacêuticas é passar para formatos mais densos e com pequenos volumes (por exemplo, placas multipoços com 384 e 1536 poços) (MISHRA *et al.*, 2007).

Contudo, algumas desvantagens cercavam a pesquisa com produtos naturais em relação à pesquisa com produtos sintéticos, como o fato de os produtos naturais serem produzidos em pouca quantidade, o problema do redescobrimento de moléculas já conhecidas e o longo tempo gasto na purificação e identificação dos produtos. Assim, o modelo de *screening* de produtos naturais estabelecido nessa época não foi compatível com a abordagem do HTS e a promessa do rápido fornecimento de grandes bibliotecas de compostos sintéticos levou muitas companhias a eliminar ou cortar drasticamente seus esforços no *screening* de produtos naturais (LAM, 2007).

Até pouco tempo atrás, a tecnologia aplicada para investigar produtos naturais com o objetivo de descobrir de novos fármacos não evoluía substancialmente. As novas tecnologias que poderiam incrementar a pesquisa com produtos naturais não evoluíram suficientemente de modo a equiparar a taxa de descobrimento de fármacos derivados de produtos naturais com as demandas da indústria. Além disso, a ausência de foco por muitas indústrias farmacêuticas foi outro fator. Como existem muitas fontes diferentes de produtos naturais, as indústrias farmacêuticas tornaram-se fragmentadas em pequenos setores e os estudos ficaram dispersos em várias áreas, como, anti-infecciosos, antitumorais, anti-hipertensivos, etc. Esses fatores levaram à percepção dentro da indústria de que encontrar um produto natural promissor para o tratamento de qualquer doença era um desafio dispendioso e difícil, não valendo à pena o tempo e os custos gastos (LAM, 2007).

Recentes avanços tecnológicos e o desenvolvimento de novos métodos revolucionaram o *screening* de produtos naturais e re-estabeleceram os produtos naturais como a maior fonte de novas moléculas (LAM, 2007).

São exemplos de recentes avanços na tecnologia que logo de imediato tiveram impacto na descoberta de novas drogas:

1. Desenvolvimento de *screening* racionalizado, através da automação dos mecanismos de preparação de extratos e fracionamento bioguiado, otimização de processos de fermentação, purificação, desreplicação e elucidação estrutural, possibilitando acesso mais rápido a quantidades suficientes de moléculas isoladas.

2. Recentes avanços nas técnicas hífenadas de separação, como, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High-pressure Liquid Chromatography* - HPLC) e Extração em

Fase Sólida (*Solid Phase Extraction* - SPE) com Ressonância Magnética Nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance* - NMR) e Espectrometria de Massa (*Mass Spectrometry* – MS), contribuíram bastante para o encurtamento do tempo gasto para isolamento e elucidação estrutural das moléculas presentes nos extratos brutos.

3. Aprimoramento na busca por produtos naturais. A produção de qualquer produto natural requer processamento de uma fonte biológica (microorganismo, planta ou animal), a qual necessita manipulação experiente e equipamento especializado. Como resultado, seriam necessários mais recursos físicos e tempo para explorar produtos naturais de todas as fontes. Estreitando o foco para uma única fonte de produto natural, mais produtiva e mais confiável, pode-se maximizar o sucesso da indústria farmacêutica no processo de descoberta de novos fármacos.

4. Avanços nas metodologias de síntese orgânica, na biossíntese combinatória e na genômica microbiana.

Os produtos naturais apresentam incomparável diversidade química com complexidade estrutural e potencial biológico. A biossíntese de produtos naturais pode ser manipulada para fornecer novos derivados com possivelmente mais qualidade e em maior quantidade. Eles não servem apenas como drogas ou modelo para drogas, mas em muitos casos levaram ao descobrimento e melhor entendimento de alvos e vias envolvidos no processo da patologia em estudo. Como exemplo, moléculas que interagem com novos alvos. (LAM, 2007).

Newman *et al.* (2003) reportaram que entre 1981 e 2002 mais de 60% das drogas aprovadas para o tratamento de câncer eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Em uma revisão mais recente, pelo menos 23 produtos naturais e drogas derivadas de produtos naturais foram lançados no mercado na Europa, Japão ou Estados Unidos de 2001 a 2005 para o tratamento de enfermidades como câncer, infecções bacterianas e fúngicas, diabetes, dislipidemia, dentre outras. Além disso, 136 produtos naturais e drogas derivadas de produtos naturais estão em fase de estudo clínico nas principais áreas terapêuticas (BUTLER, 2005). Desta forma, produtos naturais ainda possuem importante papel e grande potencial como fonte primária para descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.

A análise dos resumos apresentados nas Reuniões Anuais da SBQ de 1997 a 2001 revela o predomínio de trabalhos em fitoquímica, envolvendo principalmente isolamento e

determinação estrutural (51%) e desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas (16%), enquanto trabalhos sobre atividade biológica representam cerca de 19%. Esses números expressam a dificuldade que persiste em se realizar trabalhos multidisciplinares envolvendo fitoquímica e atividade biológica, apesar dos pesquisadores se proporem a realizar esse tipo de estudo (PINTO *et al.*, 2002).

De 1997 a 2001, o número de trabalhos com esse caráter multidisciplinar permaneceu praticamente inalterado. Todavia, a partir de 1999 observa-se um aumento significativo de trabalhos focalizando atividade biológica, o que pode estar sinalizando uma nova tendência que enfatiza a realização de trabalhos em colaboração. A consolidação dessa tendência é clara quando se verifica o aumento de cerca de 10% nos trabalhos enfocando atividade biológica, passando de cerca de 16% em 1996 para 26% em 2001. Aliada a essa perspectiva, tem-se o fato do enfoque biológico poder se traduzir numa possível aplicação, o que pode facilitar a obtenção de financiamentos à pesquisa de outras fontes extra-governamentais (PINTO *et al.*, 2002).

1.2 Câncer

Médicos do Egito antigo (3000 a.C.) registraram doenças que, dadas suas características, provavelmente podiam ser classificadas como câncer. Hipócrates (377 a.C.) também descreveu enfermidades que se assemelhavam aos cânceres de estômago, reto, mama, útero, pele e outros órgãos (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 1997). Portanto, a presença do câncer na humanidade já é conhecida há milênios. No entanto, registros que designam a causa das mortes como sendo câncer passaram a existir na Europa apenas a partir do século XVIII. Desde então, observou-se o aumento constante nas taxas de mortalidade por câncer, que parecem acentuar-se após o século XIX, com a chegada da industrialização (THE WORLD HEALTH REPORT, 1998).

Câncer é um grupo de doenças caracterizado por crescimento descontrolado e propagação de células anormais e se a propagação não for controlada, pode resultar em morte. As células do câncer possuem defeitos nos mecanismos que governam a proliferação normal. Entre as alterações encontradas nas células do tumor, algumas são compartilhadas pela maioria e talvez por todos os tipos de tumores conhecidos, tais como: auto-suficiência da sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade a inibidores do crescimento, inibição da

morte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, poder de invasão e capacidade de metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Para uma célula duplicar, ela precisa reproduzir fielmente seu DNA, produzir organelas, membranas e proteínas solúveis celulares para permitir que a célula-filha sobreviva e distribuir o DNA e o citoplasma (contendo as organelas) igualmente para formar duas células-filhas. Esse processo requer um controle *feedback* para assegurar que os passos moleculares sejam seqüenciais e corretamente orientados (REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2003).

Antes se pensava que o câncer surgia quando o crescimento celular excedia a taxa à qual as células morriam, ou seja, as células estariam se dividindo de modo descontrolado (BERGMAN; HARRIS, 1997). Hoje é aceito que o câncer é descrito como sendo produto do mau funcionamento da regulação do ciclo celular, de modo que as células defeituosas ou mutantes, que são normalmente mortas, continuam a progredir no ciclo celular, acumulando mutações (STORY; KODYM, 1998). As mutações ocorrem mais comumente em proto-oncogenes e genes supressores de tumor, os quais desempenham papel importante no ciclo celular e, portanto, no desenvolvimento do câncer. Proto-oncogenes normalmente atuam em diferentes níveis de proliferação celular, mas podem promover crescimento tumoral quando mutados. Do mesmo modo, mutação de genes supressores de tumor prejudica a inibição da progressão do ciclo celular, facilitando assim o crescimento (VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). São oncogenes, *her2/neu*, *ras*, *c-myc*, dentre outros e genes supressores tumorais, *p53* e *rb* (HARTWELL; KASTAN, 1994).

Genes supressores de tumor são locais vulneráveis para dano no DNA por causa do seu papel central na regulação da proliferação celular e estabilidade genômica. O gene supressor de tumor *p53* é mutado em cerca de 40% dos casos de câncer (GREENBLATT *et al.*, 1994).

A célula segue uma seqüência de eventos que é governada por fatores internos e externos chamada ciclo celular. O estímulo para dividir começa com a liberação de fatores de transcrição pelo núcleo mediada por fatores de crescimento. As células que estão autorizadas para replicar passam da fase G0 (fase quiescente) para a fase G1, quando ocorre crescimento celular. Em seguida, passam da fase G1 para a fase S de síntese de DNA, após passarem pelo primeiro ponto de checagem (G1-S). A fase S é seguida pela fase G2, na qual as células se preparam para a divisão na fase M em duas células-filhas idênticas (Figura 1) (FOSTER, 2007).

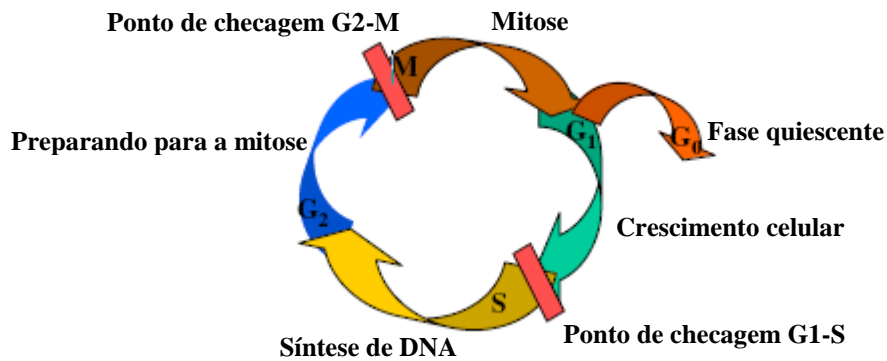


Figura 1 – O ciclo celular

Fonte: (FOSTER, 2007)

A progressão do ciclo e a passagem das células de uma fase para a outra são acompanhadas de rígido controle. Defeitos nesse processo de regulação podem levar ao acúmulo de anormalidades no DNA e subseqüentes patologias (FOSTER, 2007).

Um efetivo mecanismo pelo qual células danificadas são eliminadas é a apoptose. A apoptose é um tipo de morte celular controlada caracterizada por uma variedade de aspectos morfológicos e bioquímicos. Em uma célula apoptótica, a cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. Em seguida, ocorre formação de evaginações na membrana plasmática (*blebs*) e fragmentação nuclear, essa última seguindo um padrão característico: uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base. O aumento do tamanho e do número das evaginações da membrana plasmática resulta em seu rompimento e na formação de partículas denominadas corpos apoptóticos. Esses são rapidamente reconhecidos e fagocitados por macrófagos e células adjacentes (FADEEL; ORRENIUS, 2005).

Esses aspectos tornam-na distinta da necrose, uma forma de morte celular descontrolada e que geralmente ocorre em resposta a profundo dano celular ou à injúria física. É caracterizada por aumento do volume celular e perda da integridade da membrana plasmática, resultando na ruptura celular e lançamento do conteúdo citoplasmático no espaço extracelular. A principal consequência disso é a ativação de resposta inflamatória (FADEEL; ORRENIUS, 2005). Dados recentes mostram que a necrose pode ser um processo também regulado iniciado por vários fatores, entre eles, aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e depleção de energia celular (RICCI;

ZONG, 2006). A indução de necrose vem atraindo a atenção na terapia anticâncer. Uma abordagem hoje investigada é o uso de agente alquilantes para induzir necrose pela depleção de energia pela via da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP). Esta abordagem explora diferenças no metabolismo energético entre células tumorais e células normais com o intuito de se conseguir seletividade (HA; SNYDER, 1999; ZONG; THOMPSON, 2006). Ainda é controverso se a resposta inflamatória associada à necrose é benéfica para o resultado do tratamento ou não. A resposta inflamatória induzida pela necrose pode estar relacionada com toxicidade sistêmica, mas também pode aumentar a eficiência da morte celular tumoral (JIN; ED-DEIREY, 2005). (Figura 2).

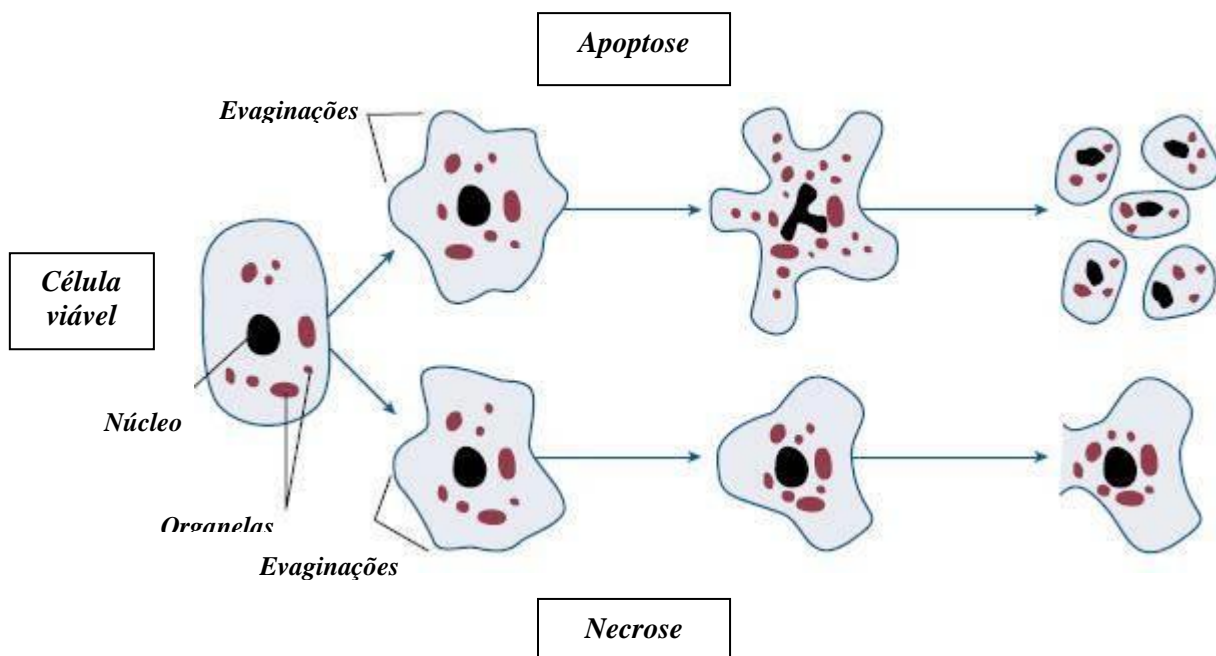


Figura 2 – Apoptose e necrose

Fonte: (GOODLETT; HORN, 2001)

Antecedendo a apoptose, existe ativação de proteases cisteinil da família das caspases, em duas distintas, mas convergentes vias. Na via extrínseca (via do “receptor de morte”), mediante interação com seus ligantes, os “receptores de morte”, por exemplo, os receptores de TNF (fator de necrose tumoral) da membrana plasmática, recrutam proteínas adaptadoras FADD (do inglês *fas associated death domain*) e caspases iniciadoras 8 e 10 que ativam a caspase efetora 3 para induzir apoptose. Na via intrínseca, também chamada de via mitocondrial, sinais de morte estimulam diretamente as mitocôndrias resultando na liberação de citocromo c, que se liga a uma

proteína adaptadora Apaf-1 (do inglês *apoptosis activating factor-1*) e recruta a caspase 9 iniciadora. Essas caspases iniciadoras podem clivar e ativar as caspases efetoras (caspase 3, 6 e 7) que clivam múltiplas proteínas celulares e induzem apoptose (ADAMS; CORY, 2007) (Figura 3).

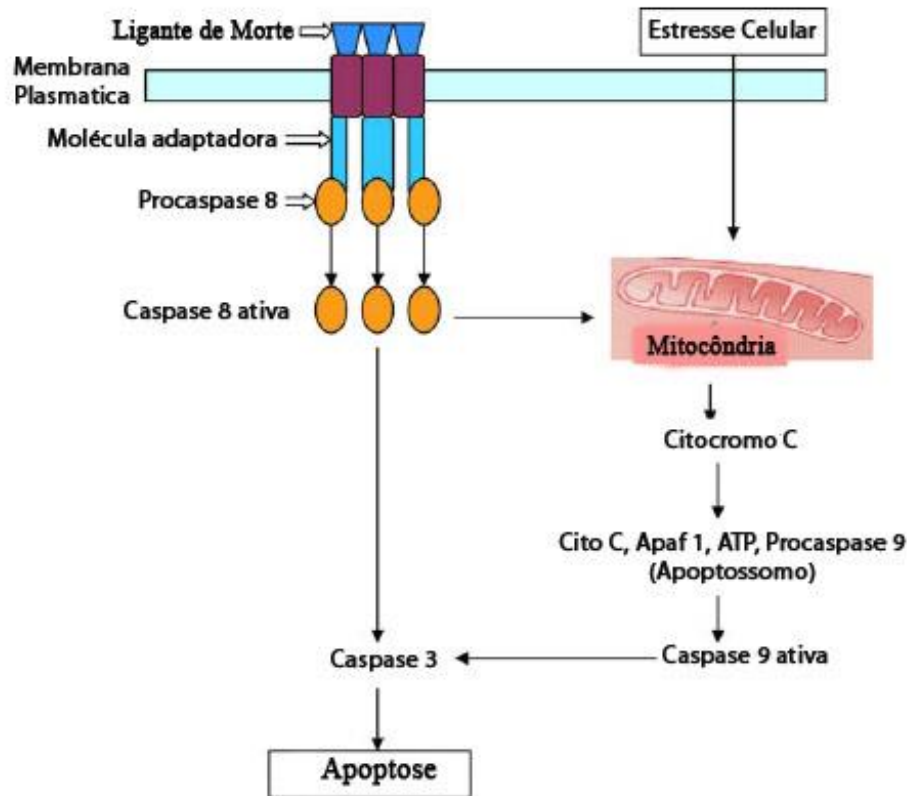


Figura 3 - Passos na sinalização das duas vias de apoptose

Fonte: (RUPINDER; GURPREET; MANJEET, 2007)

Por muitos anos, as ações citotóxicas das drogas quimioterápicas foram atribuídas unicamente à sua capacidade de induzir morte genotóxica (KIM; KAMESAKI, 1998). Contudo, várias evidências mostram que esses agentes exercem seus efeitos citotóxicos principalmente por induzir apoptose nas células tumorais. O comprometimento do mecanismo de apoptose está relacionado com a imortalidade celular e carcinogênese. Dessa maneira, a indução de apoptose nas células neoplásicas é vital para o tratamento do câncer (TAN *et al.*, 2005).

Cerca de 5% dos cânceres são claramente hereditários, quando um gene defeituoso herdado predis põe a pessoa a um risco muito alto de desenvolver certos tipos de cânceres. O restante dos cânceres não é hereditário, mas resulta de mutações que ocorrem durante a vida, seja devido a fatores internos, como hormônios ou metabolismo de nutrientes no interior das células, ou devido a fatores externos, como tabaco, substâncias químicas e radiação solar (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 apontam que ocorrerão 466.730 novos casos de câncer, número válido também para o ano de 2009. À exceção do câncer de pele do tipo não-melanoma (115 mil novos casos estimados), os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata (49 mil) e de pulmão (27 mil) no sexo masculino e os cânceres de mama (49 mil) e de colo do útero (19 mil) no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2007).

1.3 Produtos naturais com atividade anticâncer

As plantas têm uma longa história de uso no tratamento de câncer. A procura por agentes anticâncer oriundos de plantas começou nos anos 50 com a descoberta e desenvolvimento dos alcalóides da vinca, vimblastina e vincristina (Figura 4), e o isolamento das podofilotoxinas citotóxicas (Figura 5). Como resultado, o Instituto Nacional do Câncer americano (NCI) iniciou um extenso programa de coleta de plantas em 1960, focalizado principalmente nas regiões temperadas. Isso levou à descoberta de novos grupos químicos, incluindo taxanos e camptotecinas, que apresentavam várias atividades citotóxicas, mas o seu desenvolvimento até agentes clínicos ativos levou um período de 30 anos, de 1960 a 1990. Em 1986, houve um resgate das coleções de plantas e de outros organismos com foco nas espécies de regiões tropicais e subtropicais do mundo (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Os primeiros agentes anticâncer derivados de plantas a serem introduzidos na clínica foram os chamados alcalóides da vinca, vimblastina (Figura 4) e vincristina (Figura 4), isolados da *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). Foram utilizados pela primeira vez como agentes anticâncer no final dos anos 60 e têm contribuído para remissões em longo prazo e cura de leucemias, câncer testicular e outros cânceres. Eles agem na β -tubulina e inibem a polimerização dos microtúbulos, impedindo a formação do fuso mitótico e a progressão da mitose, levando à morte celular. Alguns análogos menos tóxicos estão também em uso clínico

e os mais notáveis são vinorelbina (Figura 4) e vindesina (EFFERTH *et al.*, 2007; FAHY, 2001; CRAGG; NEWMAN, 2005).

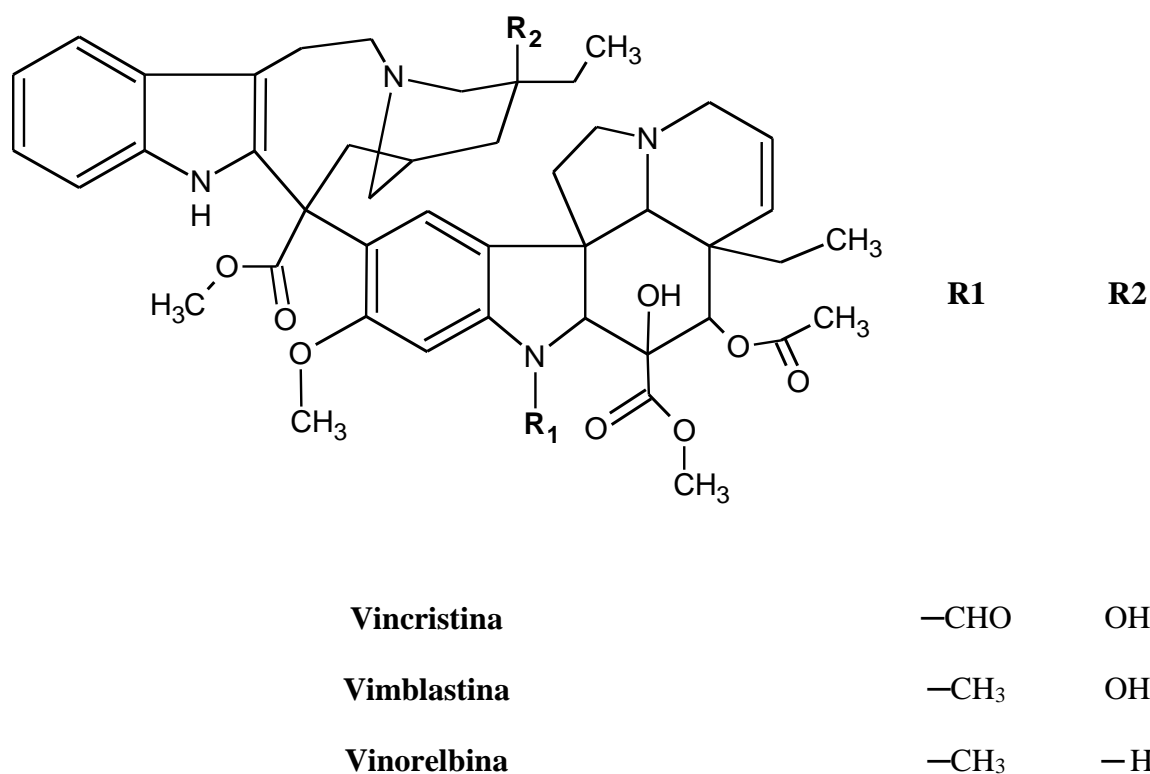


Figura 4 - Estrutura química da vincristina, vimblastina e vinorelbina

A podofilotoxina (Figura 5) foi identificada primeiramente na planta *Podophylum peltatum* (Berberidaceae). Ao contrário da *C. Roseus*, que não tinha uso medicinal para o tratamento de câncer, extratos da planta *P. peltatum* já eram utilizados pelos índios americanos para o tratamento de câncer de pele e verrugas (MANN, 2002). Contudo, devido à toxicidade da podofilotoxina, derivados semi-sintéticos foram produzidos. Etoposídeo e teniposídeo (Figura 5) são derivados semisintéticos da epipodofilotoxina (um isômero da podofilotoxina). Esses são inibidores clássicos da topoisomerase II, enzima participante do processo de duplicação do DNA e condensação dos cromossomos durante a divisão celular, e

estão em uso clínico para o tratamento de linfomas, câncer brônquico e câncer testicular (CRAGG; NEWMAN, 2005; EFFERTH *et al.*, 2007).

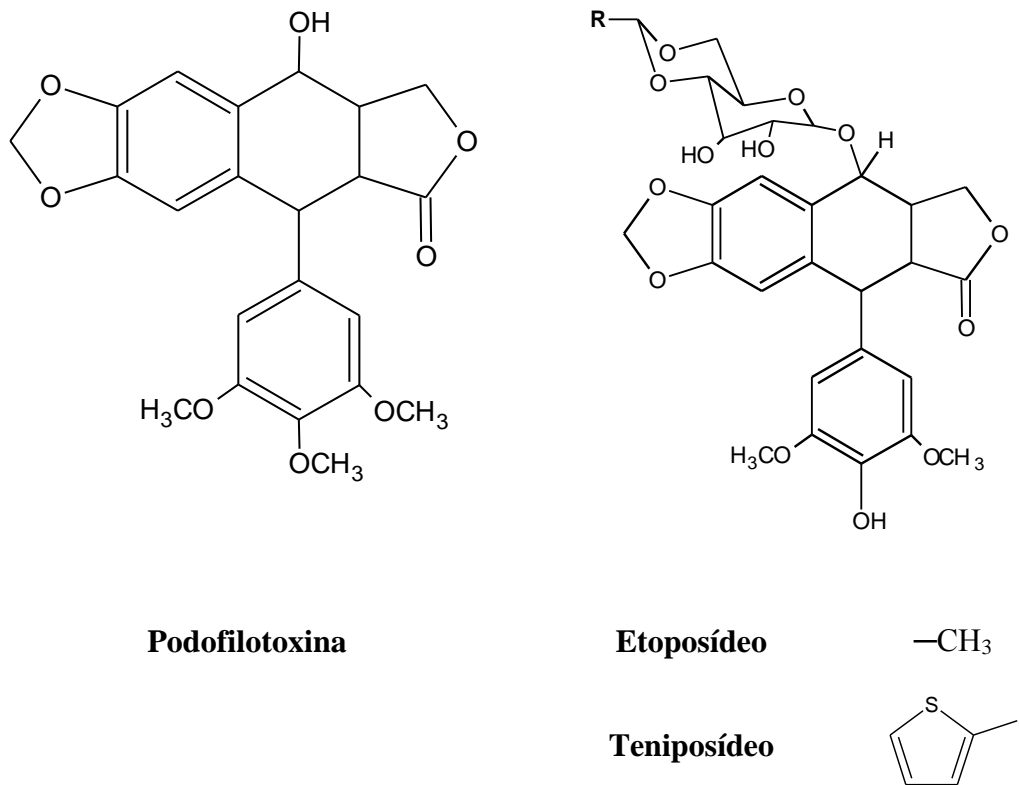


Figura 5 - Estrutura química da podofilotoxina, do etoposídeo e teniposídeo

Paclitaxel (Taxol[®], Figura 6) foi primeiramente isolado da casca da planta *Taxus brevifolia* (Taxaceae). Juntamente com vários precursores (exemplo: 10-deacetilbaccatin III), ocorrem nas folhas de espécies de *Taxus* e a conversão semi-sintética dos precursores a paclitaxel, bem como a análogos ativos do paclitaxel, como o docetaxel, tem fornecido uma importante fonte natural renovável desses compostos (EFFERTH *et al.*, 2007). Depois que o mecanismo de ação do paclitaxel foi primeiro reconhecido, paclitaxel e os seus análogos por mais de 15 anos foram os únicos compostos conhecidos que atuavam como estabilizadores de microtúbulos, ou seja, ao contrário dos alcalóides da vinca, eles impedem a despolimerização dos microtúbulos (ALTMANN, 2001). Paclitaxel é usado no tratamento de câncer de mama, ovário, e câncer de pulmão das não-pequenas células, enquanto que o docetaxel é usado para o tratamento de câncer de mama e câncer de pulmão das não-pequenas células. Atualmente,

23 taxanos estão em fase de estudo pré-clínico para o tratamento do câncer (CRAGG; NEWMAN, 2005). A potente atividade antimitótica do paclitaxel tem afirmado este composto como líder na quimioterapia do câncer (MYLES, 2003).

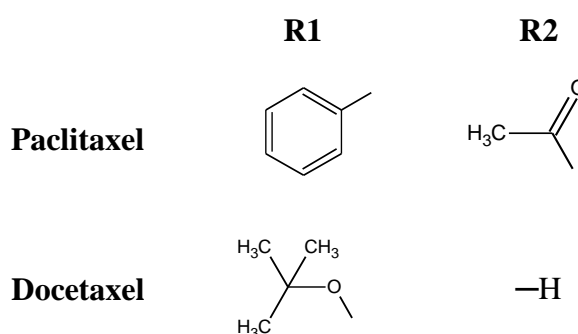
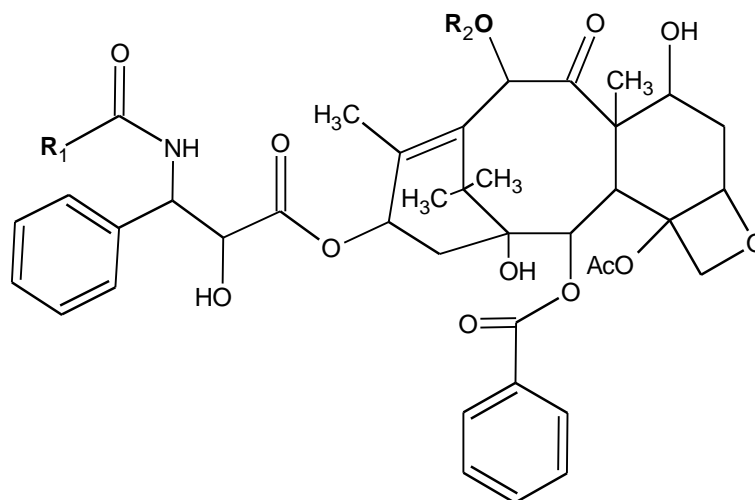
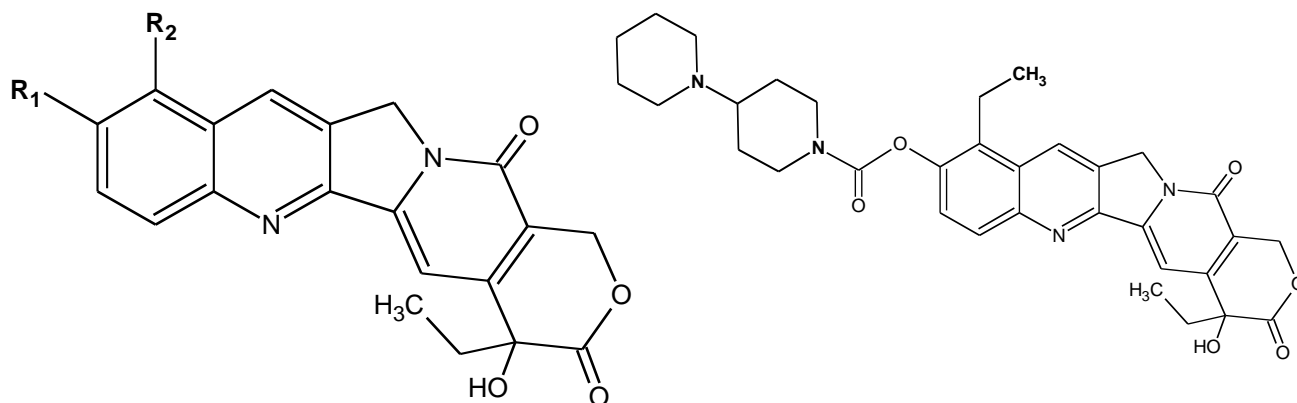


Figura 6 - Estrutura química do paclitaxel e docetaxel

Outra importante classe de compostos anticâncer clinicamente ativos é formada pelos derivados da camptotecina (Figura 7), composto isolado da planta *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). A camptotecina foi introduzida nos estudos clínicos pelo Instituto Nacional do Câncer americano na década de 70, mas foi retirada por causa da severa toxicidade renal que causava. Mais tarde, os derivados mais ativos topotecan (Figura 7) e irinotecan (Figura 7) foram desenvolvidos. Topotecan é utilizado no tratamento de câncer de

ovário e câncer de pulmão das não-pequenas células e o irinotecan é utilizado no tratamento de câncer coloretal (CRAGG; NEWMAN, 2005).



	R1	R2	Irinotecan
Camptotecina	-H	-H	
Topotecan	-H		

Figura 7 - Estrutura química da camptotecina, do topotecan e do irinotecan

Newman *et al.* (2007), do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, fizeram uma revisão de todos os agentes anticâncer desenvolvidos entre 1940 e 2006. As figuras 8 e 9 mostram que os 175 fármacos anticâncer efetivamente disponíveis para o Ocidente e Japão podem ser categorizados como biológicos (10%), produtos naturais (14%), derivados de produto natural (28%), totalmente sintéticos (24%), sintético/produto natural mimético (8%), síntese total (11%), síntese total/produto natural mimético (4%) e vacinas (1%) (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Usualmente, biológicos são formados por um longo peptídeo (>40 resíduos) ou proteína isolada de um organismo ou célula ou produzido por biotecnologia; os derivados de produto natural são, geralmente, modificações semi-sintéticas de um produto natural; sintéticos são totalmente sintéticos, descobertos com frequência por *screening* aleatório ou modificação de um agente já existente; os de síntese total são produzidos por síntese

completa, mas o grupo farmacofórico é ou foi de um produto natural (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Se os biológicos e vacinas forem removidos, reduzindo o número total de 175 para 155 (100%), o número de agentes inspirados em produtos naturais, isto é, N, ND, S/NM, S*, S*/NM, compreendem 113 (72,9%) (NEWMAN; CRAGG, 2007). Em artigos anteriores, a percentagem de agentes antitumorais não-sintéticos foi 62%, excluindo-se os biológicos e vacinas, sem a subdivisão “NM” (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997).

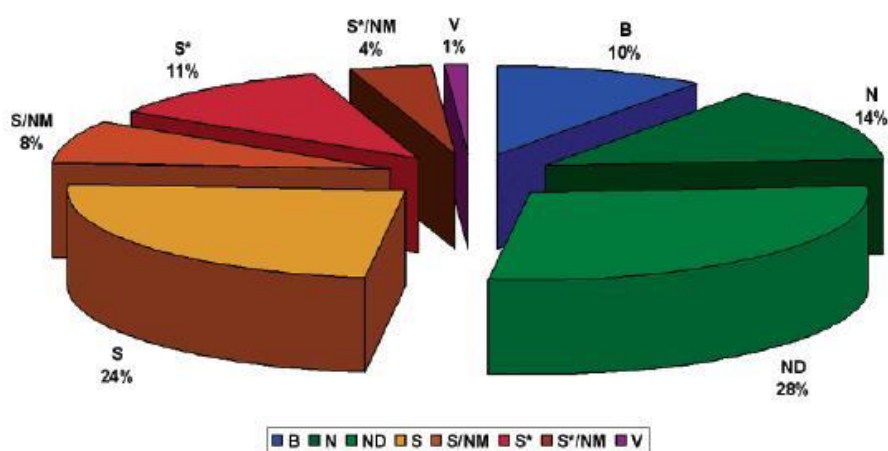


Figura 8 – Agentes anticâncer disponíveis, período de 1940 a 06/2006

Fonte: (NEWMAN; CRAGG, 2007)

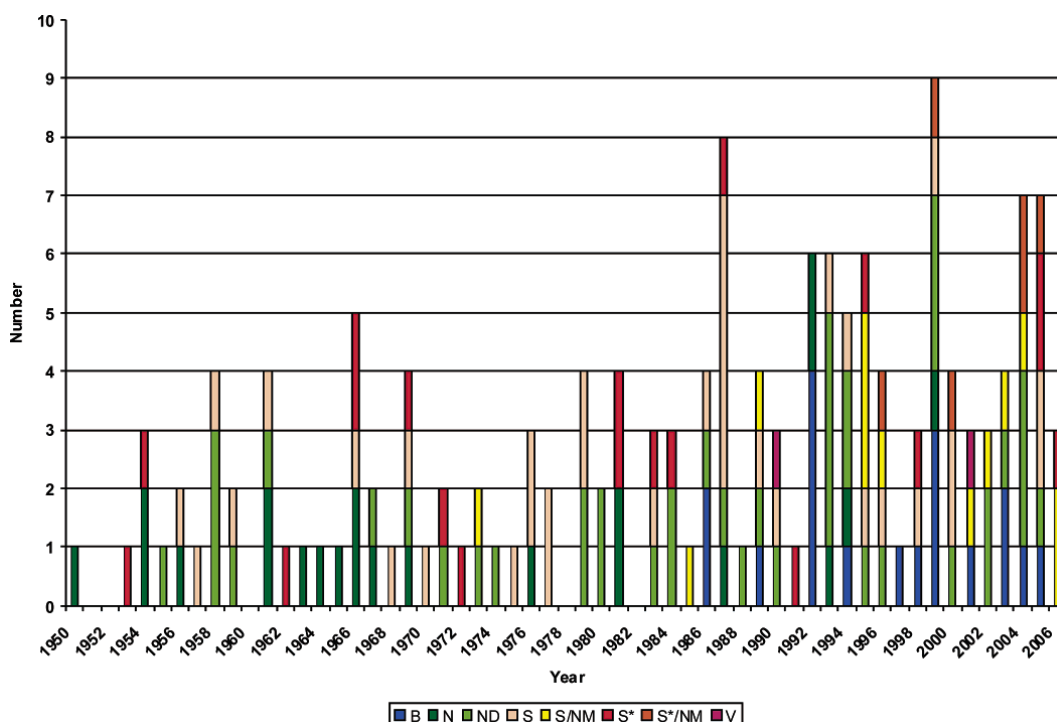


Figura 9 - Agentes anticâncer aprovados entre 1950 e 2006

Fonte: (NEWMAN; CRAGG, 2007)

Os gráficos acima realçam o contínuo papel que os produtos naturais e estruturas derivadas ou relacionadas a produtos naturais obtidos de todas as fontes vêm desempenhando no desenvolvimento do arsenal da terapia antitumoral disponível atualmente. Mostram ainda o importante papel que os produtos naturais continuam desempenhando apesar do atual número reduzido de programas de pesquisa com drogas baseadas em produtos naturais nas maiores casas farmacêuticas (NEWMAN; CRAGG, 2007).

1.4 Cucurbitacinas

A potente atividade fisiológica de plantas que pertencem à família Cucurbitaceae é conhecida desde a antiguidade. Elas eram temidas por conta de sua alta toxicidade, mas eram valorizadas por causa das propriedades medicinais a elas atribuídas. A utilização de cucurbitáceas data de tempos remotos. Gregos e romanos utilizaram, os doutores da Idade Média elogiavam suas virtudes e algumas plantas foram descritas na farmacopéia inglesa de 1914 (LAVIE; GLOTTER, 1971).

A toxicidade de plantas dessa família já foi citada como passagem bíblica no livro Reis II, capítulo 4, versículos 38 a 41: “Quando Eliseu voltou a Gálgala, a fome devastava a terra [...]. Foi um deles ao campo para colher legumes, e encontrou uma planta silvestre; colheu dela coloquíntidas* selvagens, encheu o manto, voltou para casa e cortou-as em pedaços dentro da panela da sopa, sem saber o que era. Serviu-se a refeição aos homens. Logo, porém, que provaram da sopa, puseram-se a gritar: Homem de Deus, a morte está na panela! E não puderam comer. Eliseu disse-lhes: Trazei-me farinha. Jogou farinha na panela e disse: Serve agora, para que todos comam. E não havia mais nada ruim na panela” (Milagre de Eliseu) (LAVIE; GLOTTER, 1971).

A família Cucurbitaceae possui cerca de 1280 espécies em 30 gêneros distribuídos principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a família é representada por 30 gêneros com um total aproximado de 200 espécies (BARROSO, 1978).

A família compreende membros utilizados na alimentação, como jerimum (*Cucurbita pepo*), melancia (*Citrullus lanatus*), maxixe (*Cucumis anguria*), melão (*Cucumis melo*) e pepino (*Cucumis sativus*) e, inclusive, na medicina popular brasileira como a “buchinha” (*Luffa operculata*), “taiuá” (*Cayaponia tayuya* e *Wilbrandia ebracteata*) (GONZALEZ; DI STASI, 2002; KAWAHARA *et al.*, 2001; PETERS; FARIAS; RIBEIRO-DO-VALE, 1997; RÍOS *et al.*, 1990).

Cayaponia tayuya é utilizada popularmente para o tratamento de sífilis, leptospirose, úlceras gástricas e suas raízes possuem forte ação analgésica e antiinflamatória. As raízes foram utilizadas com sucesso para o tratamento de reumatismo agudo e crônico (RÍOS *et al.*, 1990). Conforme a parte usada, *Momordica charantia* pode ser purgativa, antireumática, bactericida, antidiabética e utilizada nas afecções hepáticas (CORRÊA, 1984). Os frutos de *Luffa operculata* são potentes purgativos. O infuso diluído é usado em lavagens nasais, por aspiração, no tratamento de sinusites (BRAGA, 1976). As raízes de *Wilbrandia ebracteata* são amargas, purgativas, antisifílicas e utilizadas contra reumatismo e hidropisia (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000). As sementes de *Cucurbita pepo* são vermífugas; descascadas e frescas são dadas para crianças juntamente com leite de côco (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000). Finalmente, uma intrigante aplicação das cucurbitáceas é o combate à hiperglicemia.

* Referência à espécie de cucurbitácea *Citrullus colocynthis*, conhecida por suas propriedades purgativas.

O suco liofilizado dos frutos de *Cucurbita ficifolia*, por exemplo, tem sido utilizado com sucesso no tratamento de diabetes tipo 2 no México (ALARCON-AGUILAR *et al.*, 2002).

A planta *Cayaponia racemosa* é uma planta herbácea, trepadeira ou rastejante, comumente conhecida no Ceará como “guardião”. De acordo com Braga (1976), a raiz tuberosa, amarela e purgativa é empregada na hidropsia, opilação, prisão de ventre, amenorréia, epilepsia, lepra, sífilis, dermatoses e as folhas são usadas como cataplasma, como detersivas das úlceras e os frutos são depurativos eficazes na sífilis e nas dermatoses, fazendo desaparecer as dores no caso de reumatismo sífilítico (BRAGA, 1976). Avaliando as plantas medicinais da região nordeste do Brasil, Chaves e colaboradores (2007) reportaram os dados de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais de dois novos triterpenóides cucurbitanos isolados dos frutos de *C. racemosa*: $2\beta,3\beta,16\alpha,20(\text{R}),25$ -pentahidroxi-9-metil-19-norlanost-5-en-7,22-diona e $2\beta,3\beta,16\alpha,20(\text{R}),25$ -pentahidroxi-9-metil-19-norlanost-5-en-7,11,22-triona (CHAVES, 2007).

As cucurbitacinas parecem ser responsáveis pela maioria dos efeitos farmacológicos e biológicos das plantas citadas e de seus extratos. Quimicamente, as cucurbitacinas constituem um grupo diverso de compostos triterpenos tetracíclicos oxigenados os quais são bastante conhecidos pelo sabor amargo e pela toxicidade. Estruturalmente, são caracterizadas pelo esqueleto cucurbitano tetracíclico, chamado 19-(10 \rightarrow 9 β)-abeo-10 α -lanost-5-eno (Figura 10), com uma variedade de funcionalidades de oxigenação em diferentes posições. Tradicionalmente, as cucurbitacinas são arbitrariamente divididas em 12 categorias, sendo classificadas de acordo com as funcionalidades no anel A, modificações na cadeia lateral e considerações estereoquímicas, incorporando cucurbitacinas de A-T (CHEN *et al.*, 2005).

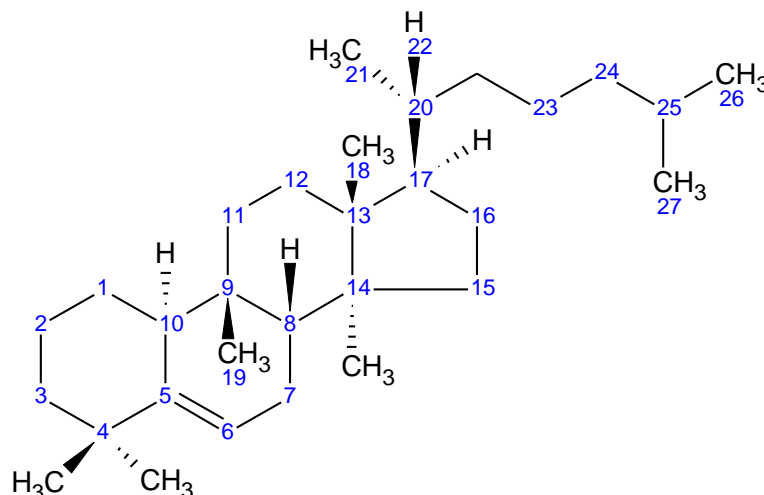


Figura 10 - Estrutura química do esqueleto cucurbitano [19-(10→9β)-abeo-10α-lanost-5-eno]

Existem cerca de 50 cucurbitacinas descritas. Elas estão presentes em plantas na forma glicosídica ou como agliconas livres. A mais comum das formas livres é a cucurbitacina B (DINAN; HARMATHA; LAFONT, 2001).

As cucurbitacinas foram inicialmente isoladas da família Cucurbitaceae, e mais tarde foram encontradas em plantas de Brassicaceae (SACHDEV-GUPTA; RADKE; RENWICK, 1993), Cruciferae (DINAN *et al.*, 1997), Datisceae (LAVIE; GLOTTER, 1971), Elaeocarpaceae (FANG *et al.*, 1984), Scrophulariaceae (MUSZA *et al.*, 1994; SMIT *et al.*, 2000), Euphorbiaceae (SACHDEV-GUPTA; RADKE; RENWICK, 1993), Rosaceae (SARKER *et al.*, 1999) e Thymelaeaceae (FULLER *et al.*, 1994) entre outras.

Há muito tempo as cucurbitacinas são bem conhecidas por seu amargor, e despertaram a atenção por exercerem potentes atividades biológicas (DINAN *et al.*, 1997; MARTIN *et al.*, 2002; METCALF, 1980; SACHDEV-GUPTA; RADKE; RENWICK, 1993), com destaque para sua toxicidade e propriedades anticâncer (BEUTLER *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2005; DANTAS *et al.*, 2006; DUNCAN *et al.*, 1996; JAYAPRAKASAM; SEERAM; NAIR, 2003; RAO *et al.*, 1991). Particularmente nos anos 60, as cucurbitacinas foram importantes alvos de pesquisa dentro da comunidade da química medicinal e da descoberta de drogas na perspectiva de desenvolvimento de drogas anticâncer (CHEN *et al.*, 2005).

A atividade farmacológica de plantas, extratos brutos e frações purificadas obtidos de espécies contendo cucurbitacinas já foi reportada em vários trabalhos (RÍOS *et al.*, 2005).

Ahmed *et al.* (2001) estudaram os efeitos hepatoprotetivos de extratos dos frutos de *Luffa echinata* em ratos com hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄). O grau de proteção foi determinado por parâmetros bioquímicos como transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP), fosfatase alcalina (FAL), proteínas totais (PT) e albumina total (AT). O CCl₄ aumentou a atividade de TGO, TGP, FAL e AT enquanto que reduziu a quantidade de PT. A administração dos diferentes extratos de *L. echinata* na dose de 250mg/Kg preveniu a elevação de TGO, TGP, FAL e AT induzida pelo CCl₄ e redução de PT. Os extratos de éter de petróleo, de acetona e de metanol reduziram a TGO de 27,6, 45,6, 38,4%, enquanto que a TGP foi de 30,8, 35,2 e 48,4% e a FAL foi de 36,0, 30,0 e 29,53%, respectivamente, sendo o extrato acetônico o mais potente no caso da TGO, o metanólico no caso da TGP e o extrato de éter de petróleo no caso da FAL. Por outro lado, a porcentagem de PT foi aumentada e a de AT foi reduzida pelos diferentes extratos (AHMED; SLAM; KHAN, 2001).

Em um estudo de Peters *et al.* (1997), duas cucurbitacinas foram isoladas da planta *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) e avaliadas quanto ao potencial antiinflamatório no modelo de edema de pata induzido por carragenina. As cucurbitacinas B e E (1mg/kg) (Figura 11) reduziram significativamente o edema após administração intraperitoneal (i.p.), inibindo o edema em 61% e 58%, respectivamente. O mecanismo de ação não foi estudado, mas levantou-se a hipótese de que ocorria inibição da síntese dos produtos da enzima ciclooxigenase (COX) (PETERS; FARIAS; RIBEIRO-DO-VALE, 1997).

Os compostos acima juntamente com as cucurbitacinas D e I (Figura 11) foram isolados dos frutos de *Cucurbita andreana* (Cucurbitaceae) e estudados por Jayaprakasam *et al.* (2003) para avaliar a atividade antiinflamatória através da inibição das enzimas COX-I e COX-II. Os compostos inibiram seletivamente a enzima COX-II (cucurbitacina B: 32%, cucurbitacina D: 29%, cucurbitacina E: 35% e cucurbitacina I: 27%). Foi mostrado que a ausência do grupo acetila no carbono 28 nas cucurbitacinas D e I reduziu a atividade inibitória comparando com as cucurbitacinas B e E, que possuem tal grupamento e apresentaram maior atividade (JAYAPRAKASAM; SEERAM; NAIR, 2003).

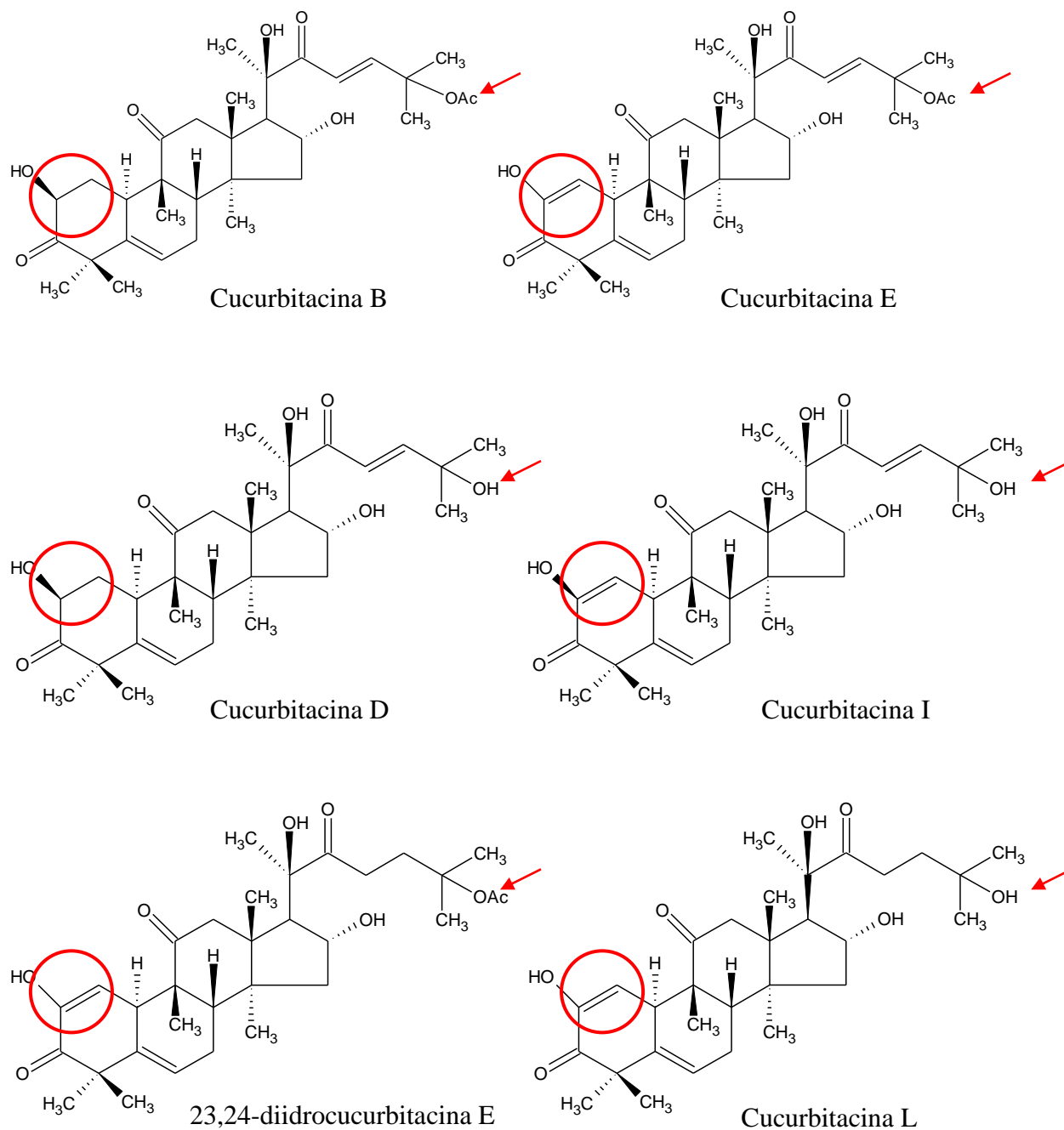


Figura 11 - Estrutura química das cucurbitacinas B, D, E, I e L (ou 23,24-dihidrocurbitacina I) e 23,24-dihidrocurbitacina E

Do extrato clorofórmico das raízes de *Cayaponia tayuya* estudado por Ríos *et al.* (1990), foram obtidas a 23,24-dihidrocurbitacina B (ou diidrocurbitacina B) e a cucurbitacina R (ou 23,24-dihidrocurbitacina D) (Figura 12), as quais foram estudadas para avaliação da atividade antiinflamatória (RECIO *et al.*, 2004). Ambas demonstraram forte atividade nos vários modelos experimentais apresentados. Contudo, a cucurbitacina R

apresentou maior atividade em todos os experimentos, exceto no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Mostrou inibição de 61% do edema de pata induzido por fosfolipase A₂ (3mg/kg, i.p.), de 36% do edema de orelha induzido por TPA (4mg/kg) por via oral e de 87% (0,1mg/orelha) administrada topicamente. O mecanismo de ação da cucurbitacina R não foi determinado, mas acredita-se que ela não afeta a atividade da 5-lipoxigenase, nem PLA₂, e nem age sobre o receptor de glicocorticóide. A diidrocurcubitacina B exibiu um padrão de atividade parecido com a cucurbitacina R, exceto no teste da carragenina, no qual a primeira foi claramente mais ativa (46% de redução) (RECIO *et al.*, 2004).

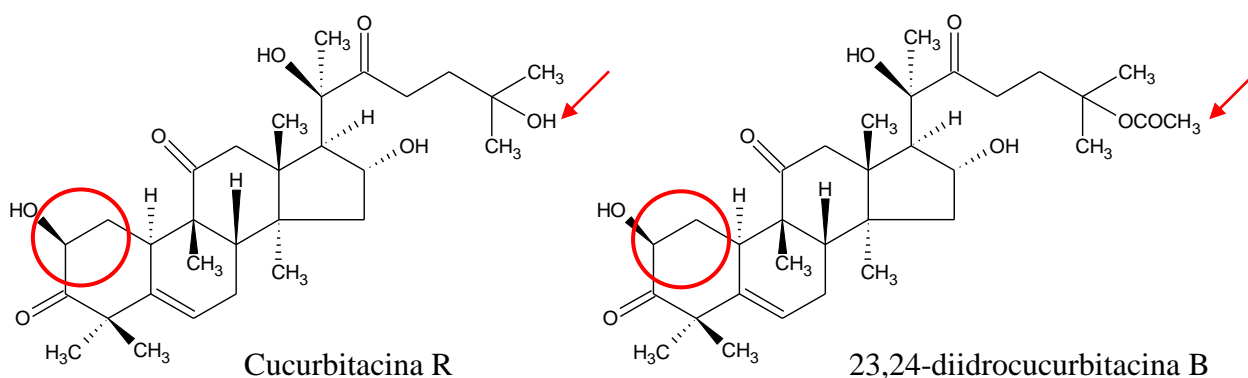


Figura 12 - Estrutura química da cucurbitacina R (23,24-diidrocucurbitacina D) e 23,24-diidrocucurbitacina B

Uma das maiores prioridades da pesquisa com cucurbitacinas tem sido a prospecção dos efeitos citotóxicos e anticâncer desses compostos. Isso se deve ao fato de que elas geralmente são consideradas de alta toxicidade, presumivelmente também para as células tumorais (RÍOS; ESCANDELL; RECIO, 2005).

Almeida *et al.* (1992) testaram a fração purificada do rizoma de *Wilbrandia* sp. e demonstraram não somente que a fração inibia células KB (carcinoma epidermóide oral) numa concentração efetiva (EC₅₀) de 12µg/mL, mas também que ela reduziu o tamanho relativo do tumor de ratos inoculados com carcinoma de Walker 256 em 75% (ALMEIDA; RAO; MATOS, 1992; RAO *et al.*, 1991).

Em outro trabalho, Jayaprakasam *et al.* (2003) isolaram as cucurbitacinas B, D, E e I (Figura 11) dos frutos de *Cucurbita andreana* e também testaram a atividade citotóxica desses compostos em linhagens tumorais: HCT-116 (cólon), MCF-7 (mama), NCI-H460

(pulmão) e SF-268 (sistema nervoso central). Todos os compostos foram ativos na concentração de 0,4 μ M, com a atividade contra HCT-116 variando de 82% para cucurbitacina B a 65% para cucurbitacina I. Cucurbitacina B foi a mais ativa nas 4 linhagens tumorais, com porcentagens de inibição de 82%, 87%, 96% e 92% de HCT-116, MCF-7, NCI-H460 e SF-268, respectivamente. Em contraste, a cucurbitacina I foi a menos ativa contra as linhagens tumorais. Já que essas cucurbitacinas mostraram-se inibidoras da COX-2 em outros ensaios, e já que já foi observado que há superexpressão de COX-2 em diferentes tipos de linhagens tumorais, os autores sugeriram que a capacidade desses compostos de inibir o mecanismo da COX-2 estava implicada no mecanismo de citotoxicidade observada (JAYAPRAKASAM; SEERAM; NAIR, 2003).

Adicionalmente, as cucurbitacinas B, E e I (Figura 11) juntamente com as diidrocucurbitacinas B e E (Figuras 11 e 12), apresentaram potente atividade citotóxica contra as linhagens tumorais NUGC-3 (carcinoma gástrico), HONE-1 (carcinoma nasofaríngeo), MCF-7 (carcinoma de mama) e A549 (carcinoma de pulmão) no trabalho de Wu *et al.* (2004).

As proteínas STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição) possuem papel duplo na transdução dos sinais e agem tanto como proteínas citoplasmáticas sinalizadoras, como fatores de transcrição nuclear. Após a ativação através de receptores com atividade tirosinase quinase, STAT fosforiladas se dimerizam e movem-se para o núcleo para induzir expressão de genes essenciais aos eventos celulares fisiológicos normais. A ativação persistente de STATs, particularmente STAT-3, está implicada na patogênese de diversas malignidades (BLASKOVICH *et al.*, 2003; KESTER *et al.*, 2008). Várias evidências apontam que alguns membros da família STAT estão implicados na transformação de células normais em malignas e na sobrevivência das células tumorais (GARCIA; JOVE, 1998). A redução dos níveis de STAT-3 fosforilada causada pela cucurbitacina I (Figura 11) já foi reportada em vários em várias linhagens tumorais *in vitro* (BLASKOVICH *et al.*, 2003; SHI *et al.*, 2006).

Trabalhos anteriores com células Sz (linfoma de células T), ALK⁺ALCL (linfoma anaplásico de grandes células linfoma anaplásico quinase positivo), NIH 3T3 (fibroblastos de embrião de camundongo) transformadas e A549 (adenocarcinoma de pulmão) demonstraram que a inibição de STAT-3 fosforilada causada pela cucurbitacina I resulta em redução da expressão de genes alvos da STAT-3 e em apoptose dessas células (BLASKOVICH *et al.*, 2003; SHI *et al.*, 2006; KESTER *et al.*, 2008).

Recentemente, foi elucidado um mecanismo pelo qual a cucurbitacina B induz apoptose em células Hep-2 (carcinoma laríngeo). O composto induziu parada do ciclo celular

em G2/M e apoptose após 24h de tratamento (0,1, 1,0 e 10 μ M) através da supressão da ativação do STAT-3, relevante para regulação do ciclo celular e apoptose, além de reduzir a expressão de genes alvos do STAT-3, como *ciclina B1* e *bcl-2* (LIU *et al.*, 2008a). Por outro lado, Haritunians *et al.* (2008) avaliaram o efeito antiproliferativo das cucurbitacinas B e D (Figura 11) em um painel de linhagens tumorais hematopoiéticas humanas. Nesse *screening* inicial, os efeitos da cucurbitacina B sobre as células foram maiores que os da cucurbitacina D. Em seguida, a habilidade da cucurbitacina B em induzir expressão de CD11b e CD14 foi avaliada por citometria de fluxo. Esses antígenos de membrana são expressos durante a diferenciação celular granulocítica e monocítica, respectivamente. Em 4 dias de exposição ao composto (0,5 μ M), células HL-60 e U-937 apresentaram um aumento de 30 e 70% na expressão de CD11b, respectivamente. Além disso, o composto causou parada do ciclo celular na fase S e alterações morfológicas nas células HL-60, como aumento do tamanho e multinucleação, embora não tenha causado apoptose mesmo após 72h de incubação com as células (HARITUNIANS *et al.*, 2008).

A adesão celular consiste num processo de vários estágios mediado por várias moléculas de adesão. Inibidores da adesão celular mediada por integrina podem, portanto, apresentar potencial terapêutico antiinflamatório (MUSZA *et al.*, 1994). Musza *et al.* (1994) estudaram a inibição da adesão e do crescimento de células JY (linhagem de linfócitos transformados) pelas cucurbitacinas B, D, E, I, L (Figuras 11) e R (Figura 12). No ensaio da inibição da adesão celular, cucurbitacinas E e B foram as mais ativas com concentrações inibitórias submicromolares, enquanto que as cucurbitacinas I e D foram 5 vezes menos ativas que E e B, respectivamente. Cucurbitacinas L (ou 23,24-diidrocurcurbitacina I) e R não apresentaram atividade (MUSZA *et al.*, 1994).

Nesse trabalho, observou-se que a cadeia lateral possuía um papel importante em vários aspectos da atividade farmacológica de cucurbitacinas e pequenas modificações estruturais na cadeia lateral, mas não no anel A, afetava marcadamente a potência de inibição celular. As moléculas com uma dupla ligação entre os carbonos 23 e 24 (cucurbitacina I: CI_{50} 0,95 μ M e cucurbitacina D: CI_{50} 1,36 μ M) exibiam maior citotoxicidade e também inibição da adesão celular quando comparadas com aquelas que não possuíam a dupla ligação (Cucurbitacina L: CI_{50} > 50 μ M e cucurbitacina R: CI_{50} > 50 μ M) (RÍOS; ESCANDELL; RECIO, 2005). Em adição, estudos de Duncan *et al.* (1996) com as cucurbitacinas B, D, E, I, K, P e Q (Figuras 11 e 13), revelaram que somente K e P não apresentaram atividade citotóxica contra a linhagem tumoral PC-3 (carcinoma da próstata). Consequentemente, os

autores postularam que a ausência da ligação dupla entre os carbonos 23 e 24 (cucurbitacina K e P) e do grupo hidroxila no carbono 24 diminuía a citotoxicidade (DUNCAN *et al.*, 1996).

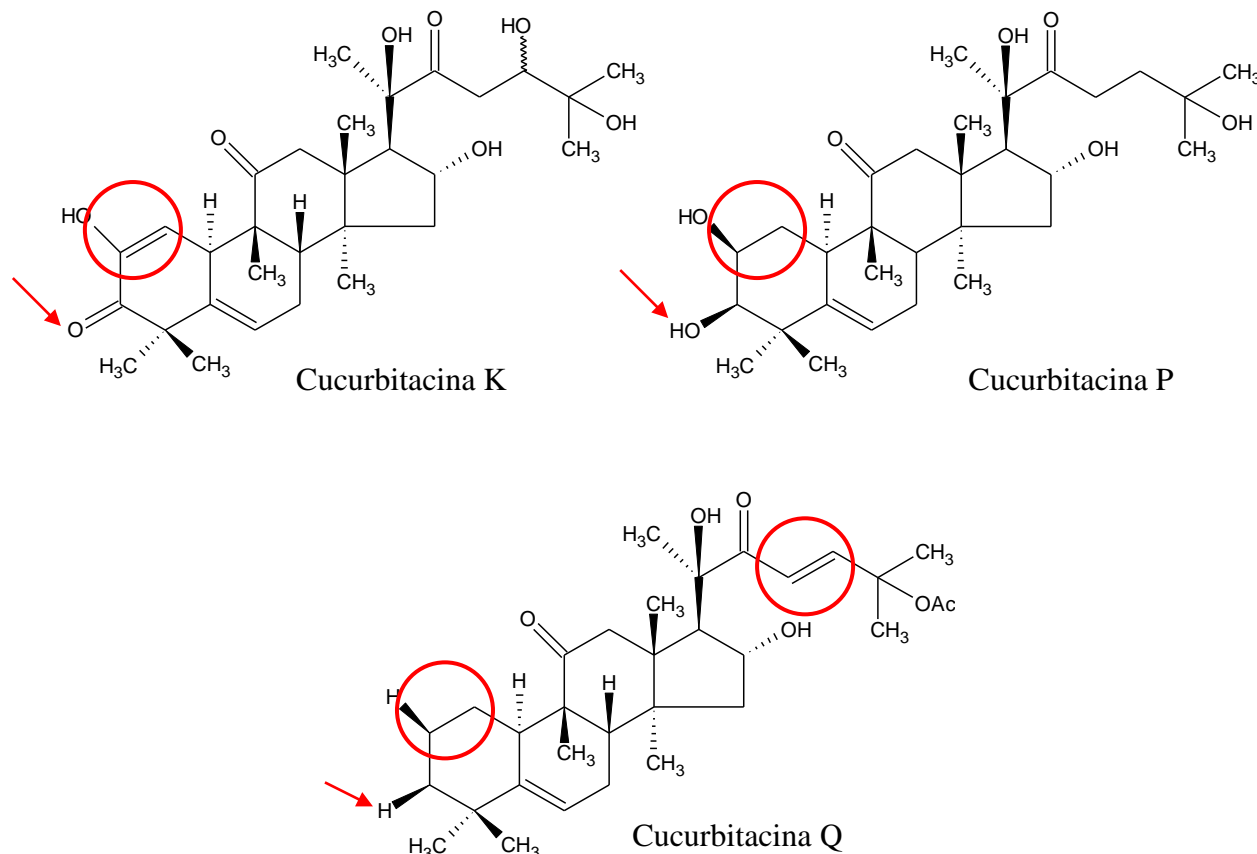


Figura 13 - Estrutura química das cucurbitacinas K, P e Q

Ito *et al.* (2002) isolaram as cucurbitacinas D e F (Figuras 11 e 14) de *Elaeocarpus mastersii* e estudaram a citotoxicidade sobre várias linhagens tumorais humanas. Com valores de concentração inibitória (ED_{50}) variando de 0,01 a 0,06 $\mu\text{g/mL}$, dependendo da linhagem, a cucurbitacina D foi bastante citotóxica, comparada com a cucurbitacina F, com valores variando de 0,1 a 1,9 $\mu\text{g/mL}$ (ITO *et al.*, 2002).

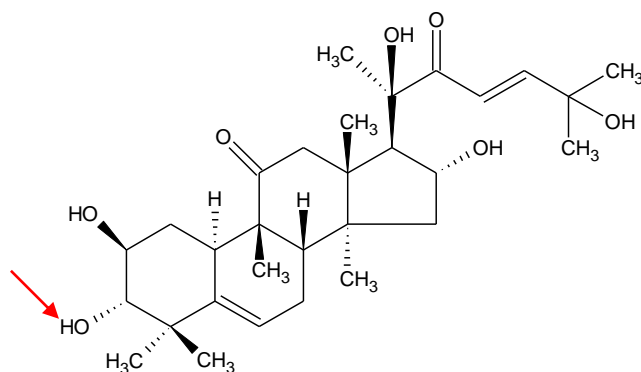


Figura 14 - Estrutura química da cucurbitacina F

Smit *et al.* (2000) isolaram de *Picrorhiza scrophulariaeflora* duas cucurbitacinas, picracina e deacetilpicracina (Figura 15), e reportaram a potente atividade inibitória desses compostos sobre a proliferação de linfócitos T estimulados. Os dois compostos apresentaram CI_{50} de $1\mu M$. Dois outros ensaios foram realizados para determinar se a atividade inibitória encontrada poderia ser decorrente de efeitos citotóxicos. Através da coloração com diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídeo foi achado uma pequena fração de morte celular ($<10\%$) para concentrações menores que $60\mu M$. O outro experimento, utilizando a lactato desidrogenase (LDH), mostrou que os compostos não causaram citotoxicidade em concentrações de até $50\mu M$ para as duas cucurbitacinas. Essas concentrações são muito mais altas que a CI_{50} encontrada para os dois compostos ($1\mu M$). É possível concluir que a atividade inibitória da picracina e da deacetilpicracina não pode ser atribuída a efeitos citotóxicos. O achado fornece base para o uso racional de *P. scrophulariaeflora* na China, Índia, no Nepal e Tibet para o tratamento de doenças como asma e artrite. Os autores sugerem que o mecanismo de ação dos compostos pode incluir interferência com o citoesqueleto e subsequente inibição da transdução de sinais envolvidos na proliferação celular, levando à inibição da proliferação de linfócitos T (SMIT *et al.*, 2000).

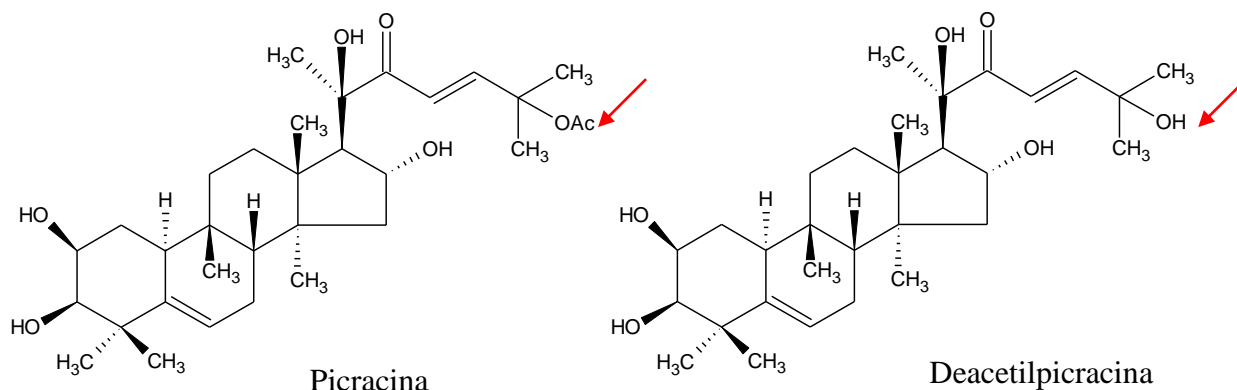


Figura 15 - Estrutura química da picracina e deacetylpicracina

Embora a toxicidade das cucurbitacinas seja conhecida há muitos anos, muito pouco é conhecido sobre o mecanismo do efeito nos níveis celular e molecular, o que explica, em termos relativos, o pouco avanço na descoberta de medicamentos anticâncer com base nesses produtos naturais (CHEN *et al.*, 2005).

Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, foi avaliado o potencial citotóxico das cucurbitacinas isoladas de *Cayaponia racemosa* (Figura 16), cucurbitacina P, deacetylpicracina e $2\beta,3\beta,16\alpha,20(R),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona (Figura 17), em células HL-60 (leucemia promielocítica humana), B16 (melanoma murino), MCF-7 (mama), HCT-8 (carcinoma de cólon humano) e CEM (leucemia linfocítica humana) (DANTAS *et al.*, 2006). Os resultados mostraram que a cucurbitacina P apresentou valores de CI_{50} variando de 0,64 a 1,71 $\mu\text{g/mL}$, sendo a mais ativa, sendo seguida das cucurbitacinas $2\beta,3\beta,16\alpha,20(R),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona (1,35 a 3,58 $\mu\text{g/mL}$) e deacetylpicracina (2,31 a 7,68 $\mu\text{g/mL}$). O ensaio de letalidade em náuplios de *Artemia* sp. também ressaltou a toxicidade desses compostos com CL_{50} (concentração capaz de matar 50% dos náuplios em um período de tempo) variando de 29,6 $\mu\text{g/mL}$ para a cucurbitacina P a 38,8 $\mu\text{g/mL}$ para a cucurbitacina $2\beta,3\beta,16\alpha,20(R),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona, sendo que a deacetylpicracina não apresentou toxicidade nesse ensaio ($CL_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$). Nesse mesmo trabalho, a atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos e a atividade antimetabólica em ovos de ouriço-do-mar também foram avaliadas. No entanto, não se observou efeito significativo nesses ensaios, sugerindo um mecanismo de ação diferente para essas substâncias em relação a agentes citotóxicos já descritos (DANTAS *et al.*, 2006; MONTENEGRO *et al.*, 2004;

VASCONCELLOS *et al.*, 2005). Desta maneira, o presente trabalho visa aprofundar os estudos do potencial anticâncer destes compostos utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades anticâncer de três cucurbitacinas obtidas da planta *Cayaponia racemosa* em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade das cucurbitacinas às células mononucleadas de sangue periférico humano;
- Avaliar o mecanismo de ação anticâncer *in vitro* das cucurbitacinas utilizando a linhagem tumoral HL-60 como modelo;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* das cucurbitacinas isoladas e em associação com o quimioterápico 5-fluorouracil em camundongos *Mus musculus* Swiss transplantados com o tumor Sarcoma 180.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais utilizados

3.1.1. Equipamentos

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2

Agitador de tubo, Donner AD 8850

Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di

Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212

Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403

Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206

Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte Mini system

Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter

Fluxo laminar, VECO

Incubadora de células, (CO2 Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow

Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070

Microondas, Panasonic

Microscópio de fluorescência, Olympus Modelo BX41

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot

Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab

Micrótomo, SLEE Mainz

pHmetro, Micronal B474

Pipetas automáticas, Gilson

3.1.2 Soluções, reagentes e fármacos

Quadro 1 – Soluções, reagentes e fármacos

Ácido Acético	32 N	REAGEN
Ácido Clorídrico	0,1 N	VETEC
Acetato de etila	-	MERK
Alamar blue	-	SIGMA
Anticorpo Anti – BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU	SIGMA
	BSA 5% q.s.p. 500 µL de solução	DAKO
Anticorpo secundário Biotinilado	1 µL de anticorpo biotilado	DAKO
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan	SIGMA
	PBS q.s.p. 100 mL de solução	-
BrdU	10mM	SIGMA
Citrato de Sódio	-	GRUPO QUÍMICA
Cloreto de Sódio (NaCl)	-	LABSYNTH
Diaminobenzidina (DAB)	5 µL de DAB	IMMUNOTECH
	1 mL de Tris-Hcl (Tris 0,05M) pH=7,6	PROQUIMIOS
	2 µL de H ₂ O ₂	PROQUIMIOS
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	VETEC
Doxorrubicina	-	SIGMA
Eosina 0,5%	0,5 g de Eosina	DOLES
	80 mL de Álcool etílico	

	0,5 mL de Ácido acético	
	20 mL de H ₂ O	-
Estreptavidina-peroxidase	1 µL de Estreptavidina - peroxidase	DAKO
	BSA 5% q.s.p. 100 µL de solução	DAKO
Ficoll	-	SIGMA
Fitohemaglutinina	-	SIGMA
Formaldeído 10 %	100 mL de formaldeído	DINÂMICA
	H ₂ O q. s. p. 1 L	
Hematoxilina 0,1%	7,0 g de Hematoxilina	VETEC
	50 mL de Álcool absoluto	VETEC
	100 g de Alúmen de potássio	VETEC
	2,5 g Óxido amarelo de mercúrio	VETEC
	H ₂ O q.s.p. 950 mL de solução	-
Iodeto de propídeo 50 µg/mL	5 mg de iodeto de propídeo	SIGMA
	PBS q.s.p. 50 mL	
Laranja de Acridina	1g de laranja de acridina (100µg/mL)	FLUKA
	H ₂ O q.s.p. 10mL de solução	-
Meio de cultura para células RPMI 1640	Diluído em água deionizada, filtrado em filtro millipore (0,22 µm) e complementado com SBF 10 %, 1 % de glutamina, 1 % de antibióticos, 1 % de bicarbonato de sódio (0,75 %) e 25 mM de HEPES	CULTILAB
Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL	CULTILAB
	Estreptomicina 10 mg/mL	CULTILAB
Ringer-lactato	Cloreto de Sódio = 0,600g	LABORATÓRIOS

	Cloreto de Potássio = 0,030g	BIOSINTÉTICA
	Cloreto de Cálcio 2H ₂ O = 0,020g	
	Lactato de Sódio = 0,30g	
	Água q.s.p. 100 mL	
Rodamina 123	-	SIGMA
	Cloreto de sódio 1,5 M	LABSYNTH
SSC 10X	Citrato de sódio 0,15 M	GRUPO QUÍMICA
	H ₂ O	-
Sulfato de Gentamicina	-	GENTAMICIN NOVAFARMA
Soro fetal bovino	-	CULTILAB
	8,766 g de Cloreto de sódio	LABSYNTH
Tampão fosfato (PBS)	2,14 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O	LABSYNTH
	0,276 g de NaHPO ₄ .H ₂ O	LABSYNTH
	H ₂ O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	-
	Cloreto de sódio 1,5 M	LABSYNTH
Tampão Tris (TBS) 10X	Tris 0,5 M (pH= 7,6)	PROQUÍMIOS
	H ₂ O	-
	50mL de Tripsina 2,5%	CULTILAB
Tripsina 0,25%	0,125g de EDTA	PROQUÍMIOS
	450mL de PBS	-
Triton X -100	-	ISOFAR
	100 mL de formaldeído	
Xilol 10 %	H ₂ O q.s.p. 1L	DINÂMICA

5- Fluorouracil	2,5 mg/mL	ICN FARMACÊUTICA
-----------------	-----------	---------------------

3.1.3 Modelos biológicos

Camundongos *Mus musculus* da linhagem Swiss

Linhagens tumorais mantidas em cultura

Células mononucleadas de sangue periférico isoladas de voluntários sadios

3.2 Metodologia Experimental

3.2.1 Obtenção das cucurbitacinas de *Cayaponia racemosa*

A extração e o isolamento dos compostos foram realizados no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará sob a supervisão do Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte.

Cayaponia racemosa Cogn. foi coletada em Ipueiras e Baturité-CE, onde é vulgarmente chamada de “guardião”. Os frutos coletados em Ipueiras foram secos e submetidos à extração com hexano e etanol sucessivamente à temperatura ambiente. O extrato etanólico (30,7g) forneceu uma fração (4,2g) eluída com acetato de etila proveniente de uma coluna filtrante denominada CRF. CRF (650mg) foi submetida a uma cromatografia de média pressão (flash), (60% e 40%), que foi acompanhada através de placa cromatográfica (TLC) e, em seguida, reunidas de acordo com a sua pureza. Portanto, através do tratamento cromatográfico, foram isoladas duas cucurbitacinas denominadas CRF-PIR5 e CRF-FF1 (Figura 19).

Os frutos coletados em Baturité foram secos e submetidos à extração com hexano e etanol sucessivamente à temperatura ambiente. O extrato etanólico (20,4g) forneceu uma fração (1,5g) eluída com acetato de etila, proveniente de uma coluna filtrante e que

posteriormente foi recromatografada por placa preparativa isolando a cucurbitacina denominada CRF-F1 (Figura 17).

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C exibiu trinta sinais indicando que CRF-F1, CRF-PIR5 e CRF-FF1 tratavam-se de metabólitos de natureza triterpenoidal. Esta análise e a comparação com os espectros de RMN H^1 e C^{13} registradas na literatura permitiu propor a constituição estrutural para CRF-F1 ($2\beta,3\beta,16\alpha,20(\text{R}),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5,23(E)-dien-22-ona, Deacetilpicracina), CRF-PIR5 ($2\beta,3\beta,16\alpha,20(\text{R}),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona) e CRF-FF1 ($2\beta,3\beta,16\alpha,20(\text{R}),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-11,22-diona, Cucurbitacina P).

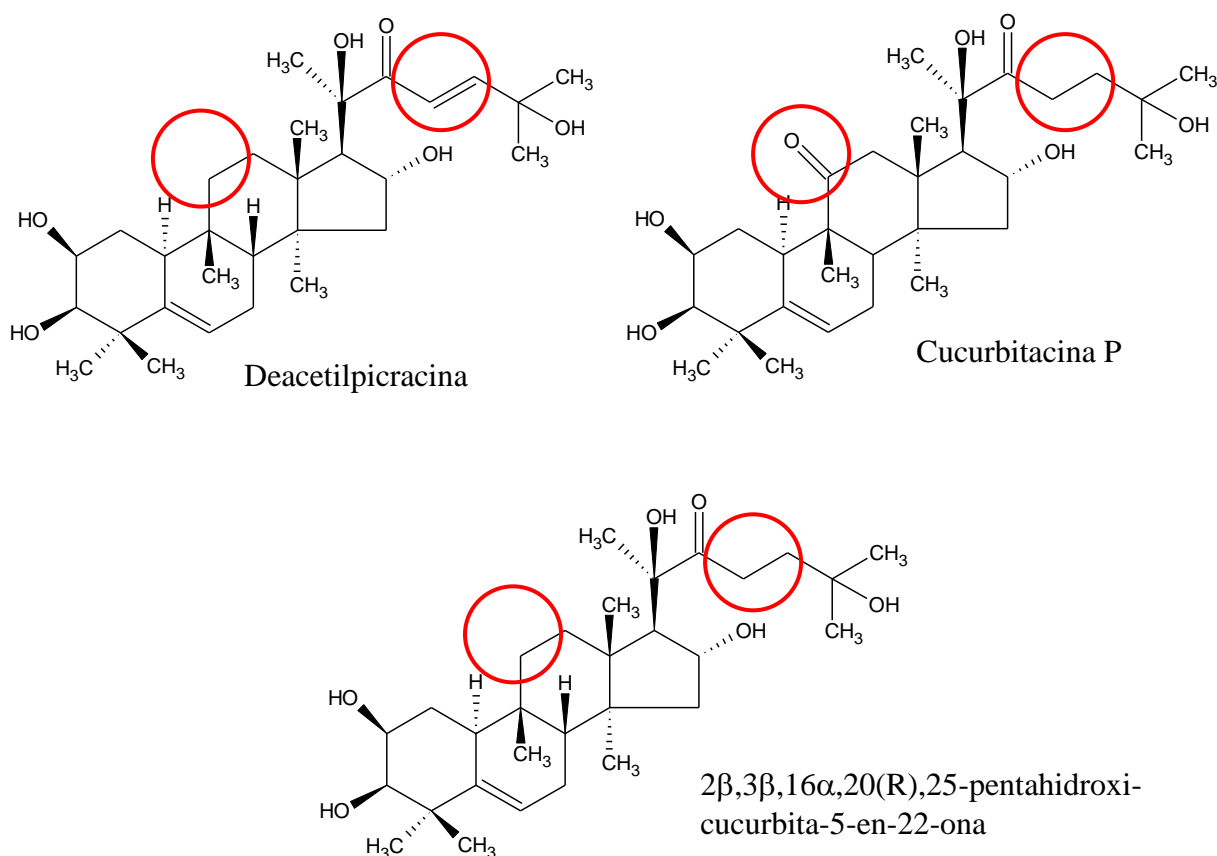


Figura 16 - Estrutura química de $2\beta,3\beta,16\alpha,20(\text{R}),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5,23(E)-dien-22-ona (Deacetilpicracina), $2\beta,3\beta,16\alpha,20(\text{R}),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-11,22-diona (Cucurbitacina P) e $2\beta,3\beta,16\alpha,20(\text{R}),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona

3.2.2 Estudo da atividade citotóxica das cucurbitacinas

3.2.2.2 Avaliação da atividade antiproliferativa em células mononucleadas do sangue periférico - Método do Alamar Blue

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos teste sobre a proliferação de células normais, o ensaio do alamar blue foi realizado utilizando células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC - *peripheral blood mononuclear cell*), após 72 horas de exposição com os compostos teste. O alamar blue, recentemente identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.*, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como os outros sais de tetrazólio, o alamar blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não-fluorescente/célula não-viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A redução do alamar blue reflete a proliferação celular.

As células foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis. As células foram isoladas a partir de uma amostra de cerca de 3mL de sangue, acrescida de 5mL de PBS. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3mL de Ficoll, seguida por 30 minutos de centrifugação a 1.000G e a aspiração das células, presentes na região intermediária entre as hemácias e o plasma. A suspensão de células foi transferida para um outro tubo no qual foi acrescido PBS até o volume de 11mL, sendo centrifugado por 20 minutos a 1.000G. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspensionado em meio completo (RPMI 1640 acrescido de 20% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina) e 4% de fitohemaglutinina) e contado em câmara de Neubauer para posterior diluição e plaqueamento.

As células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de $3,0 \times 10^4$ células/100µL. Após 24h, os compostos teste nas concentrações variando de 0.39 a 25µg/mL foram adicionados e incubados por 72 horas. O quimioterápico doxorubicina (0.39 a 25µg/mL) foi usado como controle positivo e grupos controle receberam DMSO. Vinte e quatro horas antes do término do período de incubação, 10µL de alamar blue (0,312mg/mL) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro de placa (DTX-880, Beckman Coulter) nos comprimentos de onda de 570nm (reduzido) e 595nm (oxidado) (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994).

A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % proliferação = $A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$. Onde, A_{LW} e A_{HW} são as absorvâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0 = A_{OLW} / A_{OHW}$. Onde, A_{OLW} e A_{OHW} são as absorvâncias do meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorvâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente.

3.2.3 Estudos do mecanismo de ação com a linhagem tumoral HL-60

Os experimentos realizados para determinação do mecanismo de ação dos compostos testados foram realizados com células da linhagem HL-60 após 24 horas de incubação. As células foram plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL e incubadas por 24 horas com as drogas e examinadas ao microscópio de inversão. As concentrações utilizadas para as três cucurbitacinas, deacetilpicracina, cucurbitacina P e $2\beta,3\beta,16\alpha,20(R),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona, foram 2,5 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$. A doxorrubicina a 0,3 $\mu\text{g/mL}$ foi usada como controle positivo. As concentrações utilizadas (2,5 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$) foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular no período de 24h de incubação (dados não exibidos).

Os estudos utilizando citometria de fluxo foram realizados semelhantemente aos anteriores, diferindo somente no fato de que foram estudadas apenas duas cucurbitacinas: a deacetilpicracina e a $2\beta,3\beta,16\alpha,20(R),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona. A citometria de fluxo avaliou a viabilidade celular, o potencial transmembrânico da mitocôndria e o conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular.

3.2.3.1 Viabilidade por Exclusão por Azul de Tripán

O teste de exclusão por azul de tripan permite identificar as células mortas pela substância testada. O corante azul de tripan penetra em todas as células, no entanto, somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível observar uma coloração azulada nas células mortas. Dessa forma, as células viáveis podem ser diferenciadas das não-viáveis.

Após o período de incubação de 24 horas, foram retirados 90µL da suspensão de células e adicionados 10µL do azul de tripan. Em seguida, as células viáveis e as não-viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer como descrito em Veras *et al.* (2004).

3.2.3.2 Análise morfológica - Coloração por hematoxilina/eosina

A coloração utilizada nesse experimento permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. A hematoxilina é um corante basófilo que tem afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo uma cor azul. A eosina, ao contrário, liga-se ao citoplasma conferindo-lhe uma coloração rósea.

Para observar a morfologia, 50µL da suspensão de células foram adicionados à centrífuga de lâmina (cytospin). Após a adesão das células na lâmina, a fixação foi feita com metanol P.A. por 1 minuto e a coloração primeiramente utilizada foi hematoxilina de Harris (0,1%), seguida pela eosina (0,5%). Em seguida, as lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas) como descrito em Veras *et al.* (2004). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

3.2.3.3 Atividade antiproliferativa– Incorporação do BrDU

A bromodeoxiuridina (BrDU) é uma base nitrogenada análoga à Timina. A detecção do BrDU incorporado nas células foi feita por técnicas imunocitoquímicas.

O BrDU foi adicionado 3 horas antes do término do período de incubação, para que fosse incorporado ao DNA das células em mitose. Em seguida, lâminas para cada amostra foram preparadas e postas para secar por 2 horas. Após esse período, foram fixadas em metanol P.A. por 1 minuto. As células foram lavadas com tampão TRIS (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 minutos a 70°C e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram circuladas com caneta hidrofóbica e incubadas com o anticorpo primário antiBrdU e deixadas na geladeira durante a noite em câmara úmida. As células foram incubadas com o anticorpo secundário biotinado por 20 minutos e, em seguida, com a solução de estreptavidina/fluoresceína por mais 20 minutos. Foi adicionado o cromógeno específico, a

diaminobenzidina (DAB), por 1 a 5 minutos e, em seguida, removido com água destilada. Para corar as células não marcadas pelo cromógeno, foi utilizada hematoxilina (0,1%) como descrito em Veras *et al.* (2004).

As duzentas primeiras células foram contadas, considerando-se positivas para proliferação as células com núcleo corado pelo DAB (cor marrom) e negativas as células com núcleo corado com hematoxilina (cor azul).

3.2.3.4 Estudo da indução de apoptose através de coloração por Laranja de Acridina Brometo de Etídio

O método de coloração pela laranja de acridina/brometo de etídio (MCGAHON *et al.*, 1995) permite diferenciar as células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da coloração diferencial por fluorescência. Esse método baseia-se na visualização das células através da coloração por brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA) no núcleo. A laranja de acridina intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo, sendo capaz de atravessar membranas intactas. O brometo de etídio é incorporado majoritariamente por células não-viáveis (com integridade de membrana comprometida), intercalando-se ao DNA corando-o de laranja; ligando-se fracamente ao RNA, que se mostrará com uma coloração vermelha.

As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA, enquanto que o BE marca muito fracamente ou muitas vezes não marca, pois não atravessa a membrana íntegra. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE; morfológicamente observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células em necrose (lesão de membrana) apresentam um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e não há formação de corpos apoptóticos. Possivelmente, as membranas plasmáticas permaneçam intactas durante o fenômeno apoptótico até os últimos estágios quando se tornam permeáveis aos solutos normalmente retidos (KUMAR *et al.*, 2004).

Após o período de incubação, a suspensão de células foi transferida para um tubo *ependorf* e centrifugada por 5 min em baixa rotação (10G). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 20 μ L de solução de tampão fosfato (PBS). Em seguida,

1 μ L da solução de BE:LA foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células foi transferida para uma lâmina e montada com lamínula e, em seguida, as lâminas foram levadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares.

Trezentas células foram contadas de cada amostra para a quantificação percentual de cada evento celular (viabilidade, necrose e apoptose).

3.2.3.5 Estudos de citometria de fluxo

Os citômetros analisam as células ou partículas em meio líquido que passam através de uma fonte de luz. O desvio da luz, que está relacionado diretamente com a estrutura e morfologia das células e a fluorescência são determinados para cada partícula que passa pela fonte de excitação. Após a aquisição do desvio da luz e fluorescência de cada partícula, a informação resultante pode ser analisada utilizando-se um computador com programa específico acoplado ao citômetro. A redução do tamanho das células resulta na diminuição do desvio da luz para frente (FSC) e a condensação nuclear causa inicialmente um aumento transitório no desvio da luz para o lado (SSC) seguido de uma diminuição da SSC durante os estágios finais de apoptose (SHAPIRO, 1995).

3.2.3.5.1 Determinação da viabilidade celular

A análise da integridade da membrana plasmática é uma importante ferramenta para estudar o tipo de morte celular, visto que apenas na necrose ela apresenta-se precocemente alterada. O teste se baseia na capacidade do iodeto de propídeo (PI), hidrofílico, penetrar na célula cuja membrana esteja rompida e após a ligação ao DNA emitir alta fluorescência quando é excitado pelo laser de argônio (488nm). A célula com membrana íntegra emite baixa fluorescência. Desse modo, este método permite avaliar a viabilidade celular através da verificação da integridade da membrana plasmática (MACKLIS; MADISON, 1990).

A determinação da integridade da membrana celular foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o PI como agente fluorogênico. Após o período de incubação de 24 horas, as células foram diluídas com a solução de PI (2 μ g/mL em PBS), na ausência de luz e a 37 °C, e,

após 5 minutos, foram analisadas por citometria de fluxo (Guava EasyCyte Mine) utilizando o software Guava Express Plus (MILITÃO *et al.*, 2006).

3.2.3.5.2 Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula

O ciclo celular é constituído pelas seguintes fases: G₁, S, G₂ e M. Durante o período de crescimento celular (fase G₁) uma célula diplóide apresenta um conteúdo 2n (n – conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomos) em DNA nuclear, isto é, possui duas cópias de cada gene. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear (2-4n) e na fase seguinte (fase G₂) ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo em DNA nuclear é mantido no nível 4n. Em seguida ocorre a mitose (fase M, 4n) durante a qual a célula se divide, formando-se duas células filhas, cada uma com um conteúdo 2n em DNA, assim como as células que não se encontram em divisão celular (G₀). Assim, as diferentes fases do ciclo celular podem ser determinadas a partir do conteúdo de DNA que elas apresentam. Deste modo, o resultado da distribuição do conteúdo em DNA nuclear de uma população de células pode dar-se em G₀/G₁, S e G₂/M (CIBAS, 1995; SHAPIRO, 1995).

Para determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula foi utilizado o PI como agente fluorogênico. Esse teste baseia-se na capacidade do PI de se ligar ao DNA. Inicialmente a membrana plasmática das células é lisada por um detergente para que o PI possa se ligar ao núcleo. Assim, as fases do ciclo celular foram determinadas através do conteúdo do DNA que elas apresentavam (CIBAS, 1995; MELAMED; MULLANEY; MENDELSON, 1979; SHAPIRO, 1985).

Após 24 horas de incubação, as células foram diluídas com a solução de lise contendo o PI (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de triton X-100 e 2µg/mL iodeto de propídeo em PBS), na ausência de luz e a 37 °C, e, após 30 minutos, foram analisadas por citometria de fluxo (Guava EasyCyte Mine) utilizando o software Guava Express Plus (MILITÃO *et al.*, 2006).

3.2.3.5.3 Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria

A mitocôndria é responsável pela iniciação da via intrínseca da apoptose. Quando bcl-2/xl é liberado da membrana externa da mitocôndria, forma-se um poro permitindo a saída de H⁺, causando despolarização da membrana mitocondrial, e também seguida da saída de fatores promotores de apoptose como citocromo *c*, Smac/Diablo, dentre outros. A rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, é seqüestrado pra dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto que as mitocôndrias despolarizadas terão menor afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência. Desse modo, esse ensaio foi utilizado para a investigação da ativação da via apoptótica intrínseca por parte da substância em estudo através da observação da alteração do potencial transmembrânico mitocondrial (MARCHETTI *et al.*, 1996).

Após o período de incubação de 24 horas, as células foram diluídas com a solução de rodamina 123 (1µg/mL em PBS), na ausência de luz e a 37 °C, e, após 15 minutos, as células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspenso em PBS e reincubado por 30 minutos e, então, analisadas por citometria de fluxo (Guava EasyCyte Mine) utilizando o software Guava Express Plus (MILITÃO *et al.*, 2006).

3.2.4 Avaliação da atividade antitumoral da cucurbitacina 2β,3β,16α,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona isolada ou em associação com o quimioterápico 5-Fluorouracil em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180

Os testes para avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foram realizados utilizando camundongos (*Mus musculus* Swiss) machos pesando entre 25-30g oriundos do biotério central da Universidade Federal do Ceará, mantidos com água e alimento *ad libitum*. O manejo dos animais foi realizado procurando seguir todos os princípios éticos, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento dos animais.

O tumor sólido do tipo Sarcoma 180, com 10 dias de implante na forma ascítica foi utilizado para determinar a atividade antitumoral da cucurbitacina $2\beta,3\beta,16\alpha,20(R),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona. O animal de manutenção ou doador foi anestesiado com éter etílico e sacrificado por meio de deslocamento cervical. Fez-se o procedimento asséptico com álcool iodado e, em seguida, coletou-se o líquido ascítico da cavidade abdominal, tendo sido preparada uma suspensão de células com 5,0mL de Ringer lactato, 0,2mL de gentamicina (5mg/mL) e 0,5mL do líquido ascítico, para posterior contagem das células. Os animais receptores foram inoculados com $2,0 \times 10^6$ células/0,5mL na região. Conforme aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisas em Animais da UFC (CEPA).

Nos experimentos, foram utilizados dez animais por grupos, sendo todos machos, apresentando massa corpórea variando entre 25-30g, os quais foram inoculados com tumor Sarcoma 180. Em seguida, 24 horas após a inoculação do tumor, foi iniciado o tratamento durante oito dias consecutivos, de acordo com os seguintes grupos:

Grupo 1: Animais tratados com DMSO 4%, veículo utilizado para diluir o composto (grupo controle negativo)

Grupo 2: Animais tratados com a cucurbitacina 10mg/Kg/dia

Grupo 3: Animais tratados com a cucurbitacina 25mg/Kg/dia

Grupo 4: Animais tratados com 5-Fluorouracil 10mg/Kg/dia

Grupo 5: Animais tratados com a cucurbitacina 10mg/Kg/dia associada com 5-Fluorouracil 10mg/Kg/dia

Todos os grupos foram tratados por via intraperitoneal. Vinte quatro horas após o término do tratamento, os animais foram sacrificados, sendo em seguida retirados os tumores, rins, fígado e baço para pesagem e análise histológica.

O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

Onde:

A = média dos pesos dos tumores no grupo controle.

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

3.2.4.1 Análise histopatológica dos órgãos e tumores

A técnica de coloração com hematoxilina e eosina (HE) permite diferenciar o citoplasma do núcleo, possibilitando, assim, a análise de algumas estruturas celulares. A análise morfológica e histopatológica de tecidos dos animais tratados permite identificar alterações que podem ocorrer e fornecer subsídios para sugerir os efeitos tóxicos causados pela droga.

Após o sacrifício dos animais, ocorreu a retirada e pesagem dos órgãos e tumores para observação macroscópica quanto à cor, ao tamanho e à elasticidade. Em seguida, os órgãos foram armazenados em formol 10%. As peças foram retiradas do formol e seccionadas em pequenas fatias de 3-5 μ m de espessura para posterior preparação das lâminas. O material foi fixado em formol 10% por 24 horas, desparafinado em xilol por 15 minutos e desidratado em concentrações crescentes de álcool até 70% (mergulhando-se rapidamente as lâminas), sendo posteriormente lavado em água destilada até ter sido removido todo o álcool. Posteriormente as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e examinadas ao microscópio óptico (x400).

3.2.5 Análise estatística dos dados

No ensaio do alamar blue, foi registrada a percentagem de inibição $\times \log$ da concentração e foram determinados a concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI₅₀) e respectivos intervalos de confiança (IC95%) a partir de regressão não-linear utilizando o software *Prism* versão 5.0 (*GraphPad Prism Software*).

Os resultados dos experimentos *in vivo* são apresentados como peso relativo dos órgãos e peso dos tumores e foram expressos como a média \pm E.P.M. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste *Student-Newman-Keuls*, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando o software *Prism* versão 5.0 (*GraphPad Prism Software*)

No ensaio do BrdU, os resultados são expressos em percentagem (%) como a média \pm E.P.M. (erro padrão da média) de n experimentos independentes ($n=2$). A relação de

positividade entre tratados e controle também foi determinada (T/C). A proporção de células marcadas em marrom e não-marcadas entre os diferentes grupos foi comparada pelo teste χ^2 com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando o software *Prism* versão 5.0 (*GraphPad Prism Software*).

Nos demais ensaios, os resultados são expressos em % como a média \pm E.P.M. de n experimentos independentes ($n=3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste *Student-Newman-Keuls*, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando o software *Prism* versão 5.0 (*GraphPad Prism Software*). Nos ensaios de citometria, cinco mil eventos foram analisados em cada experimento e os debris celulares foram retirados da análise.

4 RESULTADOS

4.1. Estudo da atividade citotóxica das cucurbitacinas

4.1.2 Avaliação da atividade antiproliferativa em células mononucleadas do sangue periférico - Método do Alamar Blue

Para avaliar a seletividade das cucurbitacinas, o ensaio do alamar blue foi realizado utilizando células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC - *peripheral blood mononuclear cell*), após 72h de exposição com os compostos testes (0,39 a 25µg/mL). Doxorrubicina foi usada como controle positivo (0,39 a 25µg/mL). Ao contrário do que foi observado no teste do MTT com as linhagens tumorais, nenhum composto apresentou citotoxicidade para as células mononucleadas de sangue periférico humano, apresentando todos CI_{50} maior que 25µg/mL, a maior concentração testada. Os resultados estão apresentados como valores de CI_{50} e respectivos intervalos de confiança na tabela 4.

Tabela 1 - Atividade citotóxica das cucurbitacinas em células normais humanas (PBMC - *peripheral blood mononuclear cell*), após 72 horas de exposição aos compostos (0,39 a 25 µg/mL)

Compostos	PBMC CI₅₀ [µg/mL] (µM)
Doxorrubicina	0,97 (1,78) 0,52 - 1,80
Deacetilpicracina	>25 (48,9)
2β,3β,16α,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona	>25 (50,0)
Cucurbitacina P	>25 (46,9)

4.2 Estudos do mecanismo de ação com a linhagem tumoral HL-60

4.2.1 Viabilidade por Exclusão por Azul de Tripán

A análise da viabilidade celular na linhagem tumoral HL-60 por exclusão de azul de tripan após 24 horas de exposição (Figura 18) demonstrou que as cucurbitacinas (2,5 e 5,0 µg/mL) causaram significativa redução do número de células viáveis em todas as concentrações testadas (deacetilpicracina 5 µg/mL: 47%, cucurbitacina P 5 µg/mL: 35% e 2β,3β,16α,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona 5 µg/mL: 40%), exceto a cucurbitacina P na concentração de 2,5 µg/mL. Nenhum dos compostos aumentou o número de células não-viáveis.

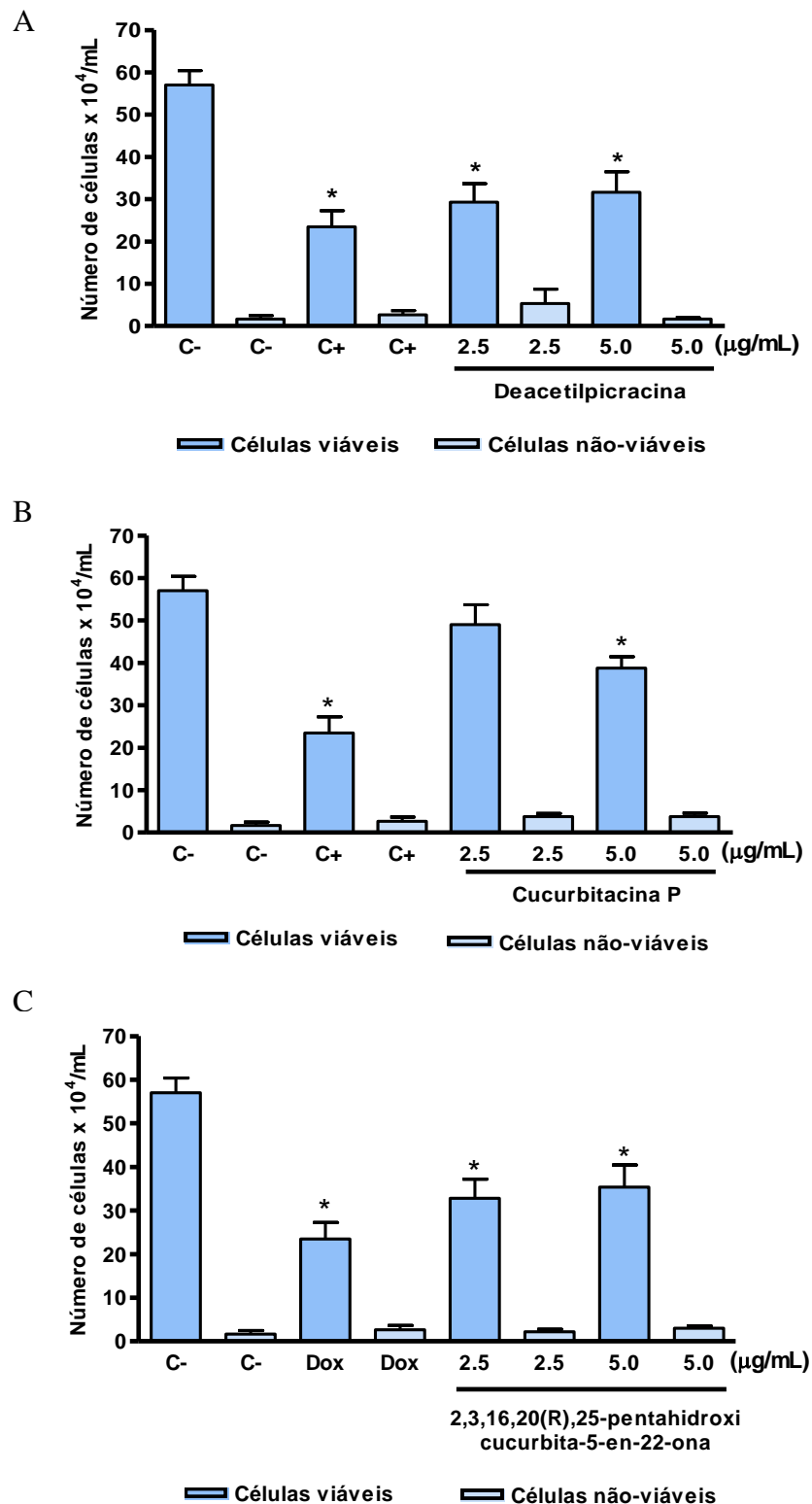


Figura 17 - Efeito da deacetilpicracina (A), da cucurbitacina P (B) e da 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona (C) na viabilidade de células da linhagem tumoral HL-60 determinada pelo método de exclusão por azul de tripan após 24 horas de incubação. C-: controle negativo

4.2.2 Análise morfológica - Coloração por hematoxilina/eosina

A análise morfológica das células tratadas com a cucurbitacina P indicou a presença de muitas células apoptóticas (retração celular, fragmentação do DNA, vacúolos), em todas as concentrações testadas. As células tratadas com a cucurbitacina $2\beta,3\beta,16\alpha,20(R),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona apresentaram intensa deposição de grânulos no citoplasma (eosinofilia), fragmentação do DNA e irregularidades na membrana plasmática. A deacetilpicracina causou intensa vacuolização, deposição de grânulos no citoplasma e membrana plasmática desestabilizada.

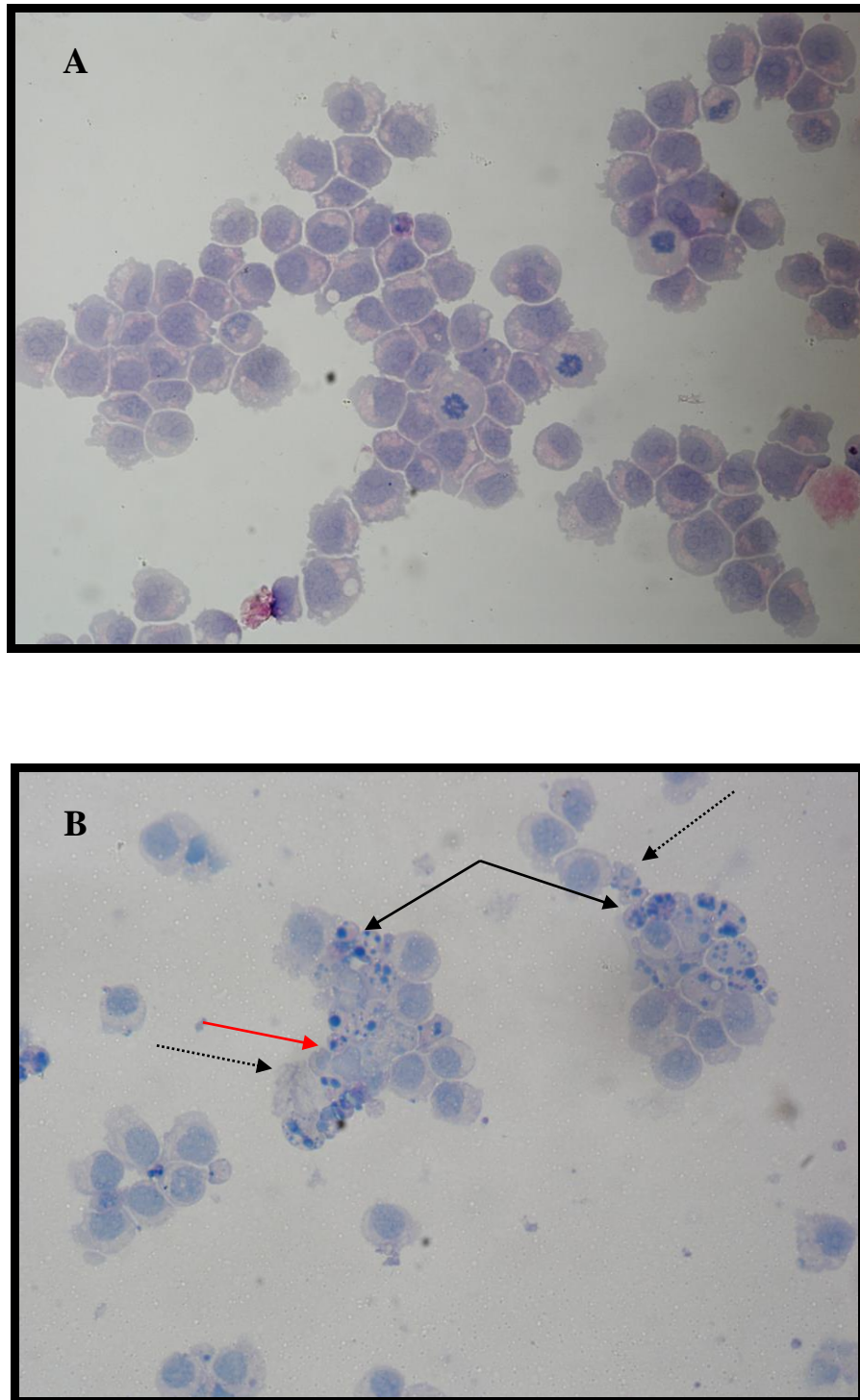


Figura 18 – Fotomicrografia de células HL-60 após 24 horas de incubação com a cucurbitacina P coradas com hematoxilina/eosina e visualizadas por microscopia ótica.

(A) Controle negativo;

(B) Controle positivo.

Setas pretas cheias: Fragmentação de DNA;

Setas pretas pontilhadas: Desestabilização da membrana plasmática;

Setas vermelhas cheias: Retração celular. Aumento = 400x.

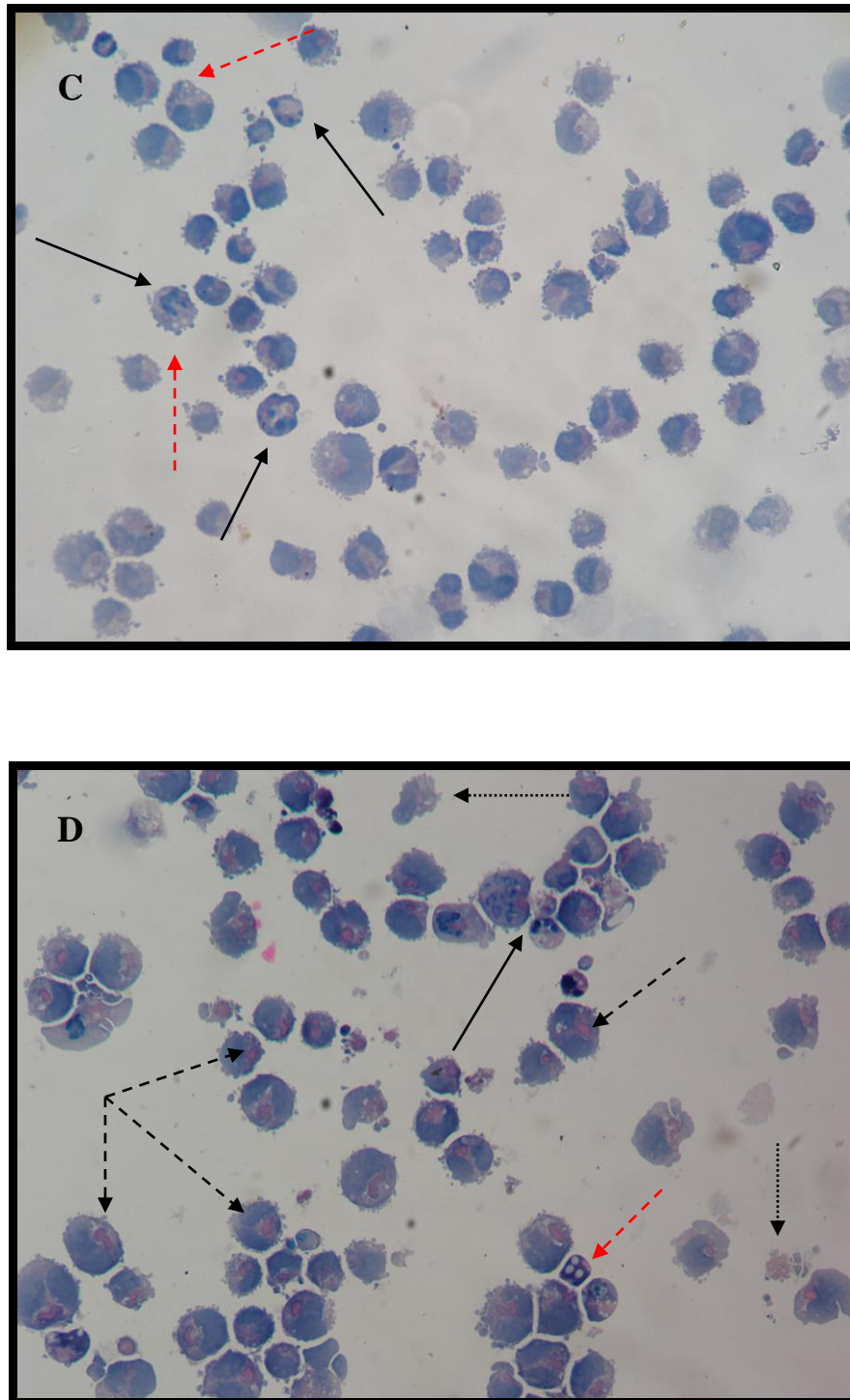


Figura 19 – Fotomicrografia de células HL-60 após 24 horas de incubação com a cucurbitacina P coradas com hematoxilina/eosina e visualizadas por microscopia ótica.

(C) Cucurbitacina 2,5µg/mL;

(D) Cucurbitacina 5,0µg/mL.

Setas pretas cheias: Fragmentação de DNA;

Setas pretas tracejadas: Eosinofilia;

Setas pretas pontilhadas: Desestabilização da membrana plasmática;

Setas vermelhas tracejadas: Vacúolos. Aumento = 400x.

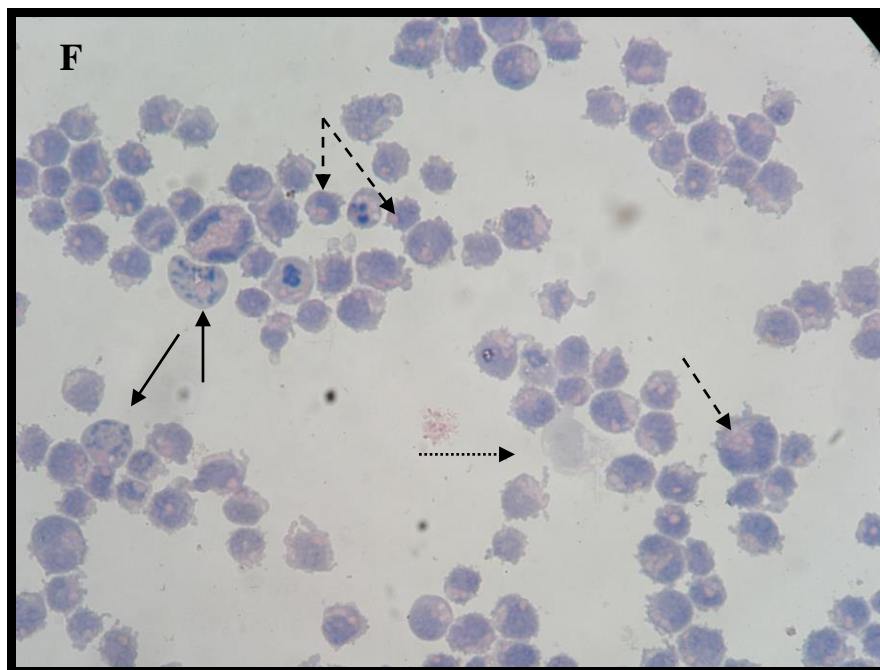
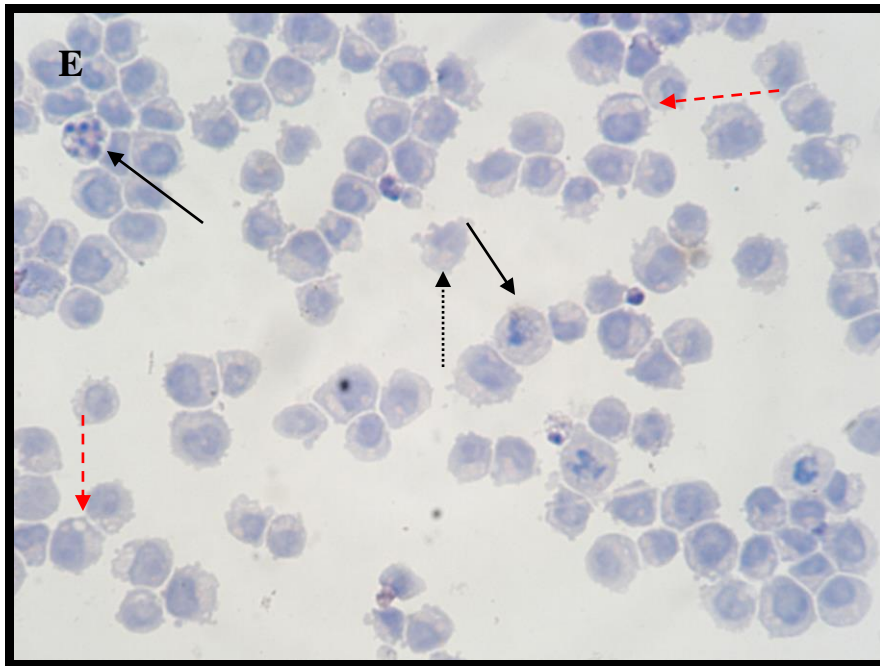


Figura 20 – Fotomicrografia de células HL-60 após 24 horas de incubação com a cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona coradas com hematoxilina/eosina e visualizadas por microscopia ótica.

(E) Cucurbitacina 2,5 μ g/mL;

(F) Cucurbitacina 5,0 μ g/mL.

Setas pretas cheias: Fragmentação de DNA;

Setas pretas tracejadas: Eosinofilia;

Setas pretas pontilhadas: Desestabilização da membrana plasmática;

Setas vermelhas tracejadas: Vacúolos. Aumento = 400x.

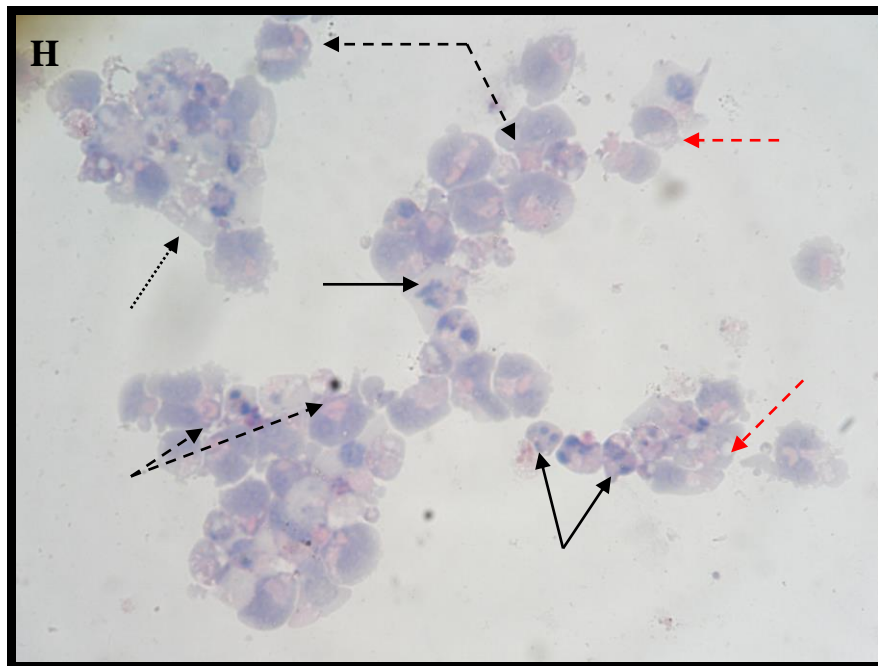
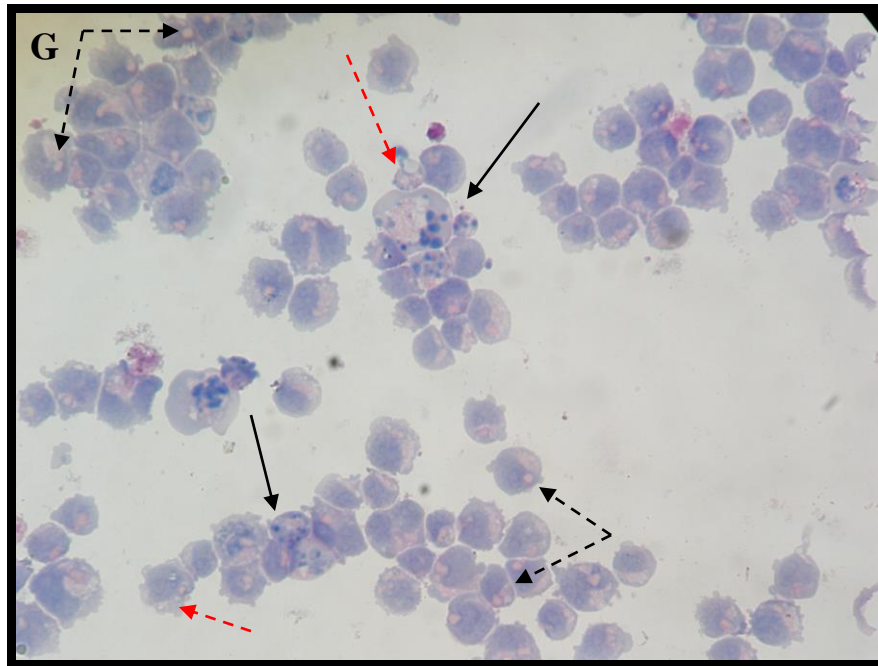


Figura 21 – Fotomicrografia de células HL-60 após 24 horas de incubação com a deacetilpicracina coradas com hematoxilina/eosina e visualizadas por microscopia ótica.

(G) Cucurbitacina 2,5µg/mL;

(H) Cucurbitacina 5,0µg/mL.

Setas pretas cheias: Fragmentação de DNA;

Setas pretas tracejadas: Eosinofilia;

Setas pretas pontilhadas: Desestabilização da membrana plasmática;

Setas vermelhas tracejadas: Vacúolos. Aumento = 400x.

4.2.3 Atividade antiproliferativa – Incorporação do BrdU

Neste ensaio, foi avaliada a capacidade proliferativa das células da linhagem tumoral HL-60 tratadas com as cucurbitacinas (2,5 e 5,0 μ g/mL) através da incorporação de BrdU no DNA após 24 horas de incubação com os compostos teste (Tabela 5). O quimioterápico doxorrubicina (0,3 μ g/mL) foi utilizado como controle positivo.

Apenas as cucurbitacinas deacetilpicracina e 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona foram capazes de inibir significativamente a incorporação do BrdU. A 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona foi a mais potente, obtendo percentuais de inibição de 17 e 22%, para as concentrações de 2,5 e 5,0 μ g/mL, respectivamente. Essa foi seguida pela deacetilpicracina que inibiu a incorporação de BrdU somente na maior concentração (17%).

Tabela 2 – Atividade antiproliferativa das cucurbitacinas expressa em percentual de células BrdU-positivas e percentagem de inibição da incorporação de BrdU, em linhagens tumorais HL-60 após 24 horas de incubação.

Compostos	Concentração μ g/mL	BrdU positivo (%)	Inibição da incorporação (%)	T/C
Controle	-	63	-	-
Doxorrubicina	0,3	36 *	43	0,57
Deacetilpicracina	2,5	63	-	1,0
	5,0	52 *	17	0,83
Cucurbitacina P	2,5	63	-	1,0
	5,0	63	-	1,0
2β,3β,16α,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona	2,5	52 *	17	0,83
	5,0	49 *	22	0,78

4.2.4 Estudo da indução de apoptose através de coloração por Acridina Laranja/Brometo de Etídio

Um dos métodos aplicados para avaliar o padrão de morte celular induzida pelas cucurbitacinas foi realizado através da coloração diferencial com Brometo de Etídeo/Laranja de Acridina e posterior análise por microscopia de fluorescência. Após 24 horas de incubação das células HL-60 com as cucurbitacinas (2,5 e 5,0 μ g/mL), ocorreu significativa redução concentração-dependente do número de células viáveis comparando com o controle (Figura 19). Essa redução foi acompanhada pelo aumento do número de células apoptóticas (2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona 80% e 85%, deacetilpicracina 79% e 95% e cucurbitacina P 62% e 75%, para as concentrações de 2,5 e 5,0 μ g/mL, respectivamente). No entanto, não houve aumento do número de células necróticas.

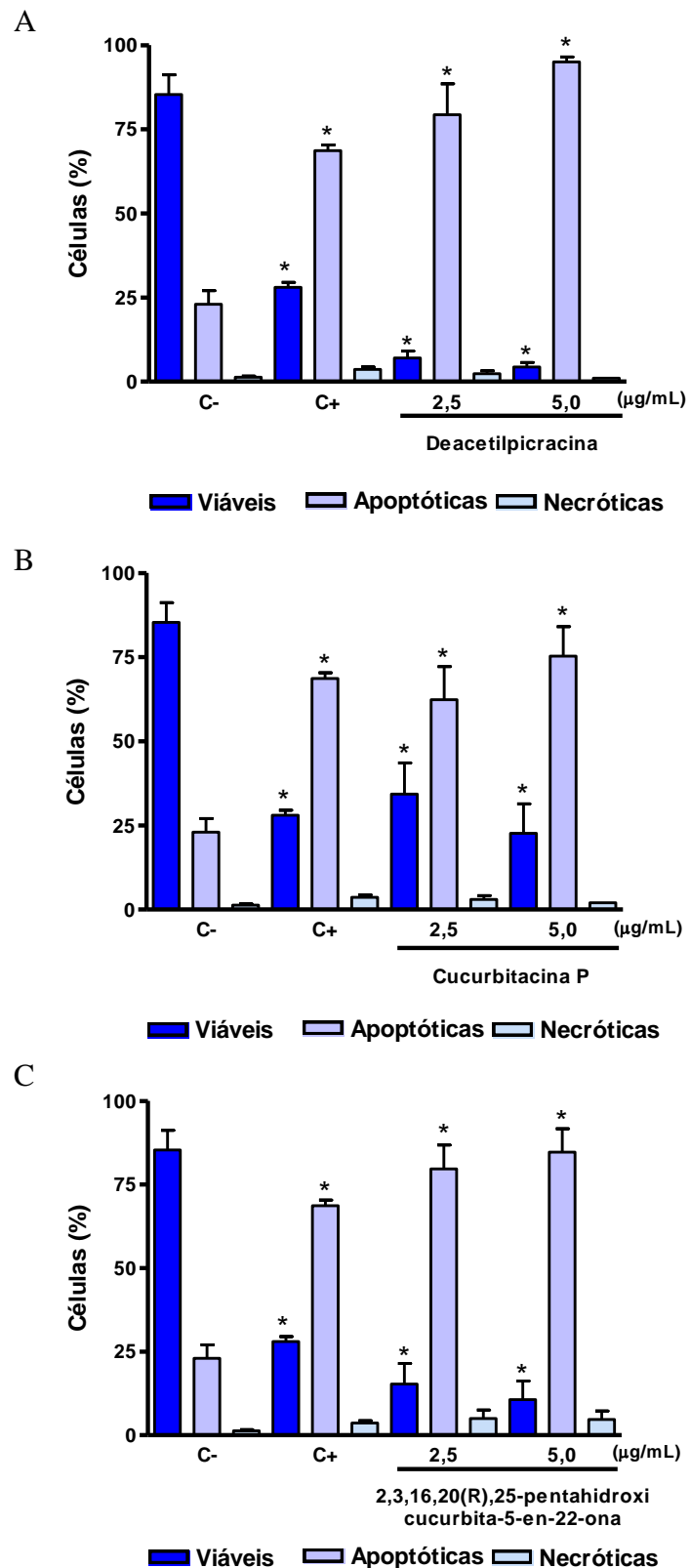


Figura 22 – Atividade da deacetilpicracina (A), da cucurbitacina P (B) e da 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona (C) expressa em percentual (%), sobre os eventos celulares (viabilidade, apoptose e necrose) avaliada em células leucêmicas HL-60 e avaliada por coloração de Brometo de Etídio/Laranja de Acridina após 24 horas de incubação.

4.2.5 Determinação da viabilidade celular

Outro ensaio utilizado para determinar a viabilidade celular foi realizado por citometria de fluxo utilizando o PI como agente fluorogênico após 24 horas de incubação. As células foram tratadas com a deacetilpicracina e 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona nas concentrações de 2,5 e 5,0 μ g/mL. A cucurbitacina P não foi testada nos ensaios de citometria por falta de substância suficiente. A doxorubicina (50ng/mL) foi utilizada como controle positivo.

A figura 20 mostra a viabilidade celular por esse método representada em porcentagem de integridade de membrana. Observa-se perda estatisticamente significativa da integridade da membrana somente daquelas células tratadas com a cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona na concentração de 5,0 μ g/mL. Comportamento semelhante foi observado com a doxorubicina, que também alterou a integridade da membrana quando comparado com o controle.

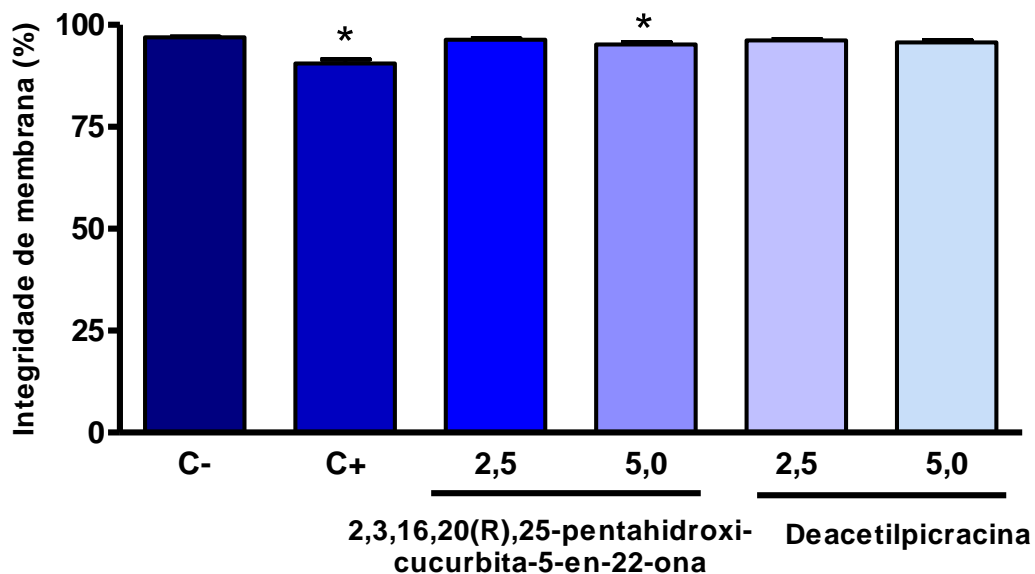


Figura 23 - Efeito das cucurbitacinas sobre a viabilidade celular de células leucêmicas HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando o IP após 24 horas de incubação.

4.2.6 Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula

A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o PI como agente fluorogênico. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com a deacetilpicracina e $2\beta,3\beta,16\alpha,20(R),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona nas concentrações de 2,5 e 5,0 μ g/mL. A doxorubicina (50ng/mL) foi utilizada como controle positivo. A tabela 6 mostra os resultados encontrados. A deacetilpicracina induziu parada do ciclo celular na fase S (Controle: 16,06%, Cucurbitacina: 18,37 e 23,21% nas concentrações de 2,5 μ g/mL e 5 μ g/mL, respectivamente) nas duas concentrações testadas. Também foi observado um aumento em sub-G0/G1, indicando um acúmulo de células com DNA fragmentado (10,62%). As células tratadas com a cucurbitacina $2\beta,3\beta,16\alpha,20(R),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona não apresentaram parada do ciclo celular estatisticamente significativa, porém, observou-se redução da percentagem de células na fase G2/M quando a concentração utilizada para o tratamento era 5,0 μ g/mL, (Controle: 17,36%, Cucurbitacina: 13,93%).

Tabela 3 – Efeito das cucurbitacinas sobre a distribuição do conteúdo de DNA de células leucêmicas HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando o IP após 24 horas de incubação. A doxorrubicina (50ng/mL) foi utilizada como controle positivo.

Substâncias	Concentrações (µg/ml)	Conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G ₁	G ₁	S	G ₂ /M
Controle	-	3,55 ± 0,87	51,78 ± 0,95	16,06 ± 0,61	17,36 ± 0,28
Doxorrubicina	0,05	40,61 ± 7,55*	54,52 ± 3,08	3,65 ± 0,75*	1,81 ± 0,38*
2β,3β,16α,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona	2,5	4,83 ± 1,05	53,50 ± 1,66	16,65 ± 0,24	14,97 ± 0,47
	5,0	5,81 ± 1,21	53,67 ± 1,89	16,62 ± 0,33	13,93 ± 0,66*
Deacetilpicracina	2,5	7,61 ± 1,72	48,99 ± 2,17	18,37 ± 0,28*	15,09 ± 1,08
	5,0	10,62 ± 1,24*	40,25 ± 2,19*	23,21 ± 0,47*	13,31 ± 0,10*

4.2.7 Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria

A determinação do potencial transmembrânico das mitocôndrias das células foi avaliada por citometria de fluxo utilizando a rodamina 123 como agente fluorogênico. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com a deacetilpicracina e a cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona nas concentrações de 2,5 e 5,0 μ g/mL. A cucurbitacina P não foi testada. A doxorrubicina (50ng/mL) foi utilizada como controle positivo. A figura 21 mostra os resultados encontrados. Na figura 24, observa-se despolarização da membrana mitocondrial em células leucêmicas HL-60 tratadas com a maior concentração da deacetilpicracina (5,0 μ g/mL) após 24 horas de incubação. A cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona, por sua vez, não causou despolarização da membrana mitocondrial mesmo na maior concentração testada após 24 horas de incubação.

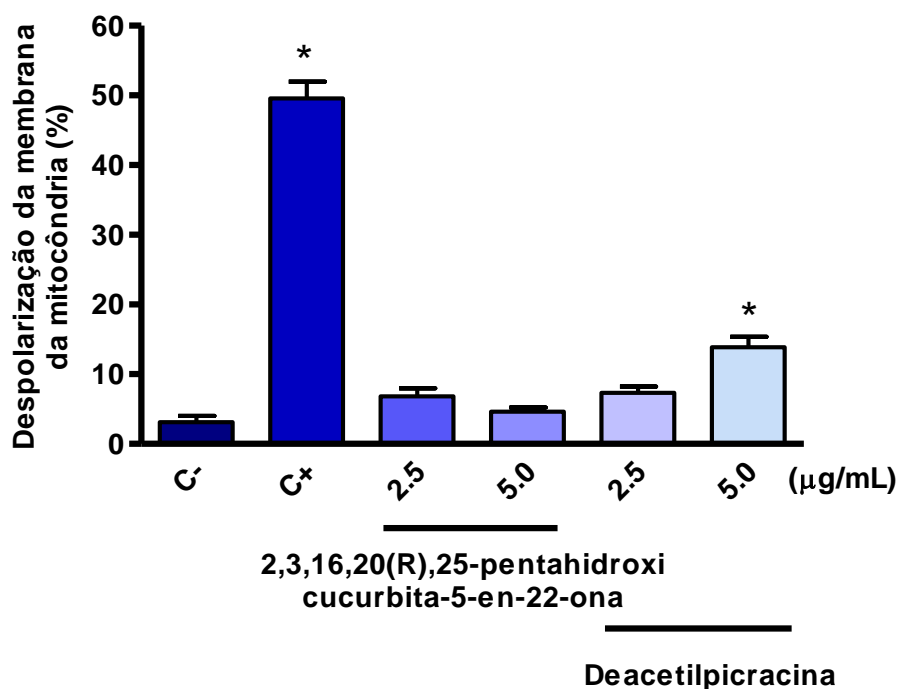


Figura 24 - Efeito das cucurbitacinas sobre o potencial transmembrânico das mitocôndrias de células leucêmicas HL-60 determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123 após 24 horas de incubação.

4.3 Avaliação do efeito antitumoral da cucurbitacina PIR isolada e em associação com o quimioterápico 5-Fluorouracil em camundongos *Mus musculus* Swiss transplantados com tumor Sarcoma 180

A atividade antitumoral *in vivo* da cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona determinada utilizando o modelo experimental do Sarcoma 180 em camundongos *Mus musculus* Swiss após 8 dias de tratamento pode ser observada na figura 22.

Dentre as doses testadas, apenas a dose de 25mg/Kg/dia da cucurbitacina foi capaz de causar diminuição estatisticamente significativa do tamanho do tumor, resultando num percentual de 52% de inibição tumoral em comparação ao grupo controle negativo. O 5-FU na dose de 10mg/Kg foi capaz de causar 49% de inibição. Adicionalmente, a associação do 5-FU (10mg/Kg) com a cucurbitacina (10mg/Kg) incrementou a atividade da cucurbitacina isolada, resultando numa inibição tumoral de 62%. Por outro lado, a cucurbitacina na dose de 10mg/Kg não obteve atividade significativa (inibição tumoral de 28%).

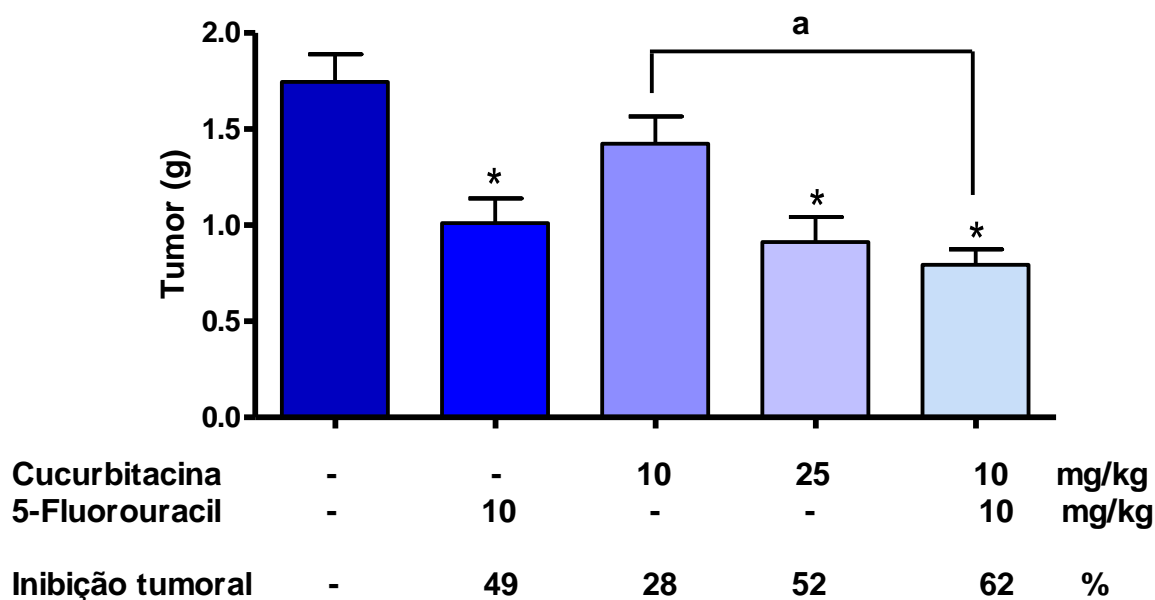


Figura 25 – Massa tumoral úmida de camundongos *Mus musculus* Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento com a cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona.

A tabela 4 mostra os pesos finais dos animais e os pesos úmidos relativos do fígado, rins e baço retirados após 8 dias de tratamento. Exceto para os animais do grupo tratado com a combinação da cucurbitacina com o 5-FU (média de peso = $30,00 \pm 0,90$ g), não foi observada perda de peso significativa nos animais tratados quando comparados com os do grupo controle (média de peso = $34,73 \pm 0,67$ g). Além disso, a cucurbitacina nas doses de 10 e 25mg/Kg causou de maneira dose-dependente a redução do tamanho do baço dos animais ($0,70 \pm 0,04$ g e $0,84 \pm 0,03$ g, respectivamente), o que se repetiu após o tratamento com a combinação da cucurbitacina com o 5-FU ($0,64 \pm 0,03$ g), quando comparados com os do grupo controle ($0,54 \pm 0,03$ g).

A histopatologia dos órgãos dos animais do grupo controle negativo (DMSO 4%) não demonstrou sinais de alterações evidentes. O fígado apresentou congestão portal e da veia centrolobular, hiperplasia das células de Kupffer, hemorragia sinusoidal e discreta tumefação celular, rins com estrutura glomerular preservada e leve hemorragia glomerular e intersticial e tumefação celular, baços com tamanho uniforme, folículos linfóides não evidentes e presença de megacariócitos.

As análises mostram que a cucurbitacina foi capaz de causar alterações nos órgãos analisados. Nos fígados, a cucurbitacina na dose de 10mg/Kg causou intensa tumefação celular, degeneração hidrópica, hiperplasia das células de Kupffer e observou-se também a presença de células inflamatórias dispersas e congestão portal e da veia centrolobular, enquanto que na dose de 25mg/Kg não foram observadas alterações evidentes. Nos rins, a cucurbitacina tanto na menor quanto na maior dose, mais discretamente na menor dose, causou hemorragia glomerular e tubular, intensa tumefação celular e cilindro hialino, sem alterar a estrutura glomerular, que permaneceu preservada. Os baços, por sua vez, apresentaram-se maior, comparados com os do grupo controle e apresentaram folículos linfóides evidentes e muitos megacariócitos. Na dose de 25mg/Kg, observaram-se folículos linfóides evidentes e pigmentos de hemossiderina.

Os animais tratados com 5-FU (10mg/Kg) revelaram fígados com intensa tumefação dos hepatócitos e hepatócitos sem núcleos, degeneração hidrópica e hiperplasia das células de Kupffer, além de esteatose em microgotas. Enquanto nos rins foram observados hemorragia glomerular e tubular, cilindros hialinos e tumefação do epitélio tubular, com estrutura glomerular permanecendo preservada. Os baços, significativamente menor,

apresentaram folículos linfóides evidentes e presença de megacarócitos e coloração mais clara que os do grupo controle.

No grupo associado, a análise histologia dos fígados mostrou degeneração hidrópica, hemorragia sinusoidal, presença de focos inflamatórios e intensa tumefação celular, ou seja, pouca alteração quando comparados com os do controle. Similarmente, os rins mostraram-se pouco alterados, apresentando tumefação celular, hemorragia glomerular e intersticial e presença de cilindrohialino. A análise da histopatologia dos baços não foi realizada em decorrência da qualidade ruim da lâmina preparada.

Diante do fato de que é bastante conhecida a toxicidade das cucurbitacinas a tecidos animais, vale ressaltar aqui a branda toxicidade da cucurbitacina $2\beta,3\beta,16\alpha,20(R),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona aos órgãos alvos analisados.

Tabela 4 – Efeito da cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona (10 e 25mg/Kg/dia) sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento.

Tratamento	Dose (mg/Kg/dia)	Peso final dos animais (g)	Fígado	Rins	Baço
			(g/100g de massa corpórea)		
Controle	-	34,73 \pm 0,67	5,29 \pm 0,11	1,39 \pm 0,04	0,54 \pm 0,03
5-FU	10	33,05 \pm 0,68	5,29 \pm 0,17	1,41 \pm 0,05	0,49 \pm 0,03
2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25- pentahidroxi- cucurbita-5-en-22-ona	10	32,32 \pm 1,20	5,56 \pm 0,16	1,44 \pm 0,06	0,70 \pm 0,04*
	25	33,00 \pm 1,10	5,41 \pm 0,10	1,58 \pm 0,04	0,84 \pm 0,03*
Associação cucurbitacina + 5-FU	10 + 10	30,00 \pm 0,90*	5,64 \pm 0,24	1,54 \pm 0,04	0,64 \pm 0,03* ^a

- p<0,05 comparado com o controle e a - p<0,05 comparando com o grupo 5-FU, analisado por análise de variância (ANOVA) seguida de *Student Newman Keuls test*

Nota: A cucurbitacina foi utilizada isoladamente ou combinada com o quimioterápico 5-fluorouracil (10 + 10mg/Kg/dia). O controle negativo foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) na dose de 10mg/kg/dia foi usado como controle positivo. Os valores correspondem a média (n = 10) \pm erro padrão da média (E.P.M).

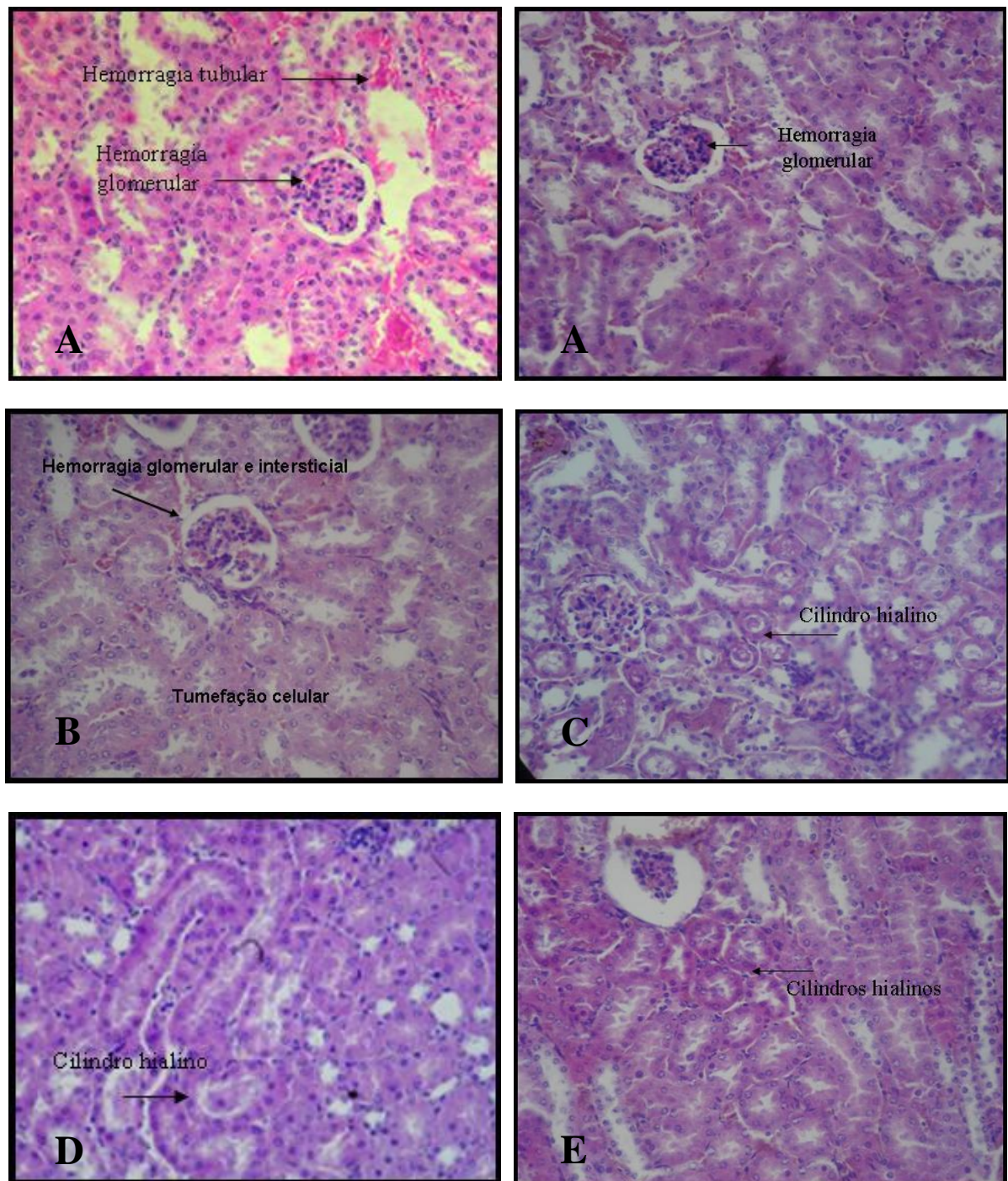


Figura 26 – Fotomicrografia dos rins de camundongos *Mus musculus* Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento.

Nota: O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da droga (DMSO 4%). O quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) 10mg/Kg/dia (B) foi usado como controle positivo. Os animais foram tratados com a cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona (10 e 25 mg/Kg/dia, C e D). O efeito da associação da cucurbitacina (10mg/Kg) com 5-fluorouracil (10mg/Kg) também foi avaliado (E). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.

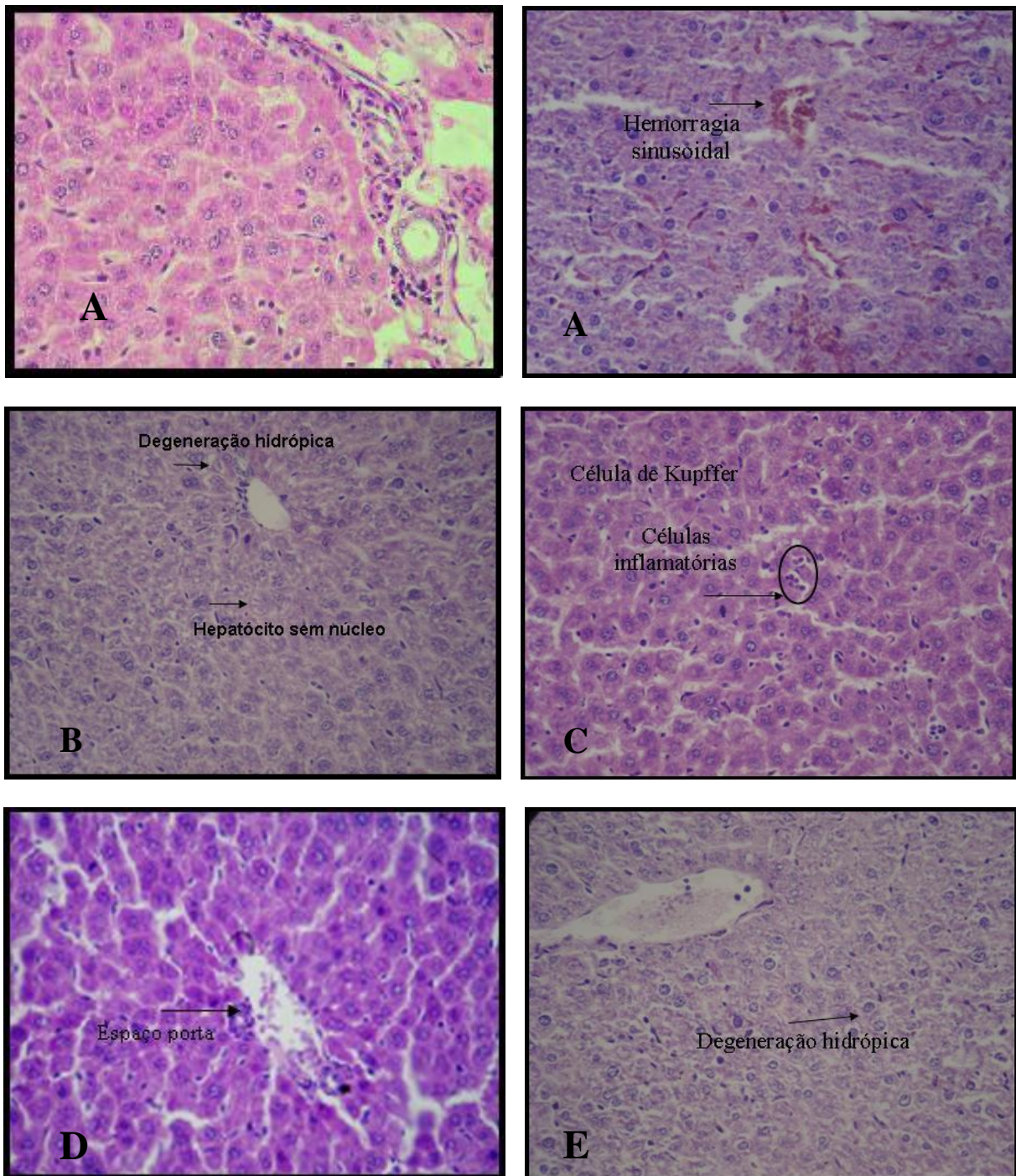


Figura 27 – Fotomicrografia do fígado de camundongos *Mus musculus* Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento

Nota: O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da droga (DMSO 4%). O quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) 10mg/Kg/dia (B) foi usado como controle positivo. Os animais foram tratados com a cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona (10 e 25 mg/Kg/dia, C e D). O efeito da associação da cucurbitacina (10mg/Kg) com 5-fluorouracil (10mg/Kg) também foi avaliado (E). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.

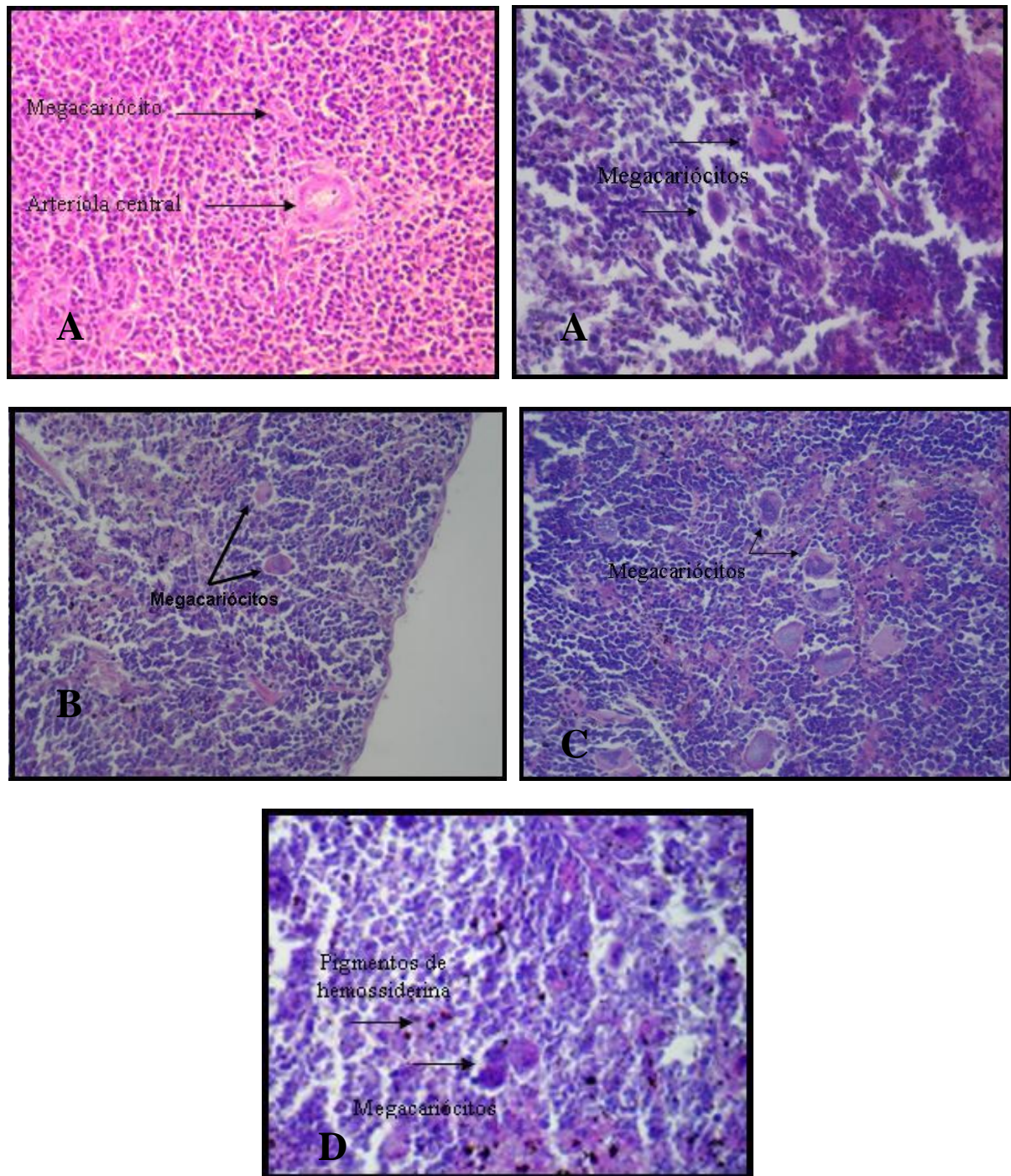


Figura 28 – Fotomicrografia do baço de camundongos *Mus musculus* Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento

Nota: O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da droga (DMSO 4%). O quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) 10mg/Kg/dia (B) foi usado como controle positivo. Os animais foram tratados com a cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona (10 e 25 mg/Kg/dia, C e D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.

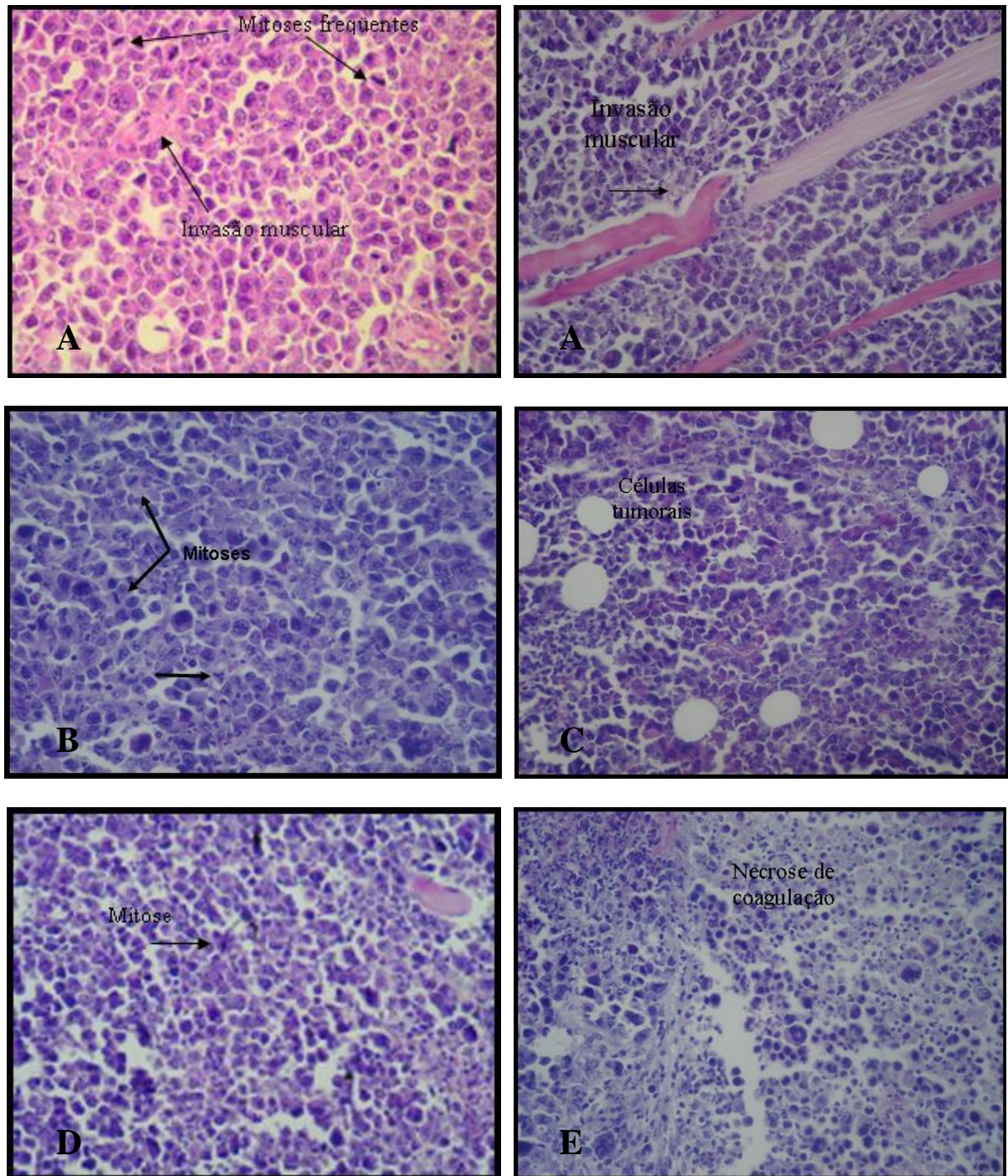


Figura 29 – Fotomicrografia dos tumores de camundongos *Mus musculus* Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento

Nota: O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da droga (DMSO 4%). O quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) 10mg/Kg/dia (B) foi usado como controle positivo. Os animais foram tratados com a cucurbitacina $2\beta,3\beta,16\alpha,20(R),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona (10 e 25 mg/Kg/dia, C e D). O efeito da associação da cucurbitacina (10mg/Kg) com 5-fluorouracil (10mg/Kg) também foi avaliado (E). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento do câncer é o resultado final de uma série de mutações herdadas e/ou adquiridas que causam mudanças importantes no comportamento de uma única célula e de suas células-filhas. A diferença principal entre células tumorais e células normais diz respeito à regulação. As células tumorais perdem suas características normais e adquirem características anormais que afetam a aparência, a expressão de proteínas de superfície, o crescimento, a reprodução e a morte celular (RIEGER, 2004). A mortalidade proveniente das várias formas de câncer é inaceitavelmente alta. Em países desenvolvidos, uma em cada três pessoas que desenvolvem câncer morre desta doença e, mesmo nos casos de diagnóstico precoce, a expectativa de vida pode ser muito curta (KAMB, 2005).

Os produtos naturais têm sido o sustentáculo da quimioterapia do câncer nos últimos 30 anos, especialmente as plantas, que possuem uma longa história de uso no tratamento do câncer. A procura por agentes anticâncer obtidos de fontes vegetais iniciou-se no final da década de 50 com o descobrimento e desenvolvimento dos alcalóides da vinca, vimblastina e vincristina, e o isolamento das podofilotoxinas citotóxicas (CRAGG; NEWMAN, 2005).

A família Cucurbitaceae é conhecida por possuir espécies extremamente tóxicas para os animais e também espécies utilizadas na medicina popular. Os membros dessa família, especialmente as plantas do gênero *Cayaponia*, são empregados popularmente no tratamento de reumatismo, edema, uretrite, úlcera, diabetes, sífilis, hemorróidas, feridas, dentre outras... (CORRÊA, 1984; RÍOS *et al.*, 1990; KAWAHARA *et al.*, 2001; ALARCON-AGUILAR *et al.*, 2002; GONZALEZ; DI STASI, 2002; BELOIN *et al.*, 2005).

Em um estudo anterior, nós demonstramos que as três cucurbitacinas utilizadas neste trabalho possuíam efeitos citotóxicos contra cinco linhagens tumorais humanas e uma murina, sem, no entanto, apresentar atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos e atividade antimitótica em ovos de ouriço-do-mar (DANTAS *et al.*, 2006).

Diante do fato de que células de mamífero em cultura são ferramentas utilizadas na avaliação da citotoxicidade de novos compostos com atividade antitumoral (PAILARD *et al.*, 1999) e que a citotoxicidade das cucurbitacinas aqui estudadas já foi previamente demonstrada, este trabalho avaliou os mecanismos da ação anticâncer dessas três cucurbitacinas obtidas dos frutos da planta *Cayaponia racemosa* coletada no estado do Ceará.

Modelos celulares, por sua vez, são ferramentas úteis e necessárias para observar a toxicidade de um composto, traduzida, inicialmente, pela sua capacidade de induzir morte

celular, estando a linhagem HL-60 entre os modelos celulares de origem mielóide mais amplamente utilizados (COLLINS, 1987; MILITÃO *et al.*, 2006; BEZERRA *et al.*, 2007). Sendo assim, os experimentos para avaliar os mecanismos de ação foram realizados utilizando a linhagem tumoral HL-60 como modelo e consistiram na análise da viabilidade celular por exclusão de azul de tripan, inibição de síntese de DNA pela incorporação do BrdU, análise morfológica por coloração diferencial com hematoxilina/eosina e análise do padrão de morte celular por coloração diferencial com brometo de etídio/acridina laranja. Além disso, por citometria de fluxo, foram avaliados a integridade da membrana celular, o potencial transmembrânico da mitocôndria, o conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, e a fragmentação de DNA. A doxorubicina, um agente anticâncer de amplo espectro vastamente utilizado na clínica tanto para o tratamento de tumores sólidos quanto para leucemias, foi usada como controle positivo dos experimentos por apresentar mecanismo de ação conhecido.

Inicialmente, o método do Alamar Blue foi realizado para acessar o potencial antiproliferativo das três cucurbitacinas isoladas de *C. racemosa* após 72 horas de incubação com células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC). Nenhum dos compostos apresentou citotoxicidade para as células, todos eles apresentando valores de CI_{50} maiores que $25\mu\text{g/mL}$.

A viabilidade celular foi, em seguida, determinada pelo teste de exclusão do azul de tripan. A deacetilpicracina reduziu a quantidade de células viáveis de maneira concentração-dependente. Similarmente agiu a cucurbitacina $2\beta,3\beta,16\alpha,20(R),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona. Porém, a cucurbitacina P, na menor concentração testada, não reduziu o número de células viáveis de maneira significativa. Vale ressaltar que nenhum dos compostos aumentou o número de células não-viáveis, ou seja, aquelas que estão com a integridade da membrana comprometida. Esses ensaios foram realizados após um período de incubação de 24 horas, o que provavelmente justifica a inversão de potência das cucurbitacinas avaliadas, quando comparado ao ensaio do MTT, realizado após 72 horas de incubação, onde a cucurbitacina P foi a mais ativa.

A atividade antiproliferativa das cucurbitacinas foi ainda avaliada através da incorporação do análogo da timidina, 5-BrdU, durante a síntese de DNA. O resultado achado foi que a incorporação do BrdU foi inversamente proporcional à concentração da cucurbitacina testada. Dessa forma, esses resultados confirmaram a atividade citotóxica desses compostos observada nos ensaios do MTT e da exclusão do azul de tripan.

A maioria das células do corpo está em estado de quiescência (fase G0). Porém, células em divisão (como epitélios e medula óssea), devem replicar seu genoma de forma fiel e precisa, a fim de evitar mutações somáticas nos genes de regulação do ciclo que podem culminar com a transformação celular. Em média, a fase S dura 6-8 h em cultura primária de fibroblastos, embora a duração exata dependa do tipo celular e não difira entre células normais, imortalizadas ou transformadas (DIMITROVA; BEREZNEY, 2002). A síntese de DNA pode ser alterada por diversas vias tais como as alterações topológicas na molécula do DNA induzidas por drogas.

Posteriormente, alterações morfológicas por coloração através de H/E e LA/BE foram investigadas com o intuito de determinar qual mecanismo de morte celular, apoptose ou necrose, estaria relacionado com a citotoxicidade das cucurbitacinas.

O termo apoptose refere-se a um processo ativo dependente de energia iniciado por uma variedade de estímulos, tanto intracelulares como extracelulares, no qual as células participam da própria morte numa maneira bastante eficiente e organizada. Apoptose foi primeiramente descrita por Kerr, Wyllie e Currie (1972), os quais observaram alterações particulares nas células submetidas à morte celular organizada. Ela ocorre normalmente em várias situações fisiológicas (embriogênese, remodelagem e reparo de tecidos, renovação celular e eliminação de anticorpos auto-reativos) e patológicas (agressão aos ácidos nucléicos por radiação e drogas citotóxicas), eliminando células indesejáveis e danificadas, especialmente quando a lesão afeta o DNA (KUMAR *et al.*, 2004). Devido à importância no desenvolvimento e em muitas doenças, incluindo o câncer, a apoptose tem sido alvo de várias pesquisas nos últimos 30 anos e os métodos para analisar e estudar a morte celular programada têm evoluído significativamente (HUERTA *et al.*, 2007; ISRAELS; ISRAELS, 1999).

Existem duas vias principais de ativação da apoptose: (1) A via intrínseca ou via mitocondrial é ativada pelo escape de citocromo c do espaço intermembrana da mitocôndria para o citosol em resposta ao aumento da permeabilidade mitocondrial a moléculas pró-apoptóticas (Bax, Bad e Mcl-1S). Posteriormente, ocorre ativação da caspase 9 iniciadora complexada à proteína Apaf-1 e (2) a via extrínseca é a via dos receptores de morte, como o receptor de Fas e receptor de TNF (fator de necrose tumoral, sendo a caspase-8 a principal iniciadora (ADAMS; CORY, 2007).

Morfologicamente, nas células sofrendo apoptose observam-se condensação e fragmentação nucleares, rompimento da arquitetura do citoesqueleto e conseqüente encolhimento celular e fragmentação restos citoplasmáticos em “corpos apoptóticos”, e posterior fagocitose desses por macrófagos na ausência de inflamação. Por último, ocorre a ação de endonucleases que clivam o DNA em pequenos fragmentos pré-determinados (180 pares de bases) (ISRAELS; ISRAELS, 1999; STRASSER; O’CONNOR; DIXIT, 2000).

Outros mecanismos de apoptose independentes da cascata de caspases também já foram descritos. Esses mecanismos envolvem proteases, fatores indutores de apoptose (AIF, do inglês *apoptosis inducing factors*), endonucleases G, calpaínas e catepsinas (BRÖKER; KRUYT; GIACCONE, 2005).

Em contraposição à apoptose, a necrose é, morfologicamente, caracterizada por inchaço e falência das mitocôndrias, nos estágios iniciais, além de desintegração da membrana plasmática e perda da homeostase, inchaço e ruptura celular, com conseqüente ocorrência de inflamação ao redor das células mortas atribuível à liberação do conteúdo celular, incluindo proteases e lisozimas, e de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos adjacentes. A aparência morfológica resulta da desnaturação das proteínas intracelulares, da digestão enzimática e da catástrofe bioenergética por depleção de ATP a níveis incompatíveis com a sobrevivência das células devido a insultos tóxicos ou danos físicos (EDINGER; THOMPSON, 2004; ISRAELS; ISRAELS, 1999; KUMAR *et al.*, 2004).

A microscopia ótica possui pouca capacidade de detectar células apoptóticas. Contudo, ela pode ser incrementada por colorações utilizando o iodeto de propídeo (IP), o qual diferencia células necróticas. Ainda, a acuidade da microscopia ótica pode ser melhorada através do uso de fluorescência. Essas técnicas podem ser detectar os eventos finais da apoptose (HUERTA *et al.*, 2007).

A análise morfológica através de microscopia ótica utilizando a coloração com HE revelou que os três compostos causaram alterações nucleares e citoplasmáticas compatíveis com a morte por apoptose, como retração celular, fragmentação de DNA e vacúolos, o que foi confirmado pelos achados obtidos com a coloração com LA/BE. Na coloração diferencial com LA/BE, para as três cucurbitacinas nas duas concentrações (2,5 e 5,0µg/mL), observou-se um aumento do número de células com características compatíveis com apoptose, com cromatina fragmentada, acompanhado de uma drástica redução do número de células viáveis. Semelhante ao observado no ensaio da exclusão do azul de tripan, não

foram detectadas células com características de morte por necrose, ou seja, lesão na membrana, ausência de corpos apoptóticos e um padrão de coloração laranja-avermelhada. O fato da cucurbitacina P (2,5µg/mL) não ter apresentado diminuição do número de células viáveis no ensaio da exclusão do azul de tripan provavelmente pode ser explicado porque as células ainda estavam com a capacidade de expulsar o azul de tripan e com membrana plasmática íntegra e por isso não foram coradas de azul e poderiam estar nos estágios iniciais de apoptose, o que foi detectado pela coloração por brometo de etídio/laranja de acridina.

A capacidade das cucurbitacinas de induzir apoptose em células em cultura tem sido investigada em diversos trabalhos (KESTER *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008a; LIU *et al.*, 2008b; YANG *et al.*, 2007; SHI *et al.*, 2006).

Cada método para detectar e verificar apoptose possui vantagens e desvantagens e o ideal é confirmar a apoptose através de múltiplas técnicas. Por exemplo, observação microscópica das alterações morfológicas combinada com ensaios de fragmentação de DNA são dois métodos confiáveis independentes que definem a morte celular ocorrendo por apoptose. Mas, a técnica mais confiável permanece sendo a observação das alterações morfológicas (HUERTA *et al.*, 2007).

O corante fluorescente IP torna-se altamente fluorescente ao se ligar ao DNA das células não-viáveis. Dessa forma, é possível diferenciar células não-viáveis de viáveis e contá-las através de citometria de fluxo. Durante a apoptose e fragmentação de DNA, a quantidade de DNA marcado diminui nas células. A percentagem de células na fase G1 naturalmente diminui com o progresso da apoptose (HUERTA *et al.*, 2007).

Baseado nisso, foram realizados experimentos utilizando citometria de fluxo com corantes fluorogênicos para avaliar os efeitos das cucurbitacinas sobre a viabilidade celular, distribuição do ciclo celular e despolarização da membrana mitocondrial. Nesses experimentos de citometria, apenas a deacetilpicracina e a cucurbitacina 2β,3β,16α,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona foram avaliadas.

A cucurbitacina 2β,3β,16α,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona na concentração de 5,0µg/mL reduziu a viabilidade celular, avaliada pela integridade da membrana plasmática. Enquanto que esse composto na concentração de 2,5µg/mL e a deacetilpicracina em nenhuma das concentrações testadas não alteraram a integridade da membrana citoplasmática.

A análise da distribuição do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo utilizando o IP como agente fluorescente e os resultados mostraram que a deacetilpicracina, nas duas concentrações testadas (2,5 e 5,0 μ g/mL), causou parada do ciclo celular na fase S, acompanhada de redução do conteúdo de DNA nas fases G1 e G2/M. Além disso, foi observado aumento em sub-G1, indicando um acúmulo de células com DNA fragmentado (10,62%). Por sua vez, a cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona não resultou em parada do ciclo celular estatisticamente significativa, porém, se observou redução da percentagem de DNA na fase G2/M (Cucurbitacina 5,0 μ g/mL).

Trabalhos anteriores já reportaram a capacidade de cucurbitacinas de causar parada do ciclo celular em linhagens tumorais. A diidrocucurbitacina B foi estudada por Yang *et al.* (2007) em células de câncer de mama da linhagem Bcap 37 e os resultados encontrados revelaram que o composto foi capaz de causar parada do ciclo celular em G2/M, seguida de apoptose confirmada por: (1) alterações morfológicas como cromatina condensada e fragmentada, encolhimento celular e formação de corpos apoptóticos, utilizando a coloração com Hoechst 33342 e (2) aumento da fragmentação de DNA, acúmulo citosólico de citocromo *c* e aumento da atividade das caspases 3, 8 e 9, confirmados por citometria de fluxo e *Western blot*.

Liu *et al.* (2008a, 2008b) demonstraram o efeito antiproliferativo e a indução de apoptose da associação da cucurbitacina B com o docetaxel e concluíram que a atividade antitumoral observada *in vitro* e *in vivo* era resultado de parada do ciclo celular em G2/M e apoptose, acompanhados de supressão da expressão de proteínas-chaves envolvidas nos ciclo celular e na apoptose, sendo elas STAT-3, ciclina B1 e Bcl-2. Foi sugerido que a diminuição da expressão de ciclina B1 pode ser resultado da inibição da ativação de STAT-3 (LIU *et al.*, 2008a, 2008b). Sabe-se que a ativação persistente de STAT-3 está implicada na patogênese de diversas malignidades (BLASKOVICH *et al.*, 2003; KESTER *et al.*, 2008) e que alguns membros da família STAT estão implicados na transformação de células normais em malignas (GARCIA; JOVE, 1998). Diante disso, os autores sugeriram que a indução da parada do ciclo celular e apoptose era devido à supressão da ativação de STAT-3 (LIU *et al.*, 2008a).

Os processos oncogênicos, aqueles envolvidos na gênese do câncer, afetam principalmente reguladores da fase G1. Enquanto que as células normais precisam de estimulação mitogênica para entrar no ciclo celular, células tumorais entram e permanecem no

ciclo. Adicionalmente, os pontos de checagem de DNA e do fuso mitótico são frequentemente “desligados” nas células transformadas, resultando em mais instabilidade genética e vantagens do ponto de vista proliferativo comparadas com células não-transformadas. Isso sugere que o restabelecimento do controle do ciclo celular via ação farmacológica nos componentes desregulados dos pontos de checagem poderia ser uma estratégia viável na terapia do câncer. Muitos dos agentes anticâncer atualmente empregados clinicamente atuam em alguma fase do ciclo celular (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004).

Após a replicação do DNA na fase S, a célula entra na fase G2, onde os danos ao DNA são detectados por dois grupos de proteínas-sensores. O principal papel dos pontos de checagem em G2 é prover o tempo necessário para a célula reparar algum dano antes do início da mitose. As proteínas-sensores comunicam a maquinaria de reparo do DNA para iniciar o processo (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004).

A mitose envolve uma profunda reorganização da arquitetura da célula para permitir a segregação dos cromossomos e a citocinese. Esse processo requer extensiva regulação porque erros ocorrem resultando em aneuploidia da célula, ou seja, distribuição assimétrica dos cromossomos para as células-filhas. A mitose é subdividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase. Durante a prófase, os cromossomos, já replicados, são condensados e os dois centrossomos migram para pólos opostos. Seguindo a desintegração da membrana nuclear, o fuso mitótico começa a se formar. Na pró-metáfase, os microtúbulos que formam o fuso mitótico começam a interagir com os cromossomos, culminando com posicionamento desses no centro do fuso, na chamada placa metafásica. Na fase subsequente, a anáfase, as cromátides-irmãs começam a se segregar em seus centrômeros. Em seguida, os cromossomos-filhos começam a mover-se em direção aos dois pólos da célula direcionados pelos microtúbulos. A telófase, que antecede a citocinese, caracteriza-se pela completa migração dos cromossomos para os pólos. Por fim, um anel central de actina forma-se e causa constrição e uma nova membrana celular é formada e então incorporada separando duas células-filhas (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004).

A inibição direta do fuso mitótico com agentes como o paclitaxel, docetaxel e vimblastina, tem sido bem sucedida terapeuticamente, embora as verdadeiras razões para a seletividade observada entre células cancerosas e células normais permanecem evasivas. Provavelmente, isso se deve, em parte, ao fato de que essas drogas exploram os defeitos nos pontos de checagem de muitas células tumorais. Apesar da seletividade, toxicidade e resistência ainda são observadas no tratamento com esses agentes. Por essa razão, novos

inibidores do fuso continuam sendo desenvolvidos, assim como estratégias antimitóticas alternativas estão emergindo. As mais estudadas são a inibição de proteínas motoras e quinases, como quinesinas, PLK (do inglês *polo-like kinases*) e aurora-quinases (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004).

Os pontos de checagem são mecanismos inerentes ao ciclo celular que asseguram o intervalo de tempo adequado dos eventos do ciclo e monitoram a integridade do DNA (HARTWELL; WEINERT, 1989; MOLINARI, 2000). A entrada na fase M é bloqueada pelos pontos de checagem de G2/M quando ocorre dano ao DNA. O bloqueio das células com dano ao DNA em G2/M permite a ação da maquinaria de reparo do DNA e a continuação do ciclo ou a parada permanente do ciclo seguida de apoptose se o dano for muito severo. Assim, agentes que atuem bloqueando esse ponto de checagem podem proteger os organismos da acumulação de mutações (YANG *et al.*, 2007).

Com a identificação de um número crescente de alvos moleculares associados com certas neoplasias, *high throughput screening* de compostos contra vários desses alvos forma agora a base do descobrimento de agentes anticâncer. Exemplos disso são as ciclinas dependentes de quinase (Cdk's), as quais, juntamente com as ciclinas, possuem importante papel na regulação da progressão do ciclo celular, e a inibição da sua atividade atrasa ou pára a progressão em estágios específicos do ciclo celular (NEWMAN *et al.*, 2002).

A mitocôndria está implicada na apoptose na chamada via intrínseca. Ela sofre duas mudanças durante a apoptose. Primeiro, as membranas externas mitocondrial tornam-se permeáveis a proteínas, resultando no escape de proteínas normalmente retidas no espaço entremembranas, proteínas como citocromo *c*, fatores indutores de apoptose e outras. Segundo, o potencial de membrana da membrana interna mitocondrial é reduzido (CHANG; YANG, 2000; GREEN; KROEMER, 1998; GREEN; REED, 1998).

Durante a apoptose, a disfunção mitocondrial falada anteriormente só ocorre nos primeiros estágios da apoptose e é acompanhada de um decréscimo do potencial de membrana mitocondrial. Mudanças nesse potencial podem ser examinadas por fluorescência utilizando fluorocromos sensíveis a mudanças de potencial juntamente com citometria de fluxo (MACHO *et al.*, 1996).

A perda do potencial transmembrânico da mitocôndria é refletida pela menor capacidade da mitocôndria de acumular rodamina 123. A deacetilpicracina causou despolarização da membrana mitocondrial na maior concentração testada (5,0µg/mL). O dado

sugere possível participação da deacetilpicracina na via intrínseca da apoptose. A cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona não alterou o potencial transmembrânico de maneira estatisticamente significativa.

O potencial antitumoral *in vivo* da cucurbitacina foi avaliado no modelo experimental do tumor Sarcoma 180. Esse tumor é original de camundongo e uma das linhagens tumorais mais freqüentemente utilizadas na pesquisa de atividade antitumoral *in vivo* (LEE *et al.*, 2003). O Sarcoma 180 foi, inicialmente, identificado no Croker Laboratory (Columbia University, New York) em 1914. É um tumor de natureza sólida, que foi inicialmente classificado como carcinoma mamário, por surgir espontaneamente na região axilar de camundongos (SCHABEL *et al.*, 1977). O quimioterápico 5-fluorouracil foi utilizado como controle positivo e foi administrado em camundongos *Mus musculus* Swiss por via intraperitoneal na concentração de 10mg/Kg diariamente por 8 dias. É um agente antimetabólico da classe dos análogos da pirimidina que em última instância levam a um bloqueio da timidilato sintase (HARDMAN; LIMBIRD, 1996). A cucurbitacina 2 β ,3 β ,16 α ,20(R),25-pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-ona foi administrada isoladamente nas doses de 10 e 25mg/Kg/dia ou combinada com o 5-FU (10 + 10mg/Kg/dia). A cucurbitacina na dose de 10mg/Kg/dia não causou inibição tumoral significativa no modelo apresentado, enquanto que na dose de 25mg/Kg/dia causou 52% de inibição tumoral quando comparado com o controle negativo. Além disso, a associação com o quimioterápico 5-FU incrementou a atividade antitumoral da cucurbitacina isolada na mesma dose, apresentando inibição tumoral de 62%.

A resistência apresentada por muitos pacientes com câncer ao tratamento com agentes anticâncer padrão é um sério problema encontrado na terapia do câncer, e ela pode surgir em uma população de células através da exposição repetida a um determinado fármaco. Essa população de células pode subsequentemente mostrar ampla resistência cruzada a outros fármacos mesmo que nunca tenha sido exposta a esses agentes e esse fenômeno é chamado resistência a multidrogas (MDR, do inglês *Multi-drug Resistance*). MDR pode estar relacionada com a presença de um gene MDR1 codificando uma proteína (Pgp; glicoproteína P) a qual bombeia efetivamente o fármaco para fora da célula, desse modo, impossibilitando suas ações antitumorais (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Os protocolos clínicos de quimioterapia do câncer raramente utilizam um único fármaco e normalmente combinam dois ou mais agentes com diferentes mecanismos de ação. Esse procedimento de combinação na quimioterapia pode aumentar a eficácia terapêutica,

diminuir a toxicidade aos tecidos normais e minimizar ou atrasar os efeitos da resistência aos fármacos (LIU *et al.*, 2008a, 2008b). Esse efeito anticâncer adicional observado na quimioterapia do câncer também foi observado nos experimentos aqui apresentados, já que a associação da cucurbitacina com um quimioterápico já conhecido causou maior inibição tumoral quando comparada com a atividade isolada da cucurbitacina na mesma dose.

Para verificar a ocorrência de efeitos tóxicos decorrente do tratamento com a cucurbitacina, foram realizadas análises histopatológicas do tumor e de alguns órgãos que se sabe serem alvos de toxicidade de quimioterápicos. O tratamento com a cucurbitacina causou branda hepatotoxicidade, observada pela tumefação celular, degeneração hidrópica, hiperplasia das células de Kupffer e também pela presença de células inflamatórias dispersas e congestão portal e da veia centrolobular na dose de 10mg/Kg. Por outro lado, na dose de 25mg/Kg não foram observadas alterações evidentes.

A hiperplasia das células de Kupffer observada nos animais pode ser explicada pela ativação de células mononucleadas envolvidas na degradação de eritrócitos, na fagocitose de detritos celulares, absorção de ferro ou por focos hemorrágicos devido à congestão vascular. Além disso, esses macrófagos, quando ativados, liberam citocinas pró-inflamatórias que estão diretamente relacionadas à toxicidade tecidual local ou sistêmica (KUMAR *et al.*, 2005). Sabe-se que danos hepáticos substanciais provocados por tóxicos, como o 5-FU, são potencialmente reversíveis desde que a arquitetura do tecido conjuntivo se mantenha íntegra e capaz de fornecer regeneração celular (KUMMAR *et al.*, 2005).

Nos rins, a cucurbitacina tanto na menor quanto na maior dose, mais discretamente na menor dose, causou hemorragia glomerular e tubular, intensa tumefação celular e cilindro hialino. No grupo controle negativo também foram observadas hemorragias e tumefação celular. Sendo assim, as alterações observadas no tratamento com a cucurbitacina resultam em leve toxicidade aos rins sem alterar a estrutura glomerular.

O tratamento com a cucurbitacina nos baços provocou presença de folículos linfóides evidentes e muitos megacariócitos. Na dose de 25mg/Kg, também se observaram folículos linfóides evidentes e também pigmentos de hemossiderina. No entanto, a alteração mais evidente foi o aumento do peso úmido dos baços verificado com o tratamento das duas doses da cucurbitacina isolada e em combinação com o 5-FU. A presença de megacariócitos e o aumento no tamanho dos baços podem sugerir uma possível atividade imunoestimulante.

Essa provável atividade imunoestimulante conflita com vários achados na literatura que revelam a atividade antiinflamatória de cucurbitacinas *in vivo* e *in vitro* (ESCANDELL *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2004; RECIO *et al.*, 2004; SIQUEIRA JR *et al.*,

2007). Esse paradoxo pode ser explicado pelos diferentes efeitos de cucurbitacinas acetilada ou não e com saturação na cadeia lateral ou não (MUSZA *et al.*, 1994), bem como se levado em consideração a variedade de células e diferentes formas de resposta aos compostos.

Anteriormente foi relatada a atividade antitumoral *in vivo* em ratos no modelo do carcinoma de Walker 256 de uma fração purificada obtida do rizoma da cucurbitácea *Wilbrandia verticilata*, conhecida popularmente por “cabeça-de-negro” e utilizada popularmente como antireumático. Essa fração purificada parecia conter duas novas norcucurbitacinas glicosiladas. Após 10 dias de tratamento, a fração na dose diária de 10mg/Kg causou aproximadamente 75% de inibição tumoral, enquanto que o tratamento com o quimioterápico ciclofosfamida na dose de 2,5mg/Kg/dia causou 82,9%, comparando com o grupo controle tratado com Ringer. Ao final do tratamento, alguns animais apresentaram diarreia, tremores e perda de peso.

Com o desenvolvimento de novas tecnologias, por exemplo, o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais, alguns dos agentes que antes falharam em estudos clínicos estão novamente sendo estudados. A habilidade de combinar agentes para carrear as moléculas diretamente para tumores específicos mostra promessa para efetivamente direcionar produtos naturais com alta toxicidade até os tumores enquanto evita seus efeitos adversos para tecidos normais (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Os achados apresentados aqui reforçam a importância que os produtos naturais ainda possuem para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes anticâncer mais eficazes e mais seletivos para as células tumorais. Adicionalmente, esse trabalho é de grande importância para o estudo das cucurbitacinas, visto que muito pouco se sabe sobre o modo de ação desses compostos em células tumorais *in vitro* e *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

Em sumário, os resultados apresentados indicam que a deacetilpicracina e a cucurbitacina $2\beta,3\beta,16\alpha,20(R),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-on são fitoquímicos promissores do ponto de vista antitumoral por apresentarem moderada atividade *in vitro* e *in vivo* e seletividade para células cancerosas, como observado no ensaio com células monoculeadas de sangue periférico humano e na análise histológica dos principais órgãos que são alvos de toxicidade de agentes quimioterápicos.

É mostrado que a deacetilpicracina induz parada do ciclo celular na fase S seguida de apoptose, associada à alteração do potencial transmembrana mitocondrial e a alterações morfológicas clássicas de apoptose. A cucurbitacina $2\beta,3\beta,16\alpha,20(R),25$ -pentahidroxi-cucurbita-5-en-22-on reduziu significativamente a massa do tumor Sarcoma 180 em camundongos *Mus musculus* Swiss sem causar sérios efeitos tóxicos aos órgãos analisados e, adicionalmente, parece atuar de modo imunoestimulante na defesa do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. M.; CORY, S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, p. 1-9, 2007.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.
- AHMED, B.; SLAM, T.; KHAN, S. A. Hepatoprotective activity of *Luffa echinata* fruits. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p.187–189, 2001
- ALARCON-AGUILAR, F. J.; HERNANDEZ-GALICIA, E.; CAMPOS-SEPULVEDA, A. E.; XOLALPA-MOLINA, S.; RIVAS-VILCHIS, J. F.; VASQUEZ-CARRILLO, L. I.; ROMAN-RAMOS, R. Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. **J. Ethnopharmacol.**, v. 82, p. 185-189, 2002.
- ALMEIDA, F. R. C.; RAO, V. S. N.; MATOS, M. E. O. Antiinflammatory, antitumour and antifertility effects in rodents of two nor-cucurbitacin glucosides from *Wilbrandia* species. **Phytother. Res.**, v. 6, p. 189-193, 1992.
- ALTMANN, K. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 5, p. 424–431, 2001.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2008**. [S.l.], 2008.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, p. 261–274, 2003.
- BARROSO, M. G. **Sistemática de angiosperma do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1978.
- BELOIN, N.; GBEASSOR, M.; AKPAGANA, K.; HUDSON, J.; SOUSSA, K.; KOUMAGLO, K.; ARNASON, J. T. Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 96, n. 1/2, p. 49-55, 2005.
- BERGMAN, P. J.; HARRIS, D. Radioresistance, chemoresistance, and apoptosis resistance. The past, present, and future. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 27, n. 1, p. 47-57, 1997.
- BEUTLER, J. A.; MCCALL, K. L.; HERBERT, K.; HERALD, D. L.; PETTIT, G. R.; JOHNSON, T. ; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Novel cytotoxic diterpenes from *Casearia arborea*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 5, p. 657-661, 2000.

BEZERRA, D. P.; MILITÃO, G. C. G.; CASTRO, F. O.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicol. in vitro**, v. 21, p. 1-8, 2007.

BÍBLIA. Português. **Bíblia sagrada**. Tradução na linguagem de hoje. São Paulo: Sociedade Bíblica do Brasil, 2006.

BLASKOVICH, M. A.; SUN, J.; CANTOR, A.; TURKSON, J.; JOVE, R.; SEBTI, S. M. Discovery of JSI-124 (Cucurbitacin I), a Selective Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Signaling Pathway Inhibitor with Potent Antitumor Activity against Human and Murine Cancer Cells in Mice. **Cancer Res.**, v. 63, p. 1270-1279, 2003.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará**. 3. ed. Fortaleza: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1976. 540 p.

BRÖKER, L. E.; KRUYT, F. A. E.; GIACCONE, G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, n. 9, p. 3155-3162, 2005.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, v. 22, p. 162–195, 2005.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 2141–2153, 2004.

CHANG, H. Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 821-846, 2000.

CHAVES, D. C.; ASSUNÇÃO, J. C. C.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q. Cucurbitacins from *Cayaponia racemosa*: isolation and total assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra. **Magn. Reson. Chem.**, v. 45, p. 389-392, 2007

CHEN, J. C.; CHIU, M. H.; NIE, R. L.; CORDELL, G. A.; QIU, S. X. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. **Nat. Prod. Rep.**, v. 22, p. 386–399, 2005.

CIBAS, E. S. Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology. **Diagn. Cytopathol.**, v. 13, p. 166–171, 1995.

COLLINS, S. J. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. **Blood**, v. 70, p. 1233-1244, 1987.

CORREIA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/ IBDF/ Imprensa Nacional, 1984.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 72–79, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural Products in Drug Discovery and Development. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 52-60, 1997.

DANTAS, I. N.; GADELHA, G. C.; CHAVES, D. C.; MONTE, F. J.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Studies on the cytotoxicity of cucurbitacins isolated from *Cayaponia racemosa* (Cucurbitaceae). **Z. Naturforsch. [C]**, v. 61, n. 9/10, p. 643-646, 2006.

DIMITROVA, D. S.; BEREZNEY, R. The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 4037-4051, 2002

DINAN, L.; HARMATHA, J.; LAFONT, R. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. **J. Chromatogr. A**, v. 935, n. 1/2, p. 105-123, 2001.

DINAN, L.; WHITING, P.; GIRAULT, J.; LAFONT, R.; DHADIALLA, T. S.; CRESS, D. E.; MUGAT, B.; ANTONIEWSKI, C.; LEPESANT, J. Cucurbitacins are insect steroid hormone antagonist acting at the ecdysteroid receptor. **Biochem. J.**, v. 327, p. 643-650, 1997.

DOMINGOS, P. M.; STELLER, H. Pathways regulating apoptosis during patterning and development. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 17, p. 1-6, 2007.

DUNCAN, K. L. K.; DUNCAN, M. D.; ALLEY, M. C.; SAUSVILLE, E. A. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 52, p. 1553-1560, 1996.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 16, p. 663-669, 2004.

EFFERTH, T.; LI, P. C. H.; KONKIMALLA, V. S. B.; KAINA, B. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. **Trends Mol. Med.**, v. 13, n. 8, p. 353-361, 2007.

ESCANDELL, J. M.; RECIO, M.; MÁÑEZ, S.; GINER, R.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J. Dihydrocucurbitacin B, isolated from *Cayaponia tayuya*, reduces damage in adjuvant-induced arthritis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 532, p. 145-154, 2006.

FADEEL, B.; ORRENIUS, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. **J. Intern. Med.**, v. 258, n. 6, p. 479 – 517, 2005

FAHY, J. Modifications in the « upper » or velbenamine part of the *Vinca* alkaloids have major implications for tubulin interacting activities. **Curr. Pharm. Des.**, v. 7, p. 1181-1197, 2001.

FANG, X.; PHOEBE JR., C. H.; PEZZUTO, J. M.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; YELLIN, B.; HECHT, S. M. Plant anticancer agents, XXXIV. Cucurbitacins from *Elaeocarpus dolichostylus*. **J. Nat. Prod.**, v. 47, n. 6, p. 988-993, 1984

FÁVARO, O. C. N.; OLIVEIRA, M. M. de; ROSSINI, M. A. A.; KAMAKURA, C. R.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R. Seleção por meio de células KB de substâncias e extratos potencialmente ativos em quimioterapia do câncer. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 62, n. 3, p. 217-224, 1990.

FISCHER, P. M.; GLOVER, D. M.; LANE, D. P. Targeting the cell cycle. **Drug Discov. Today**, v. 1, n. 4, p. 417-423, 2004.

- FOSTER, I. Cancer: a cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144-149, 2008
- FULLER, R. W.; CARDELLINA II, J. H.; CRAGG, G. M.; BOYD, M. R. Cucurbitacins: differential cytotoxicity, dereplication and first isolation from *Gonystylus keithii*. **J. Nat. Prod.**, v. 57, n. 10, p. 1442-1445, 1994.
- GALM, U.; SHEN, B. Natural products drug discovery: the times have never been better. **Chem. Biol.**, v. 14, p. 1098-1104, 2007.
- GARCIA, R.; JOVE, R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. **J. Biomed. Sci.**, v. 5, n. 2, p. 79-85, 1998.
- GARÓFOLO, A.; AVESANI, C. M.; CAMARGO, K. G.; BARROS, M. E.; SILVA, S. R. J.; TADDEI, J. A. A. C.; SIGULEM, D. M. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 491-505, out./dez. 2004.
- GONZALEZ, F. G.; DI STASI, L. C. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. **Phytomedicine**, v. 9, p. 125-134, 2002.
- GOODLETT, C. R.; HORN, K. H. Mechanisms of Alcohol-Induced Damage to the Developing Nervous System. **Alcohol Res. Health**, v. 25, n. 3, p. 175-184, 2001
- GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? **Trends Cell Biol.**, v. 8, p. 267-271, 1998.
- GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309-1312, 1998.
- GREENBLATT, M. S.; BENNETT, W. P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C. C. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. **Cancer Res.**, v. 54, p. 4855-4878, 1994.
- HA, H. C.; SNYDER, S. H. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 23, 13978-13982, 1999
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.
- HARDMAN, G.; LIMBIRD, L. **The pharmacological basis of therapeutics**. 9th ed. [S.l.]: International Edition, 1996.
- HARITUNIAN, T.; GUELLER, S.; ZHANG, L.; BADR, R.; YIN, D.; XING, H.; FUNG, M.C.; KOEFFLER, H. P. Cucurbitacin B induces differentiation, cell cycle arrest, and actin cytoskeletal alterations in myeloid leukemia cells. **Leuk. Res.**, v. 32, n. 9, p. 1366-1373, 2008.
- HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell cycle control and cancer. **Science**, v. 266, p. 1821-1828, 1994.
- HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, p. 629-634, 1989.

HORTA, M. F.; YOUNG, J. D. Apoptose: quando a célula programa a própria morte. **Ciênc. Hoje**, v. 25, n. 150, 1999.

HUERTA, S.; GOULET, E. J.; HUERTA-YEPEZ, S.; LIVINGSTON, E. H. Screening and detection of apoptosis. **J. Surg. Res.**, v. 139, n. 1, p. 143-156, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativas 2008**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2007. 94 p.

ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. **Stem Cells**, v. 17, n. 5, p. 306-313, 1999.

ITO, A.; CHAI, H. B.; LEE, D.; KARDONO, L. B.; RISWAN, S.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Ellagic acid derivatives and cytotoxic cucurbitacins from *Elaeocarpus mastersii*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 2, p. 171-174, 2002.

JAYAPRAKASAM, B.; SEERAM, N. P.; NAIR, M.G. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. **Cancer Lett.**, v. 189, p. 11-16, 2003.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of cell death signalling pathways. **Cancer Biol. Ther.**, v. 4, n. 2, p. 139-163, 2005

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 4, p. 161-165, 2005.

KAWAHARA, N.; KURATA, A.; HAKAMATSUKA, T.; SEKITA, S.; SATAKE, M. Two Novel Cucurbitacins, Neocucurbitacins A and B, from the Brazilian Folk Medicine "Buchinha" (*Luffa operculata*) and Their Effect on PEBP2aA and OCIF Gene Expression in a Human Osteoblast-Like Saos-2 Cell Line. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 49, n. 10, p. 1377—1379, 2001.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, 1972.

KESTER, M. S.; OUT-LUITING, J. J.; BORNE, P. A.; WILLEMZE, R.; TENSEN, C. P.; VERMEER, M. H. Cucurbitacin I Inhibits Stat3 and Induces Apoptosis in Sézary Cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 128, n. 7, p. 1691-1695, 2008.

KIM, B.; KAMESAKI, H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. **Int. J. Hematol.**, v. 68, n. 1, p. 29-43, 1998

KINGSTON, D. G. I. Recent advances in chemistry of taxol. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 726-734, 2000.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia**: bases patológicas das doenças. 7. ed. [S.l]: WB Saunders, 2004.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends Microbiol.**, v. 15, n. 6, p. 279-289, 2007.

LAVIE, D.; GLOTTER, E. The cucurbitanes, a group of tetracyclic triterpenes. **Fortschr. Chem. Org. Naturst.**, v. 29, p. 307-362, 1971.

- LEE, Y. L.; KIM, H. J.; LEE, M. S.; KIM, J. M.; HAN, J. S.; HONG, E. K.; KWON, M. S.; LEE, M. J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Exp. Anim.**, v. 52, p. 371-375, 2003.
- LIU, T.; ZHANG, M.; ZHANG, H.; SUN, C.; DENG, Y. Combined antitumor activity of cucurbitacin B and docetaxel in laryngeal cancer. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 10, n. 587, p. 78-84, 2008b.
- LIU, T.; ZHANG, M.; ZHANG, H.; SUN, C.; DENG, Y. Inhibitory effects of cucurbitacin B on laryngeal squamous cell carcinoma. **Eur. Arch. Otorrinolaryngol.**, 2008a. *in press*.
- MACHO, A.; DECAUDIN, D.; CASTEDO, M.; HIRSCH, T.; SUSIN, S. A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Chloromethyl-X-Rosamine is an aldehyde-fixable potential-sensitive fluochrome for the detection of early apoptosis. **Cytometry**, v. 25, p. 333-340, 1996.
- MACKLIS, J. D.; MADISON R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **J. Neurosci. Methods**, v. 31, p. 43– 46, 1990.
- MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present ad future. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 143-148, 2002.
- MARCHETTI, P.; CASTEDO, M.; SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; HIRSCH, T.; MACHO, A.; HAEFFNER, N.; HIRSCH, F.; GEUSKENS, M.; KROEMER, G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 1155–1160, 1996.
- MARTIN, P. A. W.; BLACKBURN, M.; SCHRODER, R. F. W.; MATSUO, K.; LI, B. W. Stabilization of cucurbitacin E-glycoside, a feeding stimulant for diabroticite beetles, extracted from bitter Hawkesbury watermelon. **J. Insect. Sci.**, v. 2, p. 19, 2002.
- MCGAHON, A. J.; MARTIN, S. M.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W. K.; GREEN, D. R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods Cell Biol.**, v. 46, p. 153-185, 1995.
- MELAMED, M. R.; MENDELSON, M.; MULLANEY, P. **Flow cytometry and sorting**. New York: John Wiley and Sons, 1979.
- METCALF, R. L. Cucurbitacins as kairomones for diabroticite beetles. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 77, n. 7, p. 3769-3772, 1980.
- MILITAO, G. C. G.; DANTAS, I. N. F.; PESSOA, C.; FALCÃO, M. J. C.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; CURI, R.; LIMA, T.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Induction of apoptosis by pterocarpan from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sci.**, v. 78, p. 2409-2417, 2006.
- MISHRA, K. P.; GANJU, L.; SAIRAM, M.; BANERJEE, P. K.; SAWHNEY, R. C. A review of high throughput screening for the screening of natural products. **Biomed. Pharmacother.**, v. 62, n. 2, p. 94-98, 2008
- MOLINARI, M. Cell cycle checkpointsand their inactivation in human cancer. **Cell Prolif.**, v. 33, p. 261-274, 2000.

MONTENEGRO, R. C.; JIMENEZ, P. C.; FEIO, F. R. A.; ANDRADE-NETO, M.; SILVA B. F.; MORAES, M. E.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic activity of pisosterol, a triterpene isolated from *Pisolithus tinctorius* (Mich.: Pers.) Coker & Couch, 1928. **Z. Naturforsch. [C]**, v. 59, n. 7/8, p. 519-522, 2004.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. Algonac, MI: Reference Publishing, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivor: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUSZA, L. L.; SPEIGHT, P.; McELHINEY, S.; BARROW, C. J.; GILLUM, A. M.; COOPER, R.; KILLAR, L. M. Cucurbitacins, cell adhesion inhibitors from *Conocarpus scoparioides*. **J. Nat. Prod.**, v. 57, n. 11, p. 1498-1502, 1994.

MYLES, D. C. Novel biologically active natural and unnatural products. **Pharm. Biotechnol.**, v. 14, p. 627-633, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products from marine invertebrates and microbes as modulators of antitumor targets. **Curr. Drug Targets**, v. 7, n. 3, p. 279-304, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; HOLBECK, S.; SAUSVILLE, E. A. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 2, n. 4, p. 279-308, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1022–1037, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 461-477, 2007.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

PAILARD, F.; FINOT, F.; MOUCHE, I.; PRENEZ, A.; VERICAT, J. A. Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new entities. **Toxicol. In Vitro**, v. 13, p. 693-700, 1999.

PARK, C. S.; LIM, H.; HAN, K. J.; BAEK, S. H.; SOHN, H. O.; LEE, D. W.; KIM, Y.; YUN, H.; BAEK, K. J.; KWON, N. S. Inhibition of nitric oxide generation by 23-24-dihydrocucurbitacin D in mouse peritoneal macrophages. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 309, n. 2, p. 705-710, 2004.

PETERS, R. R.; FARIAS, M. R.; RIBEIRO-DO-VALE, R. M. Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Planta Med.**, v. 63, p. 525-528, 1997.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

RAO, V. S.; ALMEIDA, F. R.; MORAES, A. P.; SILVA, J. V.; NASCIMENTO, S. C.; MORAES, M. O. Evaluation of the purified fraction of *Wilbrandia (c.f.) verticillata* for antitumour activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 43-45, 1991.

RECIO, M. C.; PRIETO, M.; BONUCELLI, M.; ORSI, C.; MÁÑEZ, S.; GINER, R. M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J. Anti-Inflammatory Activity of Two Cucurbitacins Isolated from *Cayaponia tayuya* Roots. **Planta Med.**, v. 70, p. 414-420, 2004.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacol. Ther.**, v. 99, p. 1-13, 2003.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; SOTHERRS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; SILVA, C. E.; MESQUITA, M. R.; PROCOPIO, L. C. **Flora da reserva Ducke**: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. [S.l.]: Ed. INPA, 1999.

RICCI, M. S.; ZONG, W. X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**, v. 11, p. 342 – 357, 2006

RIEGER, P. T. The biology of cancer genetics. **Semin. Oncol. Nurs.**, v. 20, n. 3, p.145-154, 2004.

RÍOS, J. L.; ESCANDELL, J. M.; CARMEN RECIO, M. New insights into the bioactivity of cucurbitacins. *In*: RAHMAN, A. (Ed.). **Studies in natural products chemistry**. [S.l.]: Elsevier Science, 2005., v. 32.

RÍOS, J. L.; GINER, R. M.; JIMÉNEZ, M. J.; WICKMAN G.; HANCKE J. L. A study on the anti-inflammatory activity of *Cayaponia tayuya* root. **Fitoterapia**, v. 61, p. 275–278, 1990.

RUPINDER, S. K.; GURPREET, A. K.; MANJEET, S. Cell suicide and caspases. **Vasc. Pharmacol.**, v. 46, p. 383–393, 2007.

SACHDEV-GUPTA, K.; RADKE, C. D.; RENWICK, A. A. Antifeedant activity of cucurbitacins from *Iberis amara* against larvae of *Pieris rapae*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 6, p. 1385-1388, 1993.

SARKER, S. D.; WHITING, P.; SIK, V.; DINAN, L. Ecdysteroid antagonists (cucurbitacinas) from *Physocarpus opulifolius* (Rosaceae). **Phytochemistry**, v. 50, p. 1123-1128, 1999.

SEHABEL JR, F. Surgical adjuvant chemotherapy of metastatic murine tumors. **Cancer**, v. 40, p. 558-568, 1977.

SHAPIRO, H. M. **Practical flow cytometry**. New York: Alan R. Liss, 1995.

SHI, X.; FRANKO, B.; FRANTZ, C.; AMIN, H.M.; LAI, R. JSI-124 (cucurbitacin I) inhibits Janus kinase-3/signal transducer and activator of transcription-3 signalling, downregulates nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK), and induces apoptosis in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma cells. **Br. J. Haematol.**, v. 135, n. 1, p. 26-32, 2006.

SIQUEIRA JR., J. M.; PETERS, R. R.; GAZOLA, A. C.; KREPSKY, P. B.; FARIAS, M. R.; ERA, G. A.; BRUM-FERNANDES, A. J.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Antiinflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Life Sci.**, v. 80, p. 1382-1387, 2007.

SMIT, H. F.; VAN DEN BERG, A. J. J.; KROES, B. H.; BEUKELMAN, C. J.; VAN UFFORD, H. C. Q.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R. P. Inhibition of T-lymphocyte proliferation by cucurbitacinas from *Picrorhiza scrophulariaeflora*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1300-1302, 2000.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. da C. Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra o câncer. **Fitos**, v. 3, n. 2, p. 25-41, 2007

SRIVASTAVA, V.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K.; GUPTA, M.; KHANUJA, S. P. S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, p. 5892-5908, 2005.

STORY, M.; KODYM, R. Signal Transduction During Apoptosis; Implications For Cancer Therapy. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. 365-375, 1998

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 217-245, 2000.

TAN, M. L.; SULAIMAN, S. F.; NAJIMUDDIN, N.; SAMIA, M. R.; MUHAMMAD, T. S. T. Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. **J. Ethnopharmacol.**, v. 96, n. 1/2, p. 287-294, 2005.

UTE, G.; BEN, S. Natural Product Drug Discovery: The Times Have Never Been Better. **Chem. Bio.**, v. 14, p. 1098-1104, 2007.

VERAS, M. L.; BEZERRA, M. Z.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LUTUFO, L. V. Cytotoxic epimeric withaphysalins from leaves of *Acnistus arborescens*. **Planta Med.**, v. 70, p. 551-555, 2004.

VASCONCELLOS, M. C.; MONTENEGRO, R. C.; MILITAO, G. C. G.; FONSECA, A. M.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. **Z. Naturforsch. [C]**, v. 60, n. 5/6, p. 394-398, 2005.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 1998 - Life in the 21st century: a vision for all.** Geneva, 1998.

WU, P.; LIN, F.; WU, T.; KUOH, C.; LEE, K.; LEE, S. Cytotoxic and anti-HIV principles from the rhizomes of *Begonia nantoensis*. **Chem. Pharma Bull.**, v. 52, n. 3, p. 345-349, 2004.

YANG, L.; WU, S.; ZHANG, Q.; LIU, F.; WU, P. 23,24-dihydrocucurbitacin B induces G2/M cell cycle arrest and mitochondrial-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37). **Cancer Lett.**, v. 256, p. 267-278, 2007.

ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes Dev.**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2006

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S. C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Lett.**, v. 175, p. 17–25, 2002.