

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

**DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO CITOTÓXICA DE ALGUNS
COMPOSTOS EXTRAÍDOS DE PLANTAS DO NORDESTE BRASILEIRO**

CLAUDIA DO Ó PESSOA

Fortaleza – Ceará

2000

UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
Nº. R 1307330.	
04 / 07	1000

OK

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

**DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO CITOTÓXICA DE ALGUNS
COMPOSTOS EXTRAÍDOS DE PLANTAS DO NORDESTE BRASILEIRO**

CLAUDIA DO Ó PESSOA

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Fortaleza – Ceará

2000

FICHA CATALOGRÁFICA

P567d Pessoa , Claudia do Ó
2000 Determinação do mecanismo de ação citotóxica de alguns compostos extraídos de plantas do Nordeste Brasileiro / Claudia do Ó Pessoa – Fortaleza, 2000.
129 f: il,
Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.
Tese (Doutorado). Universidade federal do Ceará.
Faculdade de Medicina. Departamento de Fisiologia e Farmacologia.
1. Toxicidade. 2. citotoxicidade. 3. Antineoplásico,
4. Plantas Medicinais I Título.

CDD: 615. 9

Esta Tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências da Saúde da referida universidade.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Claudia do Ó Pessoa

Tese aprovada em 30 de junho de 2000.

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
Depto. de Fisiologia e Farmacologia, UFC
Orientador da Tese

Prof. Dr. Albert Leyva
University of Kansas City, USA
Professor Visitante da UFC
co-Orientador da Tese

Profa. Dra. Sílvia Helena Rabenhorst
Depto. de Patologia e Med. Legal, UFC

Profa. Dra. Norma Lucena
Pesquisadora Adjunta da FIOCRUZ, Recife-PE

Profa. Dra. Telma Leda Lemos
Depto. de Química Orgânica, UFC

**A Deus, que sempre ajudou-me a superar
a distância da minha família**

Ao meu companheiro, amigo, cúmplice e inseparável Cidrão, nas alegrias e tristezas compartilhadas a cada dia.

**Aos meus pais, Clóvis e Neide Pessoa,
irmãos, sobrinhos, cunhados, e à minha
avó Odete que me incentivaram e
apoiaram nessa caminhada.**

“Aprender, ouvir, refletir, falar, tomar decisões, acertar, errar e começar de novo, rir, vibrar, lutar... Enfim, vencer, realizando o que era apenas sonho, construindo um mundo melhor”

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos especiais a todos que contribuíram para minha formação acadêmica, porque, na ciência como na vida, depende de nós e de todos aqueles que se fizeram presentes nos apoiando e incentivando, o sucesso da nossa caminhada. Que o espetáculo seja melhor a cada dia, sejam quais forem os obstáculos, sejam quais forem os desafios.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. *Manoel Odorico de Moraes Filho* pela sua inestimável orientação científica, humana e paciência demonstrados em todos os momentos de trabalho em comum. Meu muito obrigada.

Ao meu co-Orientador e amigo Prof. Dr. *Albert Leyva* pelo seu apoio logístico e laboratorial no decorrer desse trabalho e na receptividade ao seu laboratório no *The Children's Mercy Hospital*, Kansas City, EUA.

Às Profas. Dras. *Yara Gomes* e *Norma Lucena* pelo acesso aos seus laboratórios no Centro de Pesquisa Ageu Magalhães – FIOCRUZ, em Recife-PE.

À Profa. Dra. *Sílvia Helena Habenhorst* pela amizade e apoio na revisão literária.

Aos Profs. Drs. *Telma Lemos*, *Otília Pessoa* e *Edilberto Silveira* pela colaboração junto ao Depto. de Química Orgânica e por terem cedido as substâncias a serem estudadas.

Aos Profs. *Alberto Melo Soares* e *Antônio Demetrius Araújo* pela amizade, incentivo e companheirismo durante toda a minha formação docente.

Aos amigos *Ana Paula Torres*, *Ana Rosa Almeida* e *Moisés Vidal* pelo companheirismo, apoio e carinho em todos os momentos de busca na minha vida.

Aos pós-graduandos *Patrícia Bonavides, Rômulo Feio Farias, Raimundo Gonzalez e Paulo Ferdinando Oliveira* pelo coleguismo.

Ao *Curso de Pós-Graduação em Farmacologia*, na pessoa do Prof. Dr. *Ronaldo de Albuquerque Ribeiro* pelo apoio e incentivo na conclusão do trabalho.

Aos bolsistas e estagiários *Raquel Montenegro, Mário Henrique Girão, João Paulo Caxilé, Sérgio Fortier, Hélio Nobre, Mário Jales, Daniel Magalhães e Fernando Meton* pela dedicação e esforço para execução desta Tese e, certamente, sem a colaboração deles, tudo seria bem mais difícil.

Aos técnicos de laboratório *Silvana França, Fátima Teixeira, Francisco Evanir, Paulo Sérgio de Oliveira e Mineo* que jamais se negaram a prestar ajuda pessoal.

Às Profas. *Ana Maria Araújo e Norma Linhares* pela ajuda na análise estatística e revisão bibliográfica, respectivamente.

Aos Profs. do Depto. de Fisiologia e Farmacologia, em especial aos colegas do setor de Fisiologia, pelo apoio, compreensão e disponibilidade para realização deste trabalho. -

Às secretárias *Marta Célia Araújo, Flávia Aguiar, Maria Tereza Rocha, Joana Barbosa, Rejane Teixeira e Sílvia Lima* pelo grande carinho e consideração a quem sempre dispensaram-me atenção.

Ao digitador/operador *Sílvia Alves* pela amizade e presteza no trabalho de revisão da digitação.

Ao *Laboratório Clementino Fraga*, na pessoa do Prof. Dr. *Ajax Queiroz*, que disponibilizou a referida estrutura sempre que requisitada.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), pelo apoio financeiro, sem o qual seria impossível a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xviii
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
I. INTRODUÇÃO	1
1. O Câncer	1
2. Produtos Naturais	3
3. Testes de Citotoxicidade	6
4. Histórico do Modelo de <i>Screening</i>	6
4.1. Testes <i>in vitro</i>	6
4.2. Testes <i>in vivo</i>	8
5. Plantas Usadas no Estudo	9
5.1. <i>Auxemma oncocalyx</i> Taub	9
5.2. <i>Egletes viscosa</i> Less	12
5.3. <i>Croton sonderianus</i>	12
5.4. <i>Zanthoxylum gardnerii</i>	13
5.5. <i>Dypteryx lacunifera</i>	14
5.6. <i>Trigonia fasciculata</i>	14
5.7. <i>Jatropha ellipticã</i> Muell Arg	15
6. Desenvolvimento de Novas Drogas	17
7. Drogas Antineoplásicas	17
8. Divisão das Drogas Citotóxicas	20
8.1. Drogas antineoplásicas que causam dano ao DNA	20
8.2. Inibidores da topoisomerase	20
8.3. Antibióticos citotóxicos	23
8.3.1. Antracéclinas	23

8.3.2.	Mitoxantrona	24
9.	Eventos Celulares após o Dano ao DNA	25
10.	Medida da Atividade Metabólica Celular	26
10.1.	Apoptose	26
10.2.	Análise da Citotoxicidade	28
10.2.1.	Análise do MTT	27
10.3.	Dano ao DNA	29
10.3.1.	Método de fluorescência com bisbenzamida	29
10.4.	Análise da síntese de DNA: 5-Bromodeoxiuridina (5-BrdU)	30
11.	Oncologia Experimental	31
	II. OBJETIVOS	34
1.	Geral	34
2.	Específicos	34
	III. MATERIAIS E MÉTODOS	35
1.	Reagentes	35
2.	Equipamentos	36
3.	Materiais Diversos	37
4.	Soluções	38
4.1.	Solução salina tamponada de fosfato	38
4.2.	Solução de PBS a 10 mM de fosfato de sódio	38
4.3.	Solução de PBS a 50 mM de fosfato de sódio	38
4.4.	Solução fluorocromo de bisbenzamida	38
4.5.	Solução salina tamponada de fosfato com EDTA (PBS/EDTA)	39
4.6.	Solução de TdT <i>working strength</i>	39
4.7.	Solução <i>working strength stop/wash</i>	39
4.8.	Solução cromogeno DAB	39
4.9.	Solução de MTT	39
4.10.	Solução de TEP	39
4.11.	Solução de TEMP	40
4.12.	Solução tampão lise de NP-40	40

4.13.	Solução de 100 mM de PMSF	40
4.14.	Soro fetal bovino	40
4.15.	Bicarbonato de sódio	40
4.16.	Preparação de agarose	40
4.17.	Meio RPMI	40
5.	Obtenção das Substâncias Usadas nos Testes	41
6.	Derivados da Oncocalyxona A	41
7.	Linhagens Celulares	42
8.	Viabilidade Celular	43
9.	Congelamento das Células	43
10.	Descongelação das Células	44
11.	Análise do MTT	44
12.	Análise da Fluoresceína com Bisbenzamida: Dano ao DNA	45
13.	Imunohistoquímica	46
13.1.	Análise do TUNEL	46
13.2.	Análise da 5-Bromodeoxiuridina	48
14.	Imunofluorescência	50
14.1.	Expressão da fosfatidilserina na membrana celular	50
15.	Eletroforese	51
15.1.	Análise da topoisomerase II	51
16.	Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)	53
16.1.	Comparação da oncocalyxona A com a fração clorofórmica da <i>Auxemma oncocalyx</i> (FCAO)	53
17.	Teste da Atividade Antitumoral	53
17.1.	Escolha do animal	53
17.2.	Via de administração	53
17.3.	Preparação das soluções	54
17.4.	Determinação da toxicidade aguda	54
17.5.	Avaliação da atividade antitumoral	55
18.	Análise Estatística	56

IV. RESULTADOS	57
1. Citotoxicidade de Compostos Obtidos de Plantas do Nordeste Brasileiro	57
2. Dano ao DNA nas Células CEM	60
3. Avaliação da Inibição da Síntese de DNA nas Células CEM	63
4. Avaliação da Indução à Apoptose	68
5. Estudo da Citotoxicidade dos Compostos Oncocalyxonas A e C Comparados com a Mitoxantrona e Doxorrubicina	71
6. Valores Comparativos da IC ₅₀ da Oncocalyxona A e seus Derivados	74
7. Dano ao DNA após Exposição dos Derivados da Oncocalyxona A	77
8. Análise da Topoisomerase II	80
9. Sobrevida dos Animais Inoculados com Carcinoma de Ehrlich	82
10. Sobrevida dos Animais Inoculados com o Sarcoma 180	87
11. Avaliação do Peso dos Animais Durante a Observação de Sobrevida	92
12. Comparação da Citotoxicidade dos Cromatogramas da Oncocalyxona A com a Fração Clorofórmica da <i>Auxemma oncocalyx</i>	92
13. Determinação da Toxicidade Aguda	94
14. Inibição do Crescimento Tumoral	96
V. DISCUSSÃO	101
VI. CONCLUSÃO	115
VII. BIBLIOGRAFIA	116

LISTA DE ABREVIATURAS

5-BrdU	– 5-Bromodeoxiuridina
Ac2/Py	– Anidrido acético piridina
AOE	– Fração Clorofórmica da <i>Auxemma oncocalyx</i>
APAAP	– Alcalina fosfatase anti-alcalina fosfatase
Clerodano A	– Acetato da lactona do ácido hautrivaico
Clerodano B	– 2,3,4-trihidroxi-3,4-dihidroanoneno
CNSC	– Chemotherapy National Service Centre
CRC	– United Kingdom's Cancer Research Campaign
DAB	– Diaminobenzidina
DL₅₀	– Dose letal que mata 50% dos animais
DMSO	– Dimetilsufóxido
DNA	– Ácido desoxiribonucleico
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético
EORTC	– European Organisation for Research on Treatment of Cancer
FCAO	– Fração Clorofórmica da <i>Auxemma oncocalyx</i>
HEPES	– N-2-hydroxetil piperazine-N-2-etano ácido sulfônico
IC₅₀	– Concentração que inibe 50% do crescimento celular
INCA	– Instituto Nacional do Câncer
JFCR	– Japanese Foundation for Cancer Research
MTT	– 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
NCI	– National Cancer Institute
NP-40	– Tergitol NP-40 (monofenoxy poletoxi etanol)
PBS	– Phosphate Buffer Solution
PhSeLe	– Fenilselênio
PhSeCl	– Cloreto de fenil selênio

SBF	– Soro bovino fetal
TdT	– Terminal deoxinucleotidio transferase
TEMP	– Tampão de extração do núcleo
TEP	– Tampão de preservação do núcleo
TUNEL	– Terminal deoxinucleotideo transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling
Xantona A	– 1,7-dihidroxi-3,4,8-trimetoxi-xantona
XXT	– 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-5-(fenilamino)-carboxil-2- H-tetrazolium hidróxido

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Nomenclatura e origem dos fitoquímicos	16
Tabela 2	– Derivados da oncocalyxona A	42
Tabela 3	– Linhagens celulares	43
Tabela 4	– Preparação da reação na análise da topoisomerase	52
Tabela 5	– Valores da IC ₅₀ dos compostos obtidos de plantas do Nordeste do Brasil nas células CEM, SW-1573 e CCD-922	58
Tabela 6	– Inibição da síntese de DNA nas células CEM	65
Tabela 7	– Percentual de avaliação da indução à apoptose	68
Tabela 8	– Valores das IC ₅₀ em diferentes linhagens celulares	72
Tabela 9	– Citotoxicidade dos compostos das oncocalyxonas A e C, mitoxantrona e doxorubicina em linhagens pulmonares multiresistentes às drogas	73
Tabela 10	– Determinação da IC ₅₀ dos compostos derivados da oncocalyxona A (1,4-antracenedionas) nas células CEM e SW-1573	76
Tabela 11	– Determinação da toxicidade aguda – DL ₅₀	95
Tabela 12	– Inibição do crescimento tumoral	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– <i>Auxemma oncocalyx</i> Taub (Boraginaceae) no município de Pentecoste-CE	11
Figura 2	– Ciclo celular	19
Figura 3	– Ação citotóxica dos compostos obtidos de plantas nas células CEM	59
Figura 4	– Determinação do dano ao DNA nas células CEM durante 3 h de incubação	61
Figura 5	– Determinação do dano ao DNA nas células CEM durante 24 h de incubação	62
Figura 6	– Determinação do número de células	64
Figura 7	– Reação imuno-histoquímica para evidenciação da incorporação da 5-BrdU nas células CEM	66
Figura 8	– Reação imuno-histoquímica para evidenciação da incorporação da 5-BrdU nas células CEM	67
Figura 9	– Avaliação da indução à apoptose na presença da oncocalyxona A, por imuno-histoquímica	69
Figura 10	– Visualização da indução à apoptose através da expressão da fosfatidilserina	70
Figura 11	– Ação citotóxica dos compostos derivados da oncocalyxona A nas células CEM	75
Figura 12	– Determinação do dano ao DNA nas células CEM durante 24 h de incubação	78
Figura 13	– Determinação do dano ao DNA nas células CEM durante 24 h de incubação	79
Figura 14	– Análise da topoisomerase II em gel de eletroforese (1% de agarose)	81

Figura 15	– Porcentagem de sobrevida dos animais com Carcinoma de Ehrlich pertencentes aos grupos Controle e AOE (50 mg/Kg)	83
Figura 16	– Porcentagem de sobrevida dos animais com Carcinoma de Ehrlich pertencentes aos grupos Controle e 5-FU (20 mg/Kg)	84
Figura 17	– Porcentagem de sobrevida dos animais com Carcinoma de Ehrlich pertencentes aos grupos Controle e AOE (70 mg/Kg)	85
Figura 18	– Porcentagem de sobrevida dos animais com Carcinoma de Ehrlich pertencentes aos grupos Controle e 5-FU (40 mg/Kg)	86
Figura 19	– Porcentagem de sobrevida dos animais com Sarcoma 180 pertencentes aos grupos Controle e AOE (50 mg/Kg)	88
Figura 20	– Porcentagem de sobrevida dos animais com Sarcoma 180 pertencentes aos grupos Controle e 5-FU (20 mg/Kg)	89
Figura 21	– Porcentagem de sobrevida dos animais com Sarcoma 180 pertencentes aos grupos Controle e AOE (70 mg/Kg)	90
Figura 22	– Porcentagem de sobrevida dos animais com Sarcoma 180 pertencentes aos grupos Controle e 5-FU (40 mg/Kg)	91
Figura 23	– Cromatograma comparativo da fração clorofórmica da <i>Auxemma oncocalyx</i> e da oncocalyxona A no comprimento de onda de 254 nm	93
Figura 24	– Análise da citotoxicidade das frações da <i>Auxemma oncocalyx</i> Taub e oncocalyxona A coletadas no HPLC	93
Figura 25	– Inibição do crescimento tumoral no Carcinoma de Ehrlich após 10 dias de tratamento	97
Figura 26	– Inibição do crescimento tumoral no Sarcoma 180 após 10 dias de tratamento	98
Figura 27	– Inibição do crescimento tumoral na Linhagem Leucêmica L1210 após 10 dias de tratamento	99

RESUMO

DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO CITOTÓXICA DE ALGUNS COMPOSTOS EXTRAÍDOS DE PLANTAS DO NORDESTE BRASILEIRO

Universidade Federal do Ceará
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia
Tese de Doutorado em Farmacologia, UFC, 2000
Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Claudia do Ó Pessoa

Onze compostos originados de plantas do Nordeste Brasileiro foram avaliados quanto aos seus efeitos antiproliferativos em células tumorais humanas CEM (leucemia) e SW-1573 (pulmão), e em células normais humanas CCD-922 (fibroblasto), pelo método do MTT. Cinco desses compostos foram selecionados com valor de IC₅₀ menor que 10 µg/mL nas linhagens de células tumorais. Dentre os compostos, a Jatrofona mostrou citotoxicidade inespecífica, com valores de IC₅₀ menores que 1 µg/mL para as três linhagens. Enquanto que um diterpeno e um flavanóide, ambos da *Egletes viscosa* (família da Compositae), tiveram moderada atividade. O acetato da lactona do ácido hautrivaico (clerodano A) teve uma citotoxicidade com valores de 6, 6 e 10 µg/mL e o 4'5-dihidroxi-3,3',7,8-tetrametoxi-flavona (ternatina) com IC₅₀ de 2, 2 e 10 µg/mL nas células CEM, SW-1573 e CCD-922, respectivamente. As oncocalyxonas A (*rel*-8α-hidroxi-5-hidroxi-metil-2-metoxi-8αβ-metil-7,8,8a,9-tetrahidro) e C (*rel*-10α,11β-epoxi-11α-etoxi-8α-hidroxi-2-metoxi-8αβ-metil-5,6,7,8,8a,9,10,10aβ-octahidro), ambas 1,4-antraquinonas originadas da *Auxemma oncocalyx* (família da Boraginaceae), com IC₅₀ de 0,8-2, 7-8 e 12-13 µg/mL mostraram maior citotoxicidade e especificidade nas células CEM, SW-1573, CCD-922 respectivamente. Esses quatro últimos compostos foram examinados, em relação à sua reatividade com DNA, pela análise da incorporação à 5-BrdU e indução à apoptose (análise do TUNEL e Anexina V). Com exceção da ternatina, os demais compostos causaram dano ao DNA, marcada inibição da incorporação à 5-BrdU e forte indução à apoptose. Os derivados da oncocalyxona A obtidos por cloração e acetilação foram menos citotóxicos e reativos do que o composto original nas células leucêmicas humanas. A citotoxicidade da oncocalyxona A, quando comparada com outras drogas anticâncer pertencentes ao grupo das antraquinonas, apresenta baixa potência. Todavia, nas células multiresistentes, a sensibilidade à doxorubicina diminuiu 10 a 500x, enquanto que a citotoxicidade à oncocalyxona A foi moderadamente reduzida 2x. Estudo *in vivo* mostrou inibição significativa no crescimento tumoral de aproximadamente 42% e 50% nos tumores da linhagem L1210 e no Carcinoma de Ehrlich, respectivamente. Concluímos que a oncocalyxona A (1,4-antraquinona), uma nova benzoquinona, com potencialidade terapêutica na quimioterapia do câncer, que possivelmente envolve reatividade ao DNA, levando à apoptose, as células cancerígenas.

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE MECHANISM OF ACTION OF CYTOTOXIC COMPOUNDS EXTRACTED FROM PLANTS OF NORTHEAST BRAZIL

Federal University of Ceará
Postgraduate Pharmacology Program
Supervisor: Manoel Odorico de Moraes Filho, Ph.D.
Ph.D. in Pharmacology, UFC, 2000

Claudia do Ó Pessoa

Eleven phytochemicals derived from plants to Northeast Brazil were studied for their antiproliferative effects in the human tumor cell lines CEM (leukemia) and SW-1573 (lung tumor), and in the normal human fibroblast cell line CCD-922. Using the MTT microtiter assay, five compounds were found to have IC₅₀ values less than 10 µg/mL in the tumor cell lines. Jatrophone showed non-specific cytotoxicity, with IC₅₀ values less than 1 µg/mL for all three cell lines. Meanwhile, a diterpenoid and a flavanoid, both from *Egletes viscosa* (Compositae family) had moderate activity. The 12-acetoxy hautriwaic acid lactone (clerodane A) was cytotoxic, with IC₅₀ values of 6, 6 and 10 µg/mL, while 4',5-dihydroxy-3,3',7,8-tetramethoxy-flavone (ternatin) was growth-inhibitory, with IC₅₀ values of 2, 2 and 10 µg/mL in CEM, SW-1573 and CCD-922, respectively. Those compounds showing more differential cytotoxicity were oncocalyxones A, (*rel*-8 α -hydroxy-5-hydroxymethyl-2-methoxy-8 β -methyl-7,8,8a,9-tetrahydro-1,4-anthracenedione) and C (*rel*-10 α ,11 β -epoxy-11 α -ethoxy-8 α -hydroxy-2-methoxy-8 β -methyl-5,6,7,8,8a,9,10,10 β -octahydro-1,4-anthracenedione), both derived from *Auxemma oncocalyx* (Boraginaceae family), with IC₅₀ values of 0.8-2, 7-8 and 12-13 µg/mL in CEM, SW-1573 and CCD-922, respectively. These four latter compounds were examined for their DNA reactivity, with regard to inhibition of DNA synthesis (5-BrdU incorporation) and induction of apoptosis (TUNEL assay and annexin V binding). Except for ternatin, these compounds caused DNA damage, marked inhibition of 5-BrdU incorporation, DNA strand breaks and strong induction of apoptosis. Derivatives of oncocalyxone A obtained by chlorination and acetylation were less cytotoxic relative to the parent compound when tested against human leukemia cells. The cytotoxicity of oncocalyxone A, when compared with other anticancer drugs belonging to the anthraquinone group, showed a low potency. Nonetheless, in multidrug resistant tumor cells with 10 to 500 fold lower sensitivity to doxorubicin, oncocalyxone A cytotoxicity was only moderately reduced twofold. In vivo, studies showed substantial inhibition of tumor growth of approximately 42% and 50% in L1210 leukemia and Ehrlich carcinoma, respectively. Oncocalyxone A (1,4-anthracenedione) could be considered as a new benzoquinone, with therapeutic potential in cancer chemotherapy, that possibly involving DNA reactivity leading to apoptosis in the cancer cells.

I. INTRODUÇÃO

1. O Câncer

O termo câncer é a tradução latina da palavra de origem grega carcinoma (karkino, crustáceo). Foi usada pela primeira vez por Galeno, aproximadamente em 132-201 a.C., para indicar um tumor maligno de mama em que as veias superficiais desse órgão apareciam intumescidas e ramificadas, assemelhando-se a pata de um caranguejo (Kardinal & Yarbo, 1979). A palavra câncer é usada para identificar um grande número de processos patológicos complexos e diferentes que envolvem divisão celular desordenada em diversos tipos de tecidos (Heppner & Miller, 1998).

A maioria dos cânceres está, sem sombra de dúvidas, relacionada a agentes etiológicos ambientais ou hereditários, tais como: mutações espontâneas, substâncias químicas, vírus, radiações ionizantes e bactérias. A susceptibilidade ao câncer pode se manifestar através das diferenças herdadas de uma classe especial de genes envolvidos com a proliferação celular, apoptose e/ou sistema de reparo do DNA, ou decorrente de alterações somáticas na expressão desses mesmos genes (Perera, 1997).

A idéia de que substâncias químicas podem desencadear a formação de tumores é bem antiga. Em 1775, Sir Percival Pott, na Inglaterra, verificou cânceres no escroto de limpadores de chaminé, o que foi por ele relacionado ao contato destes com a fuligem e o carvão. Em 1876, na Alemanha, Volkman observou câncer de pele em trabalhadores que manipulavam alcatrão e hulha (Pott, 1987). Vinte anos mais tarde, em Frankfurt, Rehn relatou uma maior incidência de câncer de bexiga em pessoas que trabalhavam na seleção manual de cristais de anilina (Fleck, 1992).

Os fatores pré-disponentes ao câncer passaram a ser investigados com maior atenção a partir da década de 60, com a aceitação em 1965 do cigarro como

sendo o maior causador de câncer de pulmão. Estudos epidemiológicos revelaram taxas de incidência em diferentes tipos de câncer nas diversas regiões do mundo. Por exemplo, no Japão, há maior incidência de câncer de estômago, devido aos hábitos alimentares, enquanto que a taxa de neoplasias de mama e de cólon é muito baixa. Nos Estados Unidos, essa proporção se inverte, mas quando um destes grupos étnicos migra de seu país de origem, pode deixar de desenvolver aquele tipo de câncer predominante da sua região original (Coelho, 1998).

A importância do câncer na área de saúde pública vem aumentando à medida que ocorre o controle progressivo de outras doenças. O avanço da ciência e da tecnologia tem possibilitado a melhoria dos meios de diagnóstico e de tratamento, que aliados ao desenvolvimento sócio-econômico contribuem para um declínio das taxas de mortalidade por enfermidades controláveis, tais como a tuberculose, a desnutrição, o diabetes mellitus e outras afecções. O câncer é a 2^a causa de morte no Brasil em números absolutos, subsequente às doenças cardiovasculares, quando não são considerados os óbitos por causas externas (BRASIL, 1999). A análise da tendência temporal mostra um aumento significativo de sua participação percentual dentre todos os óbitos durante as últimas décadas, fazendo com que as neoplasias malignas ocupem, progressivamente, maior dimensão em termos de mortalidade no Brasil, constituindo assim, um importante problema de saúde pública. Segundo estimativas do Ministério da Saúde, mais de 280.000 novos casos de câncer são esperados para o ano 2000 (BRASIL, 1999).

2. Produtos Naturais

As plantas têm historicamente um papel importante no tratamento das doenças. A medicina tradicional, baseada no uso de produtos obtidos a partir de plantas, é responsável por aproximadamente 85% dos medicamentos em países subdesenvolvidos. Um grande número de atividades farmacológicas é mediada por

estas drogas, as quais estão correntemente em uso, como os glicosídeos cardiotônicos (digitálicos), anticolinérgicos (alcalóide atropa beladona), analgésicos e antitussígenos (alcalóides do ópio), antihipertensivos (reserpina), colinérgicos (pilocarpina), anestésicos (cocaina), relaxantes musculares (tubocurarina) e agentes antitumorais (vimblastina e paclitaxel) (Pezzuto, 1997). Os produtos naturais representam 25% das prescrições de drogas no mercado Americano, que em 1990 aproximou-se de US\$ 15,5 bilhões.

Muitas drogas correntemente em uso na terapia do câncer foram descobertas de forma racional, baseadas no desenho da estrutura, e muitas outras têm sido descobertas por processos empíricos. A avaliação da atividade antineoplásica dessas drogas, através de programas de *screening*, começou com a mostarda nitrogenada, em 1940, e hoje existem mais de 50 drogas anticâncer viáveis. Muitas dessas que são utilizadas na prática médica foram derivadas de produtos naturais como: Paclitaxel e Docetaxel (*Taxus brevifolia* L.), Vimblastina e Vincristina (*Catharanthus roseus* G. Don), Tenoposida e Etoposida (*Podophyllum peltatum*) e Camptotecina (*Camptotheca acuminata* Decne) (Cordell *et al.*, 1992). O sucesso terapêutico dessas substâncias estimula a procura de novos agentes quimioterápicos derivados de produtos naturais.

O uso de drogas antineoplásicas derivadas de plantas se iniciou há mais de 40 anos, quando Noble e cols. (Hartwell *et al.*, 1969) usaram estudos etnofarmacológicos para catalogar alguns produtos naturais usados pelos indígenas. As folhas da planta Jamaica Vinca rósea eram utilizadas por esses índios, inicialmente, como chá hipoglicemiante. Entretanto, os estudos iniciais do extrato dessas folhas, administrado oralmente para ratos e coelhos, não constatou diminuição significativa nos níveis plasmáticos de açúcar. Por outro lado, quando esse extrato foi administrado por via intraperitoneal, induziu uma potente mielossupressão, matando os animais entre 7 e 10 dias. Estudos químicos identificaram a Vincalécoblastina como componente ativo, a qual se mostrou,

posteriormente, efetiva no tratamento de alguns sarcomas, do adenocarcinoma mamário e de alguns tipos de leucemias e linfomas, atuando através da inibição da formação de microtúbulos durante a divisão celular (Budd *et al.*, 1983).

Contudo, a descoberta do Paclitaxel (Taxol®) foi feita através de uma escolha aleatória e que não teve base na medicina popular. O composto demonstrou marcante atividade antitumoral, evidenciada, inicialmente, no tratamento dos cânceres de mama e ovário, e posteriormente, estendida para outros tipos de tumores. O Paclitaxel foi isolado a partir de um produto natural, a casca da *Taxus brevifolia*, em que o seu mecanismo de ação citotóxico ocorre através da estabilização dos microtúbulos (Slichenmeyer & Von Hoff, 1990; Holmes *et al.*, 1991).

Diversos produtos naturais continuam a ser investigados. Mais recentemente, foi evidenciada uma potente atividade num composto obtido da casca da *Camptotheca acuminata*, uma árvore utilizada na medicina popular chinesa, cuja substância ativa é a Camptotecina, inibidora da enzima topoisomerase I (Wall & Wani, 1977). Desta, outros derivados foram obtidos, como o topotecan e a camptoteca (CPT-11), e o 9-aminocamptotecina. Todas essas têm apresentado significativa atividade antitumoral (Cragg & Newman, 1999).

Novos compostos naturais e semi-sintéticos vêm sendo usados com eficiência numa grande variedade de tumores. O Taxotere, e alguns alcalóides semi-sintéticos obtidos a partir da vincristina, como vinorelbine (Navelbine®), bem como o análogo da camptotecina, o hidroclorado de topotecan (Hycamtin®), têm demonstrado ótimos resultados em tumores humanos (Rowe, 1996; Dancey & Eisenhaver, 1996). Indubitavelmente, drogas derivadas de plantas têm um importante papel na quimioterapia do câncer.

Aproximadamente 20.000 espécies de plantas são utilizadas na medicina tradicional, sendo que a maioria das espécies não foi avaliada química ou farmacologicamente. É bem conhecido que as plantas produzem uma grande variedade de moléculas químicas, e por isto, apresentam uma potencial atividade farmacológica. Técnicas modernas utilizam ensaios para ligação específica de compostos a receptores ou enzimas, e tais ensaios podem ser utilizados para orientar o fracionamento de complexas misturas de agentes químicos presentes nos extratos de plantas. O rápido crescimento da informática e uma combinação de técnicas químicas, biológicas e moleculares podem ser usadas para isolamento e identificação de novas drogas e análogos (Cragg *et al.*, 1997).

Apesar do considerável arsenal de drogas já existente para o tratamento do câncer e para o sucesso terapêutico em vários tipos de neoplasias, ainda não se chegou ao composto ideal. Por isso, continua a busca incessante de novos compostos mais específicos para a célula tumoral, com menos efeitos colaterais, maior potência terapêutica e menor índice de resistência. Várias metodologias vêm sendo empregadas no sentido de identificar novas drogas antitumorais de ocorrência natural, por exemplo, o *screening* de fitocompostos, no qual a informação etnofarmacológica é o ponto de partida.

3. Testes de Citotoxicidade

Os testes para estabelecer o potencial citotóxico das drogas utilizando cultura celular ganharam impulso quando Wright e cols., em 1981, relataram uma boa correlação entre as respostas encontradas nos estudos utilizando cultura celular com as encontradas nos tumores *in vivo*. Quando comparados os dados obtidos *in vitro* com os da clínica, foi observado 90% de similaridade em relação à resistência às drogas e 60% quanto à sensibilidade (Hamburger, 1981; Daidone *et al.*, 1985). Essa relação entre a sensibilidade à droga *in vitro*, exibida pela cultura primária de

tumores com os achados clínicos, possibilitou o uso desses testes no programa de validação das drogas.

Quando se trabalha com cultura celular, alguns termos devem ser definidos e diferenciados dos estudos *in vivo*. Assim, pode-se definir citotoxicidade como a toxicidade para células tumorais em cultura, não devendo-se usar os termos antitumoral, anticâncer ou antineoplásico para relatar resultados *in vitro*. A atividade experimental *in vivo* pode ser relatada como antitumoral ou antineoplásica, podendo reservar o termo anticâncer para experimentos clínicos em humanos. Deve-se ter cautela com o sensacionalismo, o qual resultaria no uso indevido das drogas pelos pacientes com câncer, podendo levar a um resultado falso, quando ainda se está nos estágios iniciais de desenvolvimento (Suffness & Douros, 1982).

4. Histórico do Modelo de *Screening*

4.1. Testes *in vitro*

Os primeiros programas de desenvolvimento de drogas anticâncer foram estabelecidos no *Sloan-Kettering Institute*, nos Estados Unidos, vindo em seguida o *Chesterr Beatty Institute*, na Inglaterra, e a Universidade de Tóquio, no Japão. As mais recentes organizações são a *United Kingdom's Cancer Research Campaign* (CRC), a *European Organisation for Research on Treatment of Cancer* (EORTC) e a *Japanese Foundation for Cancer Research* (JFCR), as quais têm cooperado internacionalmente na pesquisa e no desenvolvimento de novas drogas (Boyd, 1992).

Desde os meados da década 50, o *National Cancer Institute* (NCI), nos Estados Unidos, vem coordenando um grande programa de *screening* e

financiando o desenvolvimento de novas drogas anticâncer, com o suporte do *Chemotherapy National Service Centre* (CCNSC). Das drogas atualmente comercializadas, a hidroxiuréia, pipobroman, mitramicina, estreptozocina, mitoxantrona e taxol foram descobertas no NCI (Boyd, 1992).

Antes de 1975, os compostos eram selecionados com base na atividade anticâncer utilizando linhagens leucêmicas de camundongos L1210 *in vivo*, sendo em seguida avaliado em outros tipos de tumores de roedores. A partir de 1975, o *screening* baseado nas células L1210 foi substituído por um painel de tumores sólidos, os quais eram implantados em camundongos geneticamente imunodeprimidos (*nude mice*). Posteriormente, a linhagem leucêmica P388 foi escolhida para *screening in vivo* devido à sua sensibilidade a produtos naturais quando comparada à linhagem L1210. Outros modelos com tumores humanos na análise de formação de colônias foram introduzidos. Entre 1975 e 1984, aproximadamente 250.000 compostos foram avaliados nos testes de *pre-screen* com a linhagem P388 e num um painel de tumores humanos, porém, o resultado foi desapontador em virtude de poucas drogas terem evoluído até a fase de estudos clínicos (Finlay & Baguley, 1984; Driscoll, 1984).

Em 1990, no NCI, em virtude do avanço e do conhecimento da biologia do câncer, uma nova abordagem para o *screening in vitro* foi incorporada. Aproximadamente 60 linhagens derivadas de 7 categorias de tumores malignos, como de cólon retal, melanoma, cérebro, rim, pulmão, ovário e leucemia foram implementadas (Chabner, 1996). Essas linhagens foram caracterizadas em termos de fator de crescimento, expressão de oncogenes, atividade de quinase e outros fatores relevantes à regulação do crescimento e diferenciação. A atividade citotóxica foi avaliada pela habilidade dos compostos testes em inibir o crescimento de certas linhagens celulares.

Baseado no perfil da substância no *screening*, é estabelecido o *fingerprint* para os compostos analisados. Suas características são relacionadas a outras drogas, como os agentes alquilantes, inibidores da topoisomerase ou agentes que interferem nos microtúbulos (DeGeorge, 1998). A concentração que inibe o crescimento celular em 50% (IC₅₀), obtido *in vitro* num grande número de linhagens celulares, é colocada em um programa denominado COMPARE, o qual confronta os resultados com as drogas padrões, relacionando a responsividade celular com a sua estrutura molecular, sugerindo assim o provável mecanismo de ação intracelular (Powis, 1991).

O modelo do *screening in vitro*, entretanto, apresenta algumas desvantagens, como a perda da observação farmacológica *in vivo*, levando à inabilidade de reconhecer compostos que requerem atividade metabólica sistêmica (Johnson *et al.*, 1990). Por estas razões, faz-se necessário também a realização de testes *in vivo*, a fim de identificar compostos que induzam diferenciação (retinóides), agentes biorredutivos, inibidores da angiogênese (pentosan, suramin) e compostos que previnam metástases (Buolamwini, 1999).

4.2. Testes *in vivo*

O estudo experimental *in vivo* da atividade antitumoral de compostos químicos começou na União Soviética no final de 1940, quando o laboratório de quimioterapia do tumor foi estabelecido em Leningrado (*NN Petrov Institute of Oncology*) e em Moscou (*Ordzhonikidze All Union Scientific Research Chemical-Pharmaceutical Institute*). Anos depois, um número de instituições trabalhando em quimioterapia em tumores experimentais implementou o estudo *in vivo*, e hoje existem mais de 20 instituições que desenvolvem estudos na busca de novos fitoquímicos antineoplásicos (Sofina, 1977).

Sabendo-se que o objetivo principal do estudo de novas drogas antitumorais é estabelecer a presença da atividade antitumoral do composto, os critérios estabelecidos das condições experimentais são primordiais. Dessa maneira, a seleção de tumores deverá ser baseada em alguns fatores como: diferentes índices cinéticos (*pool proliferativo*), diferentes susceptibilidades a compostos antitumorais conhecidos, ser universalmente usado e fazer comparações com resultados obtidos por outros investigadores, ser preferencialmente realizado em camundongos para reduzir a quantidade necessária do composto a ser testado, entre outras.

A avaliação da atividade antitumoral está relacionada à regressão total dos tumores nos animais, à redução no crescimento dos tumores sensíveis ao composto ou ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os não-tratados. Ficou demonstrado que o melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado 48 h após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral (Shabel *et al.*, 1977).

5. Plantas Usadas no Estudo

5.1. *Auxemma oncocalyx* Taub, pertencente à família das Boraginaceae, popularmente conhecida como “pau-branco”, é a planta mais característica do sertão cearense por seu uso na medicina popular e abundância, podendo ser encontrada nas coroas de rios, riachos e nos pés-de-serras. Sua madeira resiste ao ataque de fungos e insetos, principalmente cumpins, o que sugere o seu potencial tóxico. Os ramos constituem forragem muito procurada para o gado e a casca é possuidora de propriedades adstringentes, sendo usada como cicatrizante pela população interiorana para tratamento de cortes e feridas (Braga, 1976; Lorenzi, 1998). A ausência de estudo farmacológico e a descoberta de novos compostos obtidos dessa planta motivaram o aprofundamento do seu conhecimento. É importante ressaltar que os estudos químicos da *Auxemma oncocalyx* foram realizados pela primeira vez

por Pessoa & Lemos (1993 e 1995). A partir do extrato etanólico da madeira do caule isolou o β sistosterol, seu glicosídeo, sete quinonas e duas antronas hexahidrogenadas.

Duas das setes quinonas isoladas foram analisadas quanto ao seu potencial citotóxico. Denominados de oncocalyxona A (*rel-8 α -hidroxi-5-hidroximetil-2-metoxi-8a β -metil-7,8,8a,9-tetrahidro-1,4-antracenodiona*) e oncocalyxona C (*rel-10 α ,11 β -epoxi-11 α -etoxi-8 α -hidroxi-2-metoxi-8a β -metil-5,6,7,8,8a,9,10,10a β -octahidro-1,4-antracenodiona*). São duas benzoquinonas fundidas a uma unidade terpenoidica, apresentando um esqueleto estrutural semelhante aos registrados, somente no gênero da Cordia, e por este motivo denominados de cordiacromos (Pessoa, 1994).

Esses constituintes foram isolados a partir dos extratos hexânico e etanólico da madeira do caule da *A. oncocalyx*. As estruturas químicas foram identificadas usando espectrometria de massa (EM), infravermelho (IV) e principalmente ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), (Pessoa *et al.*, 1993 e 1995).



Figura 1. *Auxemma oncocalyx* Taub (Boraginaceae) no município de Pentecoste-CE

5.2. *Egletes viscosa* Less, pertencente à família das Compositae, é uma planta anual, aromática, amarga e pilosa, com folhas recortadas e flores alvas com centro amarelo, distribuída na América intertropical (Paraíba) e conhecida popularmente como “macela-do-campo” (Braga, 1976). É a única erva silvestre comumente encontrada às margens das lagoas, açudes e cursos d’água, sendo usada na medicina popular como emenagoga, estomáquica e anti-espasmódica (Matos, 1998). Seus princípios ativos foram isolados e suas determinações estruturais foram realizadas através de métodos de espectrometria de massa (EM), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono-13 (RMN ¹³C) incluindo cromatografia de gás-líquido. Nesse estudo foram identificados dois compostos: Clerodano A (acetato da lactona do ácido hautrivaico) e Ternatina (4’5-dihidroxi-3,3’,7,8-tetrametoxi-flavona), (Lima *et al.*, 1996; Lima, 1993), cuja estruturas estão na **tabela 1**. Os estudos farmacológicos foram realizados inicialmente por Rao e cols. (1994 e 1997).

5.3. *Croton sonderianus*, pertencente à família das Euphorbiaceae, é um arbusto de pequeno porte (4 m), podendo atingir valores maiores dependendo da idade. Popularmente conhecida como “praga invasora de pastos” ou “marmeleiro preto”, em virtude do tronco e dos ramos possuírem aspecto escuro. É uma das mais abundantes e dispersas plantas do gênero *Croton*, presente na caatinga nordestina, habitando principalmente as regiões entre as bacias dos rios São Francisco e Paraíba. As cascas são empregadas na medicina popular na forma de infusos ou simplesmente mastigadas para o tratamento de perturbações gástricas. O teor de óleo essencial é constituído principalmente de mono e sesquiterpenos, podendo ser considerado como um sucedâneo para óleo diesel (Craveiro & Silveira, 1982).

Do extrato benzênico do lenho, foram isoladas quatro substâncias denominadas MPE-1 (**tabela 1**), MPE-2, MPE-3 e MPE-4, posteriormente, caracterizadas com o auxílio de métodos de espectrometria de massa (EM),

infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C). 5S, 8R, 9S, 10R, 15, 16-epoxi-clerodano-3, 13, 14-trien-20, 12R; 18-oato de metila, 6-hidroxi-7-metoxi-cumarina; 12-hidroxi-3-oxocleistan-8,11,13,15-tetraeno e 12-hidroxi-3,4-*seco*-cleistan-8,11,13,15, 18(4)-penten-3-oato de metila, respectivamente (Craveiro & Silveira, 1982).

5.4. *Zanthoxylum gardnerii*, pertencente à família das Rutaceae, é constituída de aproximadamente 150 gêneros que reúnem aproximadamente 1.500 espécies encontradas nas regiões tropicais e subtropicais de todo mundo (Braga, 1976). É uma rica fonte de alcalóides, cumarinas, lignanas e outros metabólitos secundários (Matos, 1998). No estado do Ceará, existem quatro espécies de *Zanthoxylum*, conhecidas popularmente por limãozinho ou laranjinha, as mais comuns são: *Z. syncarpum* Tull e *Z. rhoifolium* Lam., que ocorrem principalmente em regiões próximas ao litoral ou nas serras úmidas. Entre outras espécies, a *Zanthoxylum rugosum* A., é encontrada na serra da Ibiapaba, ao norte do estado, e a *Zanthoxylum gardnerii* Engl, na chapada do Araripe, sendo mais freqüente na serra da Meruoca e nos estados de Pernambuco e Piauí. Estudos químicos revelaram que a maioria dos alcalóides isolados desta planta tem uma característica comum, são alcalóides que possuem esqueleto básico do tipo quinolínico e isoquinolínico. Estes alcalóides são derivados do ácido antranílico ou fenilalanina. A análise fitoquímica das duas espécies de *Zanthoxylum* encontradas no Ceará, a *Z. syncarpum* Tull e a *Z. rugosum* A St. Hill & Tull, conhecidas popularmente como “limãozinho branco” e “limãozinho preto”, respectivamente, e realizada usando métodos de espectrometria de massa (EM), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), incluindo técnicas bidimensionais como 1H, 1H-COSY e 1H, ^{13}C , HETCOR, HMQC, COLOC e HMBC, que identificaram os compostos Seselin e Xantiletina (**tabela 1**) (Facundo, 1999).

5.5. *Dypteryx lacunifera*, pertencente à família das Leguminosae, é conhecida popularmente pelos nomes de “Castanha de Burro”, “Garampara” e

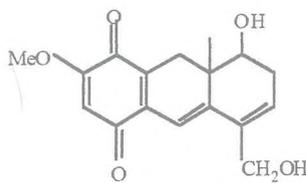
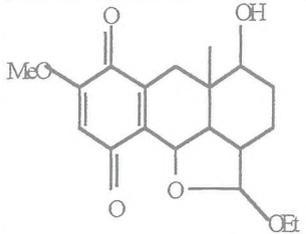
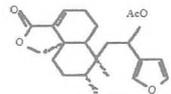
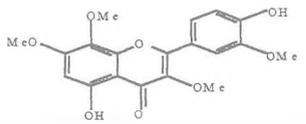
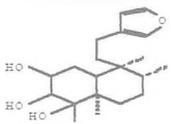
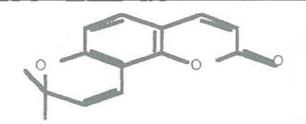
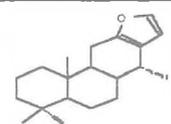
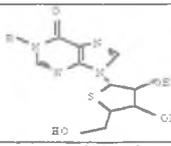
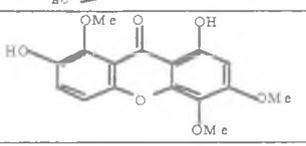
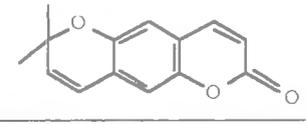
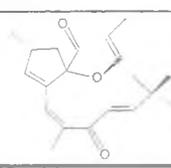
“Baru”, apresentando-se como uma árvore de pequeno porte, com ramos novos e ferrugíneos. O gênero *Dypteryx* abrange 14 espécies, das quais 9 habitam a Amazônia, enquanto que, das 5 restantes, uma habita a zona de transição ao norte da mesma, duas no Centro e Nordeste do Brasil e as outras duas localizam-se na América Central.

As espécies de *Dypteryx* do Brasil dividem-se em dois grupos: um caracterizado pelo cálice coriáceo e pelas sementes ricas em cumarina (depois de velhas) e o outro pelas asas petalóideas do cálice e as sementes inodoras. A *Dypteryx lacunifera* Ducke ocorre com bastante freqüência em grande parte do Maranhão e do Piauí, na mata seca ou entre as árvores dispersas nos campos altos conhecidos por chapadas. Os frutos foram utilizados para estudo fitoquímico pela sua abundância e uso como aromatizante. O estudo do extrato hexânico da casca dos frutos conduziu ao isolamento de compostos pertencentes à classe dos terpenos, principalmente sesquiterpenos e diterpenos. Através de estudos químicos, foi realizado o isolamento de vários constituintes químicos das diversas partes da planta pelos métodos de espectrometria de massa (EM), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono-13 (RMN ¹³C) (Mendes, 1987). Dentre os compostos isolados, estudou-se o Vinhaticol (**tabela 1**).

5.6. *Trigonía fasciculata*, pertencente à família das Trigonaceae, no seu estado vegetativo pode ser ligeiramente confundida com *Bredemeyra brevifolia* Klotzsch (família Poligalaceae) ou como uma variedade da espécie *Trigonía nivea*, sendo encontrada nas várzeas, matas ciliares, limites de florestas primárias e secundárias e ao longo das laterais das estradas, apresentando propriedades analgésica e antiinflamatória (Santos & Rao, 1997). Estudos fitoquímicos realizados identificaram a estrutura inicial 9-tiofuranosil-hipoxantina, bem como os derivados purínicos utilizando os métodos de espectrometria de massa (EM), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono-13 (RMN ¹³C) (Matezoli, 1996) (**tabela 1**).

5.7. *Jatropha elliptica* Muell Arg, pertencente à família da Euphorbiaceae, conhecida popularmente como “Jalapão”, encontra-se dispersa na região que vai do Mato Grosso até Pernambuco. O estudo farmacológico dessa planta apresenta uma vasta documentação sobre o seu uso na medicina popular, referindo, inclusive, indicações no tratamento de tumores (Calixto & Sant’Anna, 1990). A Jatrofona é um diterpeno macrocíclico (**tabela 1**), tendo sido extraída pela primeira vez por Taylor e cols., em 1983. A Jatrofona utilizada nesse experimento foi obtida da *Jatropha elliptica*, tendo sido isolada por Goulart e cols., em 1993.

Tabela 1. Nomenclatura e origem dos fitoquímicos

Composto	Espécie	Fórmula	Parte Usada
<i>rel</i> -8 α -Hidroxi-5-hidroxi-metil-2-metoxi-8 β -metil-7,8,8a,9-tetrahidro-1,4-antracenediona (<i>oncocalyxona</i> A)	<i>Auxemma oncocalyx</i> (Boraginaceae)		Lenho
<i>rel</i> -10 α ,11 β -Epoxi-11 α -etoxi-8 α -hidroxi-2-metoxi-8 β -metil-5,6,7,8,8a,9,10,10 β -octahidro-1,4-antracenediona (<i>oncocalyxona</i> C)	<i>Auxemma oncocalyx</i> (Boraginaceae)		Lenho
Acetato da lactona do ácido hautrivaico (Clerodano A)	<i>Egletes viscosa</i> (Compositae)		Flor
4'5-Dihidroxi-3,3',7,8-tetrametoxi-flavona (Ternatina)	<i>Egletes viscosa</i> (Compositae)		Flor
2,3,4-Trihidroxi-3,4-dihidroanoneno (Clerodano B)	<i>Croton sonderianus</i> (Euphorbiaceae)		Raiz
8,8-Dimetil-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b'] dipiran-2-ona (Sesselin)	<i>Zanthoxylum gardnerii</i> (Rutaceae)		Raiz
18-Hidroxi-vouacapane (Vinhaticol)	<i>Dypteryx lacunifera</i> (Leguminosae)		Raiz
9-Tiofuranosil hipoxantina (Fasciculatina)	<i>Trigonía fasciculata</i> (Trigonaceae)		Raiz
1,7-Dihidroxi-3,4,8-trimetoxi-xantona (Xantona A)	<i>Bredemeyra brevifolia</i> (Poligalaceae)		Raiz
8,8-Dimetil-2H,8H-benzo[1,2-b:5,4-b'] dipiran-2-ona (Xantiletina)	<i>Brosimum rubescens</i> (Moraceae)		Caule
Jatrofona	<i>Jatropha elliptica</i> (Euphorbiaceae)		Raiz

6. Desenvolvimento de Novas Drogas

A pesquisa de agentes anticâncer derivados de produtos naturais tem propiciado a descoberta de várias drogas já adicionadas ao arsenal terapêutico antineoplásico. Neste contexto, o uso do sistema de análise *in vitro* para o *screening* do potencial desses agentes tem sido prevalente. Entretanto, relevantes informações podem ser perdidas após um *screening in vitro* quando não for definido a atividade *in vivo* desse agente. Após um estudo *in vitro* em várias linhagens celulares, deve-se examinar o efeito variando o tempo de exposição, para assim poder definir o potencial citotóxico e planejar o estudo *in vivo*. O estudo em várias linhagens celulares poderá permitir um sistema de seleção tumoral *in vivo* adequado (Alley *et al.*, 1998). Todavia, quando ocorrer a inefetiva atividade *in vivo* após forte evidência *in vitro*, poder-se-á requerer uma explanação farmacocinética ou metabólica decorrente da perda da atividade, bem como de fatores recorrentes da baixa solubilidade e estabilidade a droga.

7. Drogas Antineoplásicas

A quimioterapia convencional mostra-se inadequada como resultado da falta de seletividade entre as células neoplásicas e as normais. Isto suscita a busca de novas terapias que atinjam seletivamente o câncer sem apresentar toxicidade para o tecido normal. Sendo assim, percebe-se cada vez mais a necessidade de novos compostos que preencham estes requisitos. Os potenciais alvo moleculares das drogas anticâncer podem ser agrupados nas seguintes categorias: vias de transdução, ciclo celular, vias relacionadas à apoptose, angiogênese tumoral e alvos metastáticos (Buolamwini, 1999).

A quimioterapia do câncer tem como finalidade causar uma lesão citotóxica letal que impeça a progressão tumoral. O ataque é direto contra um sítio

metabólico essencial para a replicação celular, por exemplo interferindo a viabilidade das purinas e pirimidinas (precursoras da síntese de DNA e RNA) ou reagindo diretamente com a dupla fita do DNA, ou ainda inibindo a expressão de alguma enzima, resultando em morte celular ou parada da multiplicação celular. A **figura 2** representa as diferentes fases do ciclo celular onde as drogas antitumorais poderão intervir

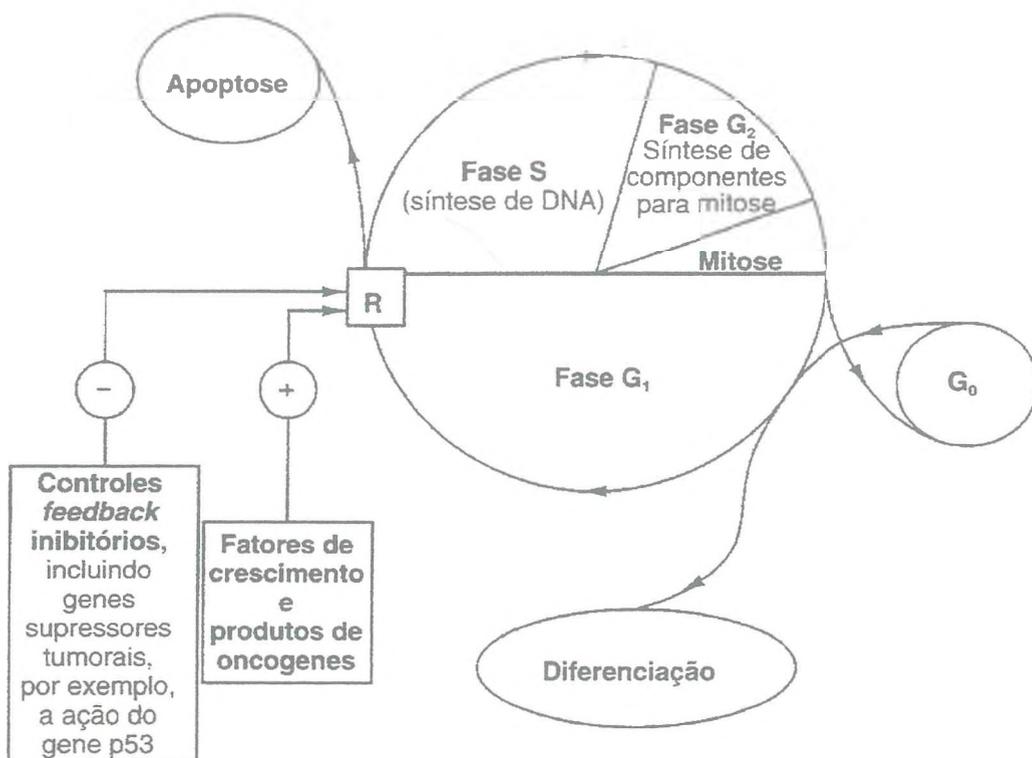


Figura 2. Ciclo celular. Sinais de progressão fornecidos por fatores de crescimento necessários para que o ciclo avance além da barreira. R= ponto de restrição ou barreira. Controles de *feedback* inibitórios suspendem a síntese de DNA, se houver um dano no DNA poderá haver reparo. Se este não for bem sucedido poderá ocorrer apoptose.

8. Divisão das Drogas Citotóxicas

8.1. Drogas antineoplásicas que causam dano ao DNA

O DNA apresenta-se como alvo de muitas drogas anticâncer. Uma variedade de agentes antineoplásicos podem causar diferentes lesões ao DNA, mas o exato mecanismo pelo qual estes levam à morte celular permanece incerto. A mobilização do Ca^{++} intracelular, a ativação de endonucleases dependentes de Ca^{++} e Mg^{++} e a indução de vários oncogenes têm sido sugeridas como prováveis mecanismos (Kubota, 1991).

O genoma celular está continuamente exposto a alterações endógenas e exógenas, de forma espontânea ou ambiental, levando a modificações estruturais no DNA (Rajewsky *et al.*, 1998), apesar de existir um contínuo sistema de reparo. Entre os fatores exógenos, temos os agentes químicos e físicos, incluindo drogas antineoplásicas (Ames, 1989). Estas induzem lesão no DNA por alterações, isolamento ou quebra da dupla fita de DNA, ligação cruzada DNA-DNA e DNA-proteína (Epstein, 1990).

Apesar da maioria dos mecanismos de citotoxicidade ser decorrente da interação droga-DNA, outros agentes atuam por outros sítios, a exemplo da quebra do nucleossomo, ou por drogas as quais não interagem diretamente com o DNA, a exemplo do fator de necrose tumoral (Kaufmann, 1997).

8.2. Inibidores da topoisomerase

Há aproximadamente 25 anos, a DNA topoisomerase tem se tornado um tópico excitante. Esta, por regular a topologia do DNA, está presente em todas as células vivas eucarióticas e procarióticas. Existem nas células eucarióticas duas

enzimas topoisomerasas: I e II. A DNA topoisomerase I é uma proteína monomérica com 100 KD, enquanto que a topoisomerase II tem 2 subunidades com peso molecular de aproximadamente 170-180 KD. Essas são importantes devido às várias funções fisiológicas que exercem na replicação e transcrição do DNA, estando implicadas na recombinação do DNA e segregação cromossomal (Sorensen *et al.*, 1992).

A topoisomerase tem sido reconhecida como o principal alvo de numerosos agentes antitumorais que intercalam-se com a molécula do DNA (Capranico & Zunino, 1992; Giaccone, 1994). Isto tem levado a uma intensa pesquisa de novos inibidores da topoisomerase que sejam mais seletivos, e assim, mais efetivos. Recentemente, novos tipos de topoisomerasas foram descobertos nas células eucarióticas, os quais podem ter elevada especificidade funcional, servindo como alvo para novas drogas antitumorais (Wang, 1991; Lin *et al.*, 1991).

Existem duas isoformas da topoisomerase II, com pequena diferença no peso molecular: a topoisomerase humana II α (170 KD) e a topoisomerase II β (180 KD). Foram identificadas em células humanas e de roedores, às quais foram clonadas e seus genes mapeados em diferentes cromossomos. O gene da topoisomerase II α localiza-se no cromossomo 17q21-22 (Juenka & Holden, 1993) e o gene da topoisomerase II β tem sido localizado no cromossomo 3p24 (Maxwell, 1996). Embora exista 72% de homologia entre os dois genes das topoisomerasas, elas são enzimas distintas, possuindo diferentes funções e diferentes expressões em tecidos normais, além de diferentes sensibilidades às drogas (Capranico *et al.*, 1992).

O nível da topoisomerase II α é mais elevado durante o estágio de proliferação rápida, enquanto que a topoisomerase II β apresenta-se mais elevada nas células que estão atingido a fase “platô” de crescimento, não sendo alvo para quimioterapia do câncer (Drake *et al.*, 1989). A expressão da topoisomerase II α

encontra-se mais elevada nas células da medula óssea enriquecida de promielócito e mielócito, não sendo detectáveis em granulócitos maduros (Holden *et al.*, 1990).

O preciso mecanismo molecular da influência das drogas com atividade sobre a topoisomerase vem sendo alvo de intensa pesquisa. Sabe-se que drogas antitumorais estabilizam intermediários covalentes pela formação do complexo ternário DNA-droga-topoisomerase (Drlica, 1989). A estabilização deste complexo constitui o primeiro passo de uma cascata de eventos moleculares que levam à morte celular (Giaccone, 1994).

Drogas como antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina e amsacarina), epidofilotoxinas (etoposida, tenoposida) e acridinas (m-AMSA) intercalam-se entre o DNA (Glisson *et al.*, 1987; Twey *et al.*, 1984). A interação dessas drogas com a topoisomerase II e com o DNA consiste na quebra reversível de ambas as fitas de DNA através da ligação covalente na posição 5'-terminal. Acredita-se que as drogas que interferem na topoisomerase II ativam a quebra do DNA, religando e estabilizando os intermediários entre o DNA e a enzima, ou inibindo especificamente a enzima, a exemplo da camptotecina, que revelou excessiva toxicidade, tendo despertado o interesse para novos análogos (Osheroff *et al.*, 1994).

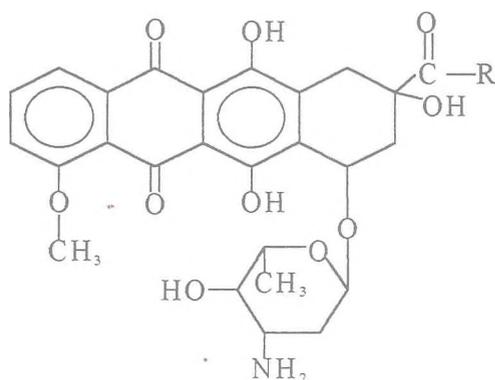
A topoisomerase II está também relacionada com a multiresistência das células às drogas. A ocorrência de células tumorais multiresistentes é o maior obstáculo para o sucesso na quimioterapia do câncer, a qual depende de dois eventos: a 1ª em decorrência do mecanismo de resistência independe do MDR-1, o qual está relacionado com as alterações a nível da topoisomerase II ou com a expressão da enzima mutada, nas células tumorais, onde a topoisomerase II é o alvo, bem como uma redução na expressão dos genes da topoisomerase (Giaccone *et al.*, 1992). A 2ª é decorrente da super expressão da glicoproteína P (gene *MDR-*

1) presente na membrana, a qual é uma bomba de efluxo, que expulsa uma larga quantidade de droga da célula (Endicott & Ling, 1989; Glisson & Ross, 1987).

8.3. Antibióticos citotóxicos

8.3.1. Antraciclinas

As oncolocalixonas A e C apresentam similaridade estrutural com os antibióticos citotóxicos do grupo das antraciclinas ou antraquinonas. Estas possuem na sua estrutura um anel de tetraciclina com um açúcar, a daunosamina, unido por ligação glicosídica. Todos os citotóxicos desta classe apresentam quinona e hidroquinona em anéis adjacentes, o que lhes permitem funcionar como aceptores e doadores de elétrons. Embora haja diferença clínica da daunorrubicina e da doxorubicina, suas estruturas químicas diferem apenas por um único grupo de hidroxila no C₁₄ (Arcamone, 1980). As estruturas químicas da doxorubicina e daunorrubicina são mostradas abaixo:



R₁ = CH₃ = Daunomicina (daunorrubicina)

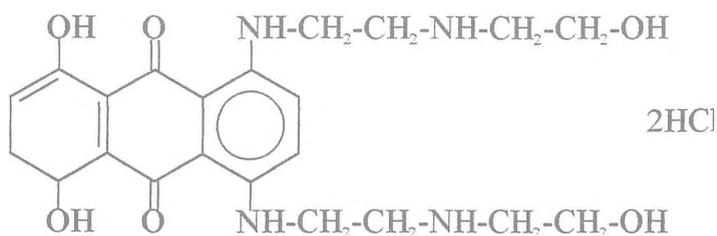
R₁ = CH₂OH = Adriamicina (doxorubicina)

As antraciclina podem induzir citotoxicidade pela formação de radicais livres, podendo levar à redução de elétrons por reagir com compostos que lesam o DNA e a membrana celular. Os radicais livres formados na redução das antraciclina doam elétrons de oxigênio para formar superóxidos, os quais podem reagir entre si para formar peróxido de hidrogênio. A quebra deste, libera elevada energia que leva à destruição do radical hidroxil, requerendo ferro ligado à antraciclina. O complexo ferro-antraciclina pode ligar-se ao DNA e reagir rapidamente com o peróxido de hidrogênio produzindo radicais hidroxil e quebrando o DNA (Chabner *et al.*, 1996)

A Doxorubicina liga-se ao DNA e inibe tanto a síntese de DNA quanto a de RNA. Sua principal ação citotóxica parece ser mediada, pelo menos em parte, por um efeito sobre a topoisomerase II, cuja atividade está aumentada nas células em proliferação, ou pela produção de radicais livres. A doxorubicina intercala-se no DNA e seu efeito consiste em estabilizar o complexo DNA-topoisomerase II após quebra dos filamentos durante a fase S do ciclo celular (Kubota, 1991).

8.3.2. Mitoxantrona

As antraquinonas podem ser vistas como substitutos das antraciclina e algumas delas têm atividade antibactericida e antipsoríase (Frydman *et al.*, 1997). A mitoxantrona é uma 9,10antracenediona que tem uma estrutura similar à antraciclina, porém, não possui radicais de açúcar ligado à sua estrutura. Foi originada a partir dos derivados da doxorubicina, apresentando menor toxicidade.



Os análogos da dihidroxiametantrona e a mitoxantrona mostram atividade igual ou superior à adriamicina, tendo um maior percentual de sobrevivência e uma menor cardiotoxicidade devido à sua limitada capacidade de produzir radicais livres. Exerce sua ação antitumoral estimulando a formação de quebras dos filamentos de DNA, mediada pela topoisomerase II e intercalando-se ao DNA (Shenkenberg & Von Hoff, 1986).

9. Eventos Celulares após o Dano ao DNA

Ainda não se apresenta inteiramente esclarecido o mecanismo da morte celular desencadeado por drogas antineoplásicas na inibição da topoisomerase II. Tem-se mostrado, *in vitro*, que tais drogas induzem quebra no complexo bloqueio físico para replicação e que o dano ao DNA provocado pelos inibidores da topoisomerase II podem levar a morte celular por apoptose (Kubota, 1991). Esta é caracterizada pela quebra internucleossomal do DNA, com fragmentos em uma escala de aproximadamente 180 pares de bases e outras mudanças morfológicas, como a condensação da cromatina. Observou-se também que a ativação de endonucleases dependentes de Ca^{++} e Mg^{++} geram fragmentação no DNA (Walker *et al.*, 1991). Além da ativação de quinases e polimerases, outros genes e proteínas foram identificados como responsáveis pelo dano ao DNA (Elledge, 1989).

10. Medida da Atividade Metabólica Celular

10.1. Apoptose

A apoptose foi identificada há aproximadamente 30 anos por Kerr (1972), mas somente durante os últimos 5 anos tem sido alvo de grande interesse. O nome foi sugerido por Kerr devido às mudanças morfológicas que levam à morte celular, por um processo claramente distinto da necrose. A apoptose está sob controle genético, o que a diferencia da necrose celular. A apoptose é um processo não patológico, sem perda inicial do controle osmótico, em contraposição à necrose, que é um processo patológico, não fisiológico, com ruptura da membrana celular e liberação do conteúdo citoplasmático e nuclear, desencadeando, assim, o processo inflamatório (Dive *et al.*, 1992). A apoptose é fundamental para o desenvolvimento normal e sua desregulação pode levar a um espectro de efeitos, atingindo a letalidade embriogênica ou a perturbação do tecido específico de desenvolvimento pós-natal. A seqüência de eventos que leva à apoptose não está completamente entendida, entretanto, as células encolhem-se e perdem o contato intercelular e subseqüentemente exibem cromatina densa, fragmentação nuclear e corpos apoptóticos dentro da célula, os quais são rapidamente fagocitados (Boobis *et al.*, 1990).

O processo de apoptose, além de relevância nos processos biológicos, tais como diferenciação, desenvolvimento, maturação celular e função imunológica, é fundamental para o controle da lesão celular induzida por agentes químicos e fisiológicos (Magno & Joris, 1995; Kaufmann, 1997). O balanço entre proliferação celular e apoptose é crucial para o desenvolvimento normal e homeostasia tecidual no adulto. O câncer resulta quando clones de células mutadas sobrevivem e proliferam inapropriadamente, rompendo assim este equilíbrio (Guo & Hay, 1999; Steller, 1995).

A terapêutica que modula a regulação da apoptose sugere uma nova oportunidade para o tratamento de numerosas doenças, incluindo o câncer, patogênese viral, linfoproliferação, inflamação e outras imunodeficiências, nas quais a degeneração celular leva a doenças. Em alguns momentos, a inibição da apoptose poderá ser benéfica, o que desperta o interesse por substâncias que atuem nos mecanismos reguladores positivos ou negativos da apoptose, com o intuito de direcionar sua modulação (Thatte & Dahanukar, 1997; Walker *et al.*, 1991; Welb *et al.*, 1997).

Existem diversos métodos para medir a apoptose, porém nenhum método isolado é um critério suficiente, devido ao processo de apoptose ser rápido e assíncrono em diferentes células. Dentre estes, destacamos: análise como a perda da viabilidade celular (captação do MTT), fragmentação do DNA da célula, microscopia nuclear (para visualizar condensação da cromatina, organização do DNA e integridade do citoplasma), atividade da protease cisteína, análise do pico de G1 pelo citômetro de fluxo, inibição do bcl2 e expressão da fosfatidilserina (Hockenber, 1995).

Alguns métodos serão descritos mais detalhadamente do que outros por terem sido utilizados neste estudo. A análise do TUNEL é um método usado para visualizar a fragmentação do DNA e se baseia na ligação dos fragmentos do DNA na terminação 3'-OH, a qual irá, ligar-se um complexo digoxigenina-dUTP, catalisado pela enzima TdT (terminal desoxinucleotídeo transferase). O complexo liga-se ao anticorpo antidigoxigenina conjugado a uma peroxidase, que na presença de um substrato (peroxidase) e do cromógeno (DAB) produz intenso sinal, colorido com morfologia identificável. A droga que induz dano ao DNA é identificada pela análise do TUNEL, desde que esteja acoplada à resposta apoptótica (Allen *et al.*, 1997).

Um outro método de detecção da apoptose baseia-se na distribuição e visualização da fosfatidilserina na membrana plasmática das células apoptóticas. A fosfatidilserina é encontrada na camada interna da membrana plasmática das células viáveis. Durante a apoptose, porém, ocorre exposição para fora da membrana, sendo identificada após ligação com streptavidina ou anexina V pela análise imunofluorescente ou utilizando citômetro de fluxo (Ros, 1992; Allen *et al.*, 1997).

10.2. Análise da citotoxicidade

10.2.1. Análise do MTT

Esta análise é utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (Skehan *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato. Mede indiretamente a atividade enzimática após exposição a diferentes substâncias, em células aderidas e em suspensão de forma linear em relação à absorvância e ao número de células.

A análise pelo MTT foi descrita por Mosman em 1983 e modificado por Alley em 1986, tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas, em virtude das células mortas serem incapazes de reduzir o MTT. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação citotóxica (Berridge *et al.*, 1996).

Os resultados obtidos por esta técnica são de grande avanço em relação às análises comumente usadas. Ela é válida em comparação com outros

métodos, tais como a contagem de células por exclusão de corante (Twentyman *et al.*, 1989), análise clonogênica, cristal de violeta ou XXT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-5-(fenilamino)-carboxil-2-H-tetrazolium hidróxido) (Keisari, 1992), dosagem de proteínas celulares e os testes de incorporação de rádio-elementos (Denizot & Land, 1986). Por essas razões, o método é largamente usado para analisar a sensibilidade das células tumorais, estimulação de linfócitos e citotoxicidade de células; além de permitir testar simultaneamente múltiplas drogas, sobre várias linhagens celulares, sendo útil para monitorar o desenvolvimento de células resistentes em cultura (Garn *et al.*, 1994).

10.3. Dano ao DNA

10.3.1. Método de fluorescência com bisbenzamida

A bisbenzamida (2,2-(4-hidroxi-fenil)-6-benzimidazolil-6-(1-metil-4-piperazil)-benzimidazol trihidroclorida) é um corante fluorescente usado para colorir os cromossomos através da sua fixação à molécula de DNA, formando um complexo estável e fluorescente. O aumento fluorescente é usado para estimar a quantidade de DNA presente na dupla hélice ou na fita isolada após exposição a agentes reativos com DNA (Singh *et al.*, 1988). Esse método determina somente o valor médio da lesão do DNA, não podendo definir o tipo da lesão ao DNA (Kanter & Schwartz, 1982).

O valor fluorescente do DNA é determinado pela quantificação da dupla hélice completa; desnaturação parcial e completa desnaturação da molécula do DNA na presença de uma solução alcalina de NaOH (0,1 N). As razões desses três valores irão determinar a quantidade de DNA danificado, onde o valor fluorescente (F) é igual a quantidade da dupla hélice de DNA, que permanece

depois da desnaturação alcalina por um tempo determinado (Kanter & Schwartz, 1982).

10.4. Análise da síntese de DNA: 5-Bromodeoxiuridina (5-BrdU)

A proliferação de células tumorais foi primeiramente estudada pela medida da atividade de síntese de DNA e incorporação de precursores radioativos na presença de H³-timidina. Porém, observou-se que, nas células que incorporavam o marcador do DNA por um longo tempo de incubação, o método tornava-se de rotina impraticável, sendo necessário um método alternativo não isot pico.

O método imunohistoquímico da análise da bromodeoxiuridina surgiu como uma excelente alternativa por ser simples, rápido e preciso. Esse é um análogo da timidina, o qual incorpora-se na molécula do DNA durante a replicação e a reparação do DNA, sendo posteriormente identificada pelos seus anticorpos monoclonais específicos fluorescentes, que se ligam à fita isolada incorporada com 5-Bromodeoxiuridina (Gratzner, 1982). Nessa análise, o conteúdo de DNA e a incorporação de 5-BrdU podem ser medidos conjuntamente para determinar o  ndice de síntese de DNA através, da porcentagem de células que incorporam a 5-BrdU (Dolbeare *et al.*, 1983).

11. Oncologia Experimental

A evolução da oncologia experimental tem permitido a identificação de parâmetros que vêm sendo utilizados na descoberta de diversos compostos úteis no tratamento clínico das neoplasias (Carter, 1980).

A pesquisa em busca da cura do câncer remonta desde os tempos do antigo Egito, conforme inscrições no papiro de Ebers (Kardinal & Yarbo, 1979). Entretanto, somente após a descoberta dos transplantes nos tumores experimentais

originados espontaneamente é que o teste de *screening* teve início na busca científica de substâncias eficazes no tratamento do câncer (Ehrlich, 1908). Em seguida, com a identificação de compostos químicos que funcionavam como agentes etiológicos na gênese de tumores malignos, como o 3,4-benzopireno e metilcolantreno, é que se permitiu o desenvolvimento de tumores experimentais a partir destes carcinógenos, o que vem contribuindo de forma fundamental para o avanço no estudo da biologia tumoral e na avaliação da atividade antineoplásica (Hartwell, 1969).

Acredita-se que a quimioterapia do câncer, em animais experimentais e no homem, tem como objetivo reduzir o número de células tumorais viáveis, abaixo do qual, as células que sobrevivam ao tratamento à droga não sejam capazes de restabelecer a doença. É comum incluir na quimioterapia experimental o tempo médio de sobrevivência no grupo tratado com droga em relação ao grupo controle, avaliando dessa maneira a expectativa de vida ou a cura.

Fundamentado no uso de tumores experimentais para a identificação de produtos naturais originados de plantas com potencialidade antitumoral, foram escolhidos os seguintes tumores para o presente trabalho: Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich (camundongos *mus musculus*), L1210 (camundongos *DBA/2*).

O Sarcoma 180 foi descoberto em 1914 no *Crocker Laboratory* (*Columbia University, New York*), é originalmente um tumor sólido, surgido espontaneamente na região axilar de camundongos, e foi inicialmente classificado como carcinoma mamário. Após vários transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa, por volta de 1919, e manteve-se sem alterações até os dias de hoje. A forma sólida é pouco hemorrágica, e se caracteriza pelo rápido crescimento, atingindo uma média de 18 x 14 x 10 mm por volta de sete dias após o transplante. Ocasionalmente, causa metástase para o pulmão, o que pode ocorrer quando os

tumores estão com mais de quatro semanas de evolução (Sugiura, 1965). Muitos desenvolvem necrose a partir da 3ª semana, e a morte dos animais é geralmente ocasionada por toxemia, septicemia e desnutrição. A forma ascítica foi desenvolvida por Charlotte Friend, em 1951, após injeção intraperitoneal do fluido leitoso do Sarcoma 180 (sólido) em camundongos suíços. Inicialmente, inoculou-se cerca de 1 milhão de células tumorais, que após 10 dias, atingiram aproximadamente 75 a 150 milhões de células tumorais/mL.

O Carcinoma de Ehrlich na forma sólida foi detectado em 1907, em Frankfurt, por Paul Ehrlich, que relatou a existência de diversos tumores transplantáveis em camundongos. Vários desses tumores eram adenocarcinomas, alguns sarcomas puros, outros uma mistura de carcinoma e sarcoma, formando um condroma. O tumor transplantável de Ehrlich atual não provém de neoplasma primário único como fonte, embora a maioria dos tumores do grupo Ehrlich seja derivada da glândula mamária. A partir do tumor de “Frankfurt” de Ehrlich, apareceram outras linhagens de tumor de Ehrlich na Alemanha e em outros laboratórios Europeus, todos sob a forma sólida.

A forma usada no presente trabalho apresenta crescimento rápido, e no 14º dia após o transplante, atinge uma média de 32 x 20 x 15 mm. O tumor é hemorrágico e não necrótico. A forma ascítica variante do tumor original foi desenvolvida por Loewenthal & Jahn, em 1932, através de transplantes seriados de líquido ascítico de camundongos inoculados por via intraperitoneal com suspensões de células tumorais (Stewart *et al.*, 1959).

A Leucemia L1210 é uma leucemia linfoblástica induzida por metilcolantreno a 0,2%. Foi primeiramente descrita por Foley, em 1960, quando descreveu que essas células tinham morfologia fibroblástica, e que produziam leucemia fatal quando injetadas na região dorsal do animal (Foley *et al.*, 1960). Posteriormente, Moore (1966) relatou o crescimento dessas células em suspensão, e

que em condições ótimas essas células multiplicavam-se a cada 10-15 h. Hutchison (1966), quando injetou por via intraperitoneal as células obtidas *in vitro* em camundongos *DBA/2*, constatou que a morfologia das células eram semelhante e que retiam as especificidades nos camundongos *DBA/2*, podendo levar à leucemia quando injetadas (Hutchison *et al.*, 1966). Esse sistema experimental tem sido largamente utilizado no *screening* de drogas anticâncer, em que a maioria dos agentes antitumorais empregados na clínica, foram submetidos ao teste (Arcamone & Cassinelli, 1980).

II. OBJETIVOS

1. Geral

Identificar fitocompostos com potencialidade antitumoral, através de estudos *in vitro* e *in vivo*, e seus prováveis mecanismos de ação.

2. Específicos

Selecionar um composto com efetiva citotoxicidade pela análise do MTT em várias linhagens celulares;

Comparar o composto selecionado com drogas quimicamente similares;

Avaliar os derivados do composto selecionado quanto à citotoxicidade;

Estudar a reatividade ao DNA do composto selecionado, através de testes de inibição de síntese de DNA, dano ao DNA, indução à apoptose e análise da interferência na atividade da topoisomerase;

Determinar o percentual de inibição do crescimento tumoral *in vivo* nos tumores Sarcoma 180, Carcinoma de Ehrlich e Leucemia L1210, usando o fitocomposto selecionado;

Estimar a sobrevida dos animais com os tumores Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich após tratamento com o fitocomposto selecionado.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Reagentes

5-BrdU – DAKO;

Ácido acético – MERCK;

Ácido clorídrico a 0,1 N;

Ácido diaminotetracético (EDTA) – MERCK;

Álcool a 70%;

Anticorpo anti 5-BrdU;

Antidigoxigenina;

APAAP – DAKO;

APOPTAG (TUNEL assay) – ONCOR;

Azul de tripan a 0,4% – MERCK;

Bicarbonato de sódio – REAGEN;

Bisbenzamida – SIGMA;

Citrato de sódio – SIGMA;

Clorafenicol – CEME;

Cloreto de magnésio – REAGEN;

Cloreto de sódio – REAGEN;

Diluyente do anticorpo – DAKO;

DMSO – MERCK;

EDTA – MERCK;

Etoposida – BRISTOL;

Formalina a 4-10%;

Fosfato monosódico e dissódico – REAGEN;

Glutamina – MERCK;

Hidróxido de sódio a 0,1 N – MERCK;

Meio RPMI – CULTILAB;

Metanol – MERCK;

MFT – SIGMA;

NP-40 – SIGMA;

Penicilina e Streptomina – SIGMA;
Peroxidase – DAKO;
PMSF – SIGMA;
Ringer lactato;
Sarcocinato lauronil de sódio – SIGMA;
Solução de 0,05 M de tris;
Solução de eosina – Doles reagentes;
Solução de hematoxilina – Doles reagentes;
Solução líquida de DAB + Substrato – DAKO;
Soro Fetal Bovino – CULTILAB;
Tripsina a 25% – JRH;

2. Equipamentos

Agitador magnético – ADVANTEC;
Autoclave (modelo ASV-302) – CORPORATION;
Balança analítica – METTLER;
Banho-Maria – FABBE;
Bomba de vácuo – EYELA;
Botijão de nitrogênio líquido – Cryometal (DS 34);
Câmara de Neubauer – CLAY ADAMS;
Capela de fluxo laminar vertical – VECO;
Centrífuga refrigerada – EPPENDORF;
Citocentrífuga – SHANDON;
Computador Macintosh Plus – APPLE;
Contador de células automático – CELM;
Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) – SHUMADZ;
Destilador / Deionizador – TECNAL;
Equipamento de eletroforese – BIO-RAD;

Espectrofotômetro – BACKMAM;
Estufa incubadora de CO₂ – NUARE;
Fluorespectrofotômetro (Model FP-920) – JASCO;
Freezer -20°C – PROSDÓCIMO;
Freezer -70°C – REVCO;
Microscópio Óptico de Inversão – LEITZ;
Microscópio Óptico Olympus CH-2 – OLYMPUS;
Mistura de 5% de CO₂ – WHITE MARTINS;
Pipette aid – DRUMOND;
Placas de cultura de células de 6, 24 e 96 poços – NUNC;
Potenciômetro – DIGMED;
Revelador ultravioleta;
Rotor de placa – EPPENDORF;
Sonicador – VWR SCIENTIFIC.

3. Materiais Diversos

Agulhas hipodérmicas de 30-7, 25-7 e 20-5 – BD;
Ampolas para congelamento;
Becker de 10, 50 e 100 mL – PYREX;
Espátula;
Fracos de plásticos (125 cm², volume 150 mL) – CORNING;
Fracos de plásticos (25 cm², volume 50 mL) – CORNING;
Lâminas – SHANDON;
Luvas cirúrgicas de látex – LEMGRUDER S/A;
Material cirúrgico (pinça, bisturi, tesoura) – EDLO;
Membrana millipore 0,22 µm – MILLIPORE;
Micropipetas de 20, 200 e 100 µL – GILSON;
Papel laminado;

Parafilme;

Pipetas graduadas de 1,0, 5,0, 10,0 e 20,0 mL estéreis – FALCON;

Placas de petri – PYREX;

Seringas de 1, 3, 5, 10 e 20 cc – BD;

Tubos de centrifuga estéreis de 15 e 50 mL – FALCON;

Tubos de vidros borossilicato;

4. Soluções

4.1. Solução salina tamponada de fosfato: a solução salina tamponada de fosfato livre de cálcio e magnésio (PBS) foi preparada dissolvendo um tablete de PBS em 100 mL de água destilada. O PBS foi esterilizado em autoclave a 121°C por 30 min e mantido a uma temperatura de 4°C.

4.2. Solução de PBS a 10 mM de fosfato de sódio: foi preparado separadamente a solução A contendo 1,34 g de fosfato dissódico (Na_2HPO_4) em 500 mL de solução salina (0,9%) e a solução B contendo 0,6 g de fosfato monossódico (NaH_2PO_4) em 500 mL de solução salina (0,9%). Em seguida foi acrescentado 150 mL da solução A na solução B até completar o volume de 500 mL no pH 7,4.

4.3. Solução de PBS a 50 mM de fosfato de sódio: foi preparada uma solução estoque de 0,5 M de fosfato de sódio a pH 7,4 e uma solução de 1,5 M de cloreto de sódio. Posteriormente, foram misturados 67 mL de uma solução de cloreto de sódio a 1,5 M a 50 mL de fosfato de sódio (pH 7,4) em 383 mL de água destilada.

4.4. Solução fluorocromo de bisbenzamida: a solução foi preparada à 0,16% de sarcosinato lauroil de sódio + 0,2 M de fosfato de potássio + 0,04 M de

EDTA dissódico + 10 µg/mL de bisbenzamida. Foram preparadas duas soluções: A) 0,2 M de fosfato dipotássio (K_2HPO_4) + 17,418 g de fosfato de potássio ($KHPO_4$) em 500 mL em água; e B) 0,2 M de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) + 13,6 g de KH_2PO_4 em 500 mL de água. Em seguida, foi misturado 100 mL da solução A em 400 mL da solução B até ajustar o pH 7,4. Posteriormente foi acrescentado 0,8 g de sarcosinato lauroil de sódio, 7,44 g de EDTA e 20 µL da solução de bisbenzamida, no dia do experimento, a partir da solução estoque 1 mg/mL de água em 200 mL de PBS (10 mM).

4.5. Solução salina tamponada de fosfato com EDTA (PBS/EDTA): foi pesado 0,4 g de EDTA, tendo em seguida adicionado 2 L de PBS, e autoclavado a 121°C, por 30 min. Posteriormente, foram acondicionadas em alíquotas de 500 mL, à temperatura ambiente.

4.6. Solução de TdT *working strength*: foi preparada em tubo de eppendorf no gelo, com duas gotas (76 µL) da solução tampão e uma gota (36 µL) da enzima TdT.

4.7. Solução *working strength stop/wash*: foi medida uma solução com 1 mL da solução tampão *stop/wash buffer* + 34 mL de água destilada.

4.8. Solução substrato + DAB: foi usado um tablete de DAB (conjunto de peroxidase) + 2 mL de substrato peróxido de hidrogênio. Protegeu-os da luz, sendo centrifugado em tubo de eppendorf antes de usá-lo

4.9. Solução de MTT: foi preparada a 5 mg/mL em PBS, sendo posteriormente armazenada no *freezer* a -20°C. No dia do experimento, foi diluído para 0,5 ou 1 mg/mL em meio sem soro.

4.10. Solução de TEP (solução de preservação do núcleo): foi utilizado 0,5 mL de tris de ácido clorídrico (HCl – pH 7,4) (1 M), 0,1 mL de EDTA (0,5 M), 0,25 mL de PMSF (100 mM) em 50 mL de água. Durante o experimento, foi utilizado 0,5 mL da solução.

4.11. Solução de TEMP (solução de extração do núcleo): foi utilizado 5 mL de tris de ácido clorídrico (HCl – pH 7,4) (1 M), 1 mL de EDTA (0,5 M), 2 mL de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) (1 M), 2,5 mL de PMSF (100 mM) e 500 mL de água.

4.12. Solução tampão lise de NP-40: foi preparado a partir 5 mL de tris de ácido clorídrico (HCl – pH 7,4) (1 M), 1 mL de cloreto de sódio (NaCl) (5 M), 1,5 mL de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) (1 M), 2,5 mL de 100% NP-40 e 500 mL de água.

4.13. Solução de 100 mM de PMSF: foi utilizado 0,174 g de PMSF em 100 mL de metanol.

4.14. Soro fetal bovino: o soro estéril foi obtido da CULTILAB e estocado a $-20^{\circ}C$ em garrafas de 100 mL. Antes do uso, foi descongelado e estocado a $4^{\circ}C$. Na preparação do meio, foi utilizado uma concentração final de 10% (v/v).

4.15. Bicarbonato de sódio: uma solução de 7,5% (p/v) foi preparada dissolvendo 7,5 g de bicarbonato de sódio em 100 mL de água destilada e deionizada, sendo em seguida filtrada em filtro millipore e estocada a $4^{\circ}C$.

4.16. Preparação de agarose a 1%: 2 g de agarose foram diluídos em 200 mL de TAE (x1). Foi acrescentado 40 mL de TAE, a partir de uma solução 50x (vezes) concentrada em 2 L. de água. Posteriormente, foi pesado e aquecido no

microondas por 3 min. Em seguida, pesou novamente, e completou para o volume inicial, adicionando brometo de etílio na concentração de 5 µg/mL.

4.17. Meio RPMI: o meio foi obtido pela CULTILAB, sendo diluído em água destilada, deionizada e esterilizada. A solução foi filtrada com ajuda do filtro millipore com diâmetro de 0,22 µM. Posteriormente, foi completado com 10% de soro fetal, 1% de glutamina, 1% de antibióticos, 1% de bicarbonato (0,75%) e 25 mM de HEPES.

5. Obtenção das Substâncias Usadas nos Testes

Os compostos usados nesse estudo foram isolados de plantas da região do Estado do Ceará, tendo sido identificadas pelo Professor Afrânio Fernandes, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. A purificação e a determinação química das estruturas foram realizadas pelo Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da mesma universidade, sendo utilizado um espectrômetro de massa ultravioleta, além da ressonância magnética nuclear e cromatografia de alta pressão, pelos procedimentos desenvolvidos pelos professores Telma Lemos, Otilia Pessoa e Edilberto Silveira (Mendes & Silveira, 1994; Pessoa *et al.*, 1993, 1995; Silveira *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 1996). Os nomes dos compostos estão apresentados na **tabela 1**.

6. Derivados da Oncocalyxona A

A partir da (1) **oncocalyxona A** (*rel*-10α,11β-Epoxi-11α-etoxi-8α-hidroxi-2-metoxi-8aβ-metil-5,6,7,8,8a,9,10,10aβ-octahidro-1,4-antracenediona) foram obtidos os seus derivados (2) **6-clorooncocalyxona A** (4'*rel*-6-cloro-8α-

hidroxi-5-hidroxi-metil-8 α -tetrahydro-1,4-antracenediona), obtido através da reação do composto 1 com PhSeLeCl (3) **8-0-acetiloncocalyxona A** (9'*rel*-5-acetoxi-metil-8 α -hidroxi-8 β -metil-2-metoxi-7,8,8a,9-tetrahydro-1,4-antracenediona) e (4) **8,11-di-0-acetiloncocalyxona A** (8'*rel*-8 α -acetoxi-5-acetoxi-metil-8 β -metil-2-metoxi-7,8,8a,9-tetrahydro-1,4-antracenediona), obtido depois da acetilação do composto 1 com Ac₂O/Py na presença de 4-DMAP. A preparação e identificação foram realizados pelos métodos descritos por Pessoa & Lemos (1999). Os fitoderivados foram dissolvidos a 5 mg/mL em DMSO.

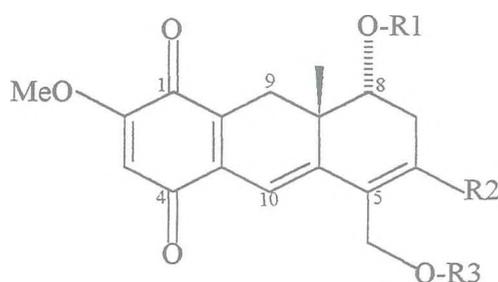


Tabela 2. Derivados da oncocalyxona A

Composto	Estrutura
Oncocalyxona A	R1= R2= R3= H
6-Clorooncocalyxona A	R1= R3= H; R2= Cl
8-0-Acetiloncocalyxona A	R1= R2= H; R3= Ac
8,11-Di-0-acetiloncocalyxona A	R1= R3= Ac; R2= H

7. Linhagens Celulares

As linhagens celulares usadas no desenvolvimento do trabalho foram: CCD-922 (fibroblasto), CEM (leucemia linfocítica), HL60 (leucemia promielocítica), HCT8 (côlon) e MCF-7 (mama), todas elas obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), (HAY *et al.*, 1994), com exceção da SW-1573 (pulmão) e suas sublinhagens 2R160, 2R50 e Ps1, que foram gentilmente cedidas

pelo Dr. H. Broxterman da Universidade livre de Amsterdã. As células foram mantidas em meio RPMI 1640 e suplementadas com 10% de soro fetal bovino. A passagem das células foi realizada 3x por semana, na fase de crescimento rápido. As células CEM e HL60 cresceram em suspensão, enquanto que as outras linhagens foram cultivadas aderidas. Todas as culturas foram mantidas a 37°C em 5% de CO₂. A viabilidade das células excederam 95% quando determinadas pelo azul de trypan (McAteer & Davis, 1994).

Tabela 3. Linhagens celulares

Linhagem Celular	Origem
L1210	Leucemia Murina
CCD922	Fibroblasto
CEM	Leucemia
HL60	Leucemia
MCF-7	Mama
U373MG	Glioma
SW-837	Cólon
HCT8	Ileocecal
SW-1573	Pulmão
SW-1573-S1	Pulmão (<i>MRP</i>)
SW-1573-2R160	Pulmão (<i>MDR</i>)

8. Viabilidade Celular

Para determinar a viabilidade, uma alíquota da suspensão de células foi diluída 1:10 a uma solução azul de tripan a 1% (p/v), depois de 2 a 3 min, as células foram examinadas e contadas na câmara de Neubauer. As células coradas

em azul escuro foram consideradas não viáveis. A viabilidade foi expressada pelo número de células não coradas multiplicadas por 10^5 céls./mL.

9. Congelamento das Células

Após tripsinização, as células foram resuspensas em meio a 10% de soro, e centrifugadas durante 5 min, a 1.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi removido, e o precipitado foi resuspendido em meio a 5 ou 10% de DMSO. A suspensão de células foi colocada em uma ampola, sendo levada à geladeira por 30 min, posteriormente para o *freezer* a -70°C durante 24 h, e em seguida armazenada a -180°C (nitrogênio).

10. Descongelamento das Células

As células foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C , sendo o exterior da ampola limpo com metanol. O conteúdo foi retirado da ampola e colocado gota à gota num tubo de centrífuga contendo meio RPMI a 10% de SFB. O tubo foi centrifugado a 1.000 rpm/min, sendo retirado o sobrenadante. Posteriormente o precipitado foi resuspendido em meio de cultura recém preparado. Com o auxílio de uma pipeta, foi agitado lentamente. A suspensão de células foi transferida para um ou mais frascos de cultura, sendo posteriormente incubada em estufa a 5% de CO_2 a 37°C .

11. Análise do MTT

Procedimento:

- 1) As células em suspensão e monocamadas foram plaqueadas contendo 5×10^4 céls./100 μ L ou 2×10^5 céls./100 μ L em placas de 96 poços
- 2) Cada placa foi incubada em estufa a 37°C, por um período de 3 h, até atingir o equilíbrio;
- 3) Em seguida, foram adicionados as substâncias previamente diluídas para obtenção das concentrações finais 25,0; 12,5; 6,25; 3,15; 1,76 e 0,79 μ g/mL no interior dos poços;
- 4) Após o período de incubação de 72 h. as placas foram retiradas e centrifugadas a 1.000 rpm por 5 min;
- 5) O sobrenadante foi aspirado, tendo sido adicionado 200 μ g/mL de 0,5 mg/mL da solução de MTT;
- 6) A placa foi colocada na estufa a 5% de CO₂, durante 3 h;
- 7) Posteriormente, foi centrifugada a 1.000 rpm por 5 min;
- 8) O sobrenadante foi aspirado;
- 9) O precipitado foi resuspendido em 100 μ L de DMSO;
- 10) A placa foi lida no espectrofotômetro de placa a um comprimento de onda de 550 nm.

12. Análise da Fluoresceína com Bisbenzamida: Dano ao DNA

Procedimento:

- 1) As células (5×10^5 cels./ml) foram cultivadas e incubadas com as amostras em diferentes concentrações, durante 3 ou 24 h;
- 2) Em seguida, foram aspiradas e transferidas para um tubo cônico, sendo centrifugadas a 1.000 rpm por 5 min;
- 3) O precipitado foi resuspendido com 5,5 mL da solução de PBS, e alíquotado em tubos com 0,8 mL;

4) Os tubos foram divididos em 3 grupos (A, B e C), em duplicatas. de acordo com o disposto a seguir:

Tubo A: 1 e 2 – nenhuma desnaturação

0,1 N de NaOH (0,8 mL) + 0,1 N de HCl (0,8 mL), pH 7,0;

0,8 mL de solução fluorocromo;

Sonicou-os usando programa 2-20 seg. (50%).

Tubo B: 3 e 4 – desnaturação parcial

0,1 N de NaOH (0,8 mL);

Guardou-os por 30 min no escuro e sem vibração;

0,1 N de HCl (0,8 mL);

0,8 mL de solução fluorocromo;

Sonicou-os usando programa 20 seg. (50%).

Tubo C: 5 e 6 – desnaturação completa

0,1 N de NaOH (0,8 mL);

Sonicou-os usando programa 5'' (90%);

Guardou-os por 30 min, no escuro e sem vibração;

0,1 N de HCl (0,8 mL);

0,8 mL da solução de fluorocromo;

Sonicou-os usando programa 20 seg. (50%).

5) Os tubos foram então cobertos com parafilme, ficando em equilíbrio por toda a noite (mais de 18 h);

6) O conteúdo foi transferido para as cuvetas e lido no fluorímetro (excitação 353 nm, emissão 451 nm e *bandpass* 18 nm);

7) As médias dos valores da desnaturação zero, desnaturação parcial e desnaturação completa foram calculadas;

8) O valor de F foi calculado (% da dupla fita do DNA):

$$F = \text{dupla DNA} = \frac{B - C}{A - C}$$

13. Imunohistoquímica

13.1. Análise do TUNEL

As células HL60 foram incubadas durante 48 h em placas de 6 poços, com $0,5 \times 10^6$ céls./mL em 2 mL de meio. Foram utilizados para os testes a oncocalyxona A ($5 \mu\text{g/mL}$), doxorubicina ($1 \mu\text{g/mL}$) (controle positivo) e nenhuma droga (controle negativo). Após o período de incubação, as lâminas foram preparadas em citocentrífuga, com aproximadamente $0,5 \times 10^5$ céls./0,1 mL.

A fixação, após citocentrifugação, foi realizada com formalina tamponada entre 4 e 10%, por 10 min, em temperatura ambiente. As lâminas foram estocadas a -20°C em um dessecador, até o momento do ensaio.

- 1) As lâminas foram retiradas do *freezer* a -20°C e deixadas a temperatura ambiente, antes de remover do dessecador;
- 2) Estas foram fixadas em solução fresca de etanol: ácido acético (2:1) por 5 min a -20°C ;
- 3) Depois foram secadas tendo o cuidado de não ressecá-las. Então, foram lavadas 2x com PBS, a cada 5 min;
- 4) As peroxidases endógenas foram eliminadas com solução fresca de peróxido de hidrogênio em PBS a 0,5%, durante 20 min, a temperatura ambiente. Nesse momento, foi retirado o reagente APOPTAG do *freezer* e colocou-o no refrigerador;
- 5) As lâminas foram então lavadas 2x com PBS, a cada 5 min;

- 6) Foram depois enxugadas, e as células circundadas com um lápis hidrofóbico;
- 7) O tampão de equilíbrio foi aplicado nas lâminas, as quais foram incubadas em câmara umidificada, a temperatura ambiente, por aproximadamente 30 min. A solução de TdT *working strength* foi preparada, mantendo-a no gelo;
- 8) Estas foram enxugadas, e posteriormente foi aplicado 15 a 20 μ L de solução de TdT *working strength*. Incubou-as em câmara umidificada por 1 a 2 h, em estufa a 37°C;
- 9) A solução *working strength stop/wash buffer* foi preparada e colocada em banho-maria a 37°C;
- 10) As lâminas foram colocadas na solução *working strength stop/wash buffer* e incubadas em banho-maria a 37°C, por 30 min, sendo agitadas a cada 10 min;
- 11) As lâminas, nesse passo, poderão ser estocadas;
- 12) A antidigoxigenina peroxidase foi aplicada, sendo as lâminas incubadas na câmara umidificada, a temperatura ambiente;
- 13) Estas foram lavadas 3x em PBS, a cada 5 min. Sendo em seguida preparada a solução DAB (cromogeno + peróxido de hidrogênio)
- 14) O DAB foi aplicado por 15 min, em câmara umidificada, a temperatura ambiente, protegendo-as da luz;
- 15) As lâminas foram lavadas 3x em água destilada por 1 min;
- 16) A hematoxilina foi aplicada e incubada por 15 a 20 min;
- 17) As lâminas foram lavadas em água corrente e posteriormente secadas ao ar livre;
- 18) As células foram observadas no microscópio óptico.

13.2. Análise da 5-Bromodeoxiuridina

As células CEM foram incubadas durante 24 h em placa de 6 poços, com 5×10^5 céls./mL em 6 mL de meio, na presença da Oncocalyxona A ($5 \mu\text{g/mL}$), doxorubicina ($1 \mu\text{g/mL}$) (controle positivo) e nenhuma droga (controle negativo). Três horas antes do término do período de incubação, acrescentou-se $10 \mu\text{M}$ BrdU, em seguida as lâminas foram feitas em citocentrífuga, com aproximadamente $0,5 \times 10^5$ céls./ $100 \mu\text{L}$.

As células foram fixadas após citocentrifugação usando metanol: ácido acético (7:15) por 5 min. Nesse momento, as lâminas foram estocadas a -20°C em um dessecador, até o momento do ensaio imunohistoquímico.

- 1) As lâminas foram incubadas com formamida (95%) + citrato de sódio ($0,15 \text{ M}$), em banho-maria, a 70°C , por 45 min, sendo $28,5 \text{ mL}$ de formamida e $1,5 \text{ mL}$ de citrato de sódio ($0,15 \text{ M}$);
- 2) As lâminas foram então incubadas com APAAP ($0,05 \text{ M}$ tris, pH 7,6/ $0,15 \text{ M}$ de NaCl), por 5 min;
- 3) Estas foram depois enxugadas, e ao redor das células foi feito um círculo com lápis hidrofóbico. Posteriormente aplicou-se o anticorpo primário (1 a $1,5 \text{ h}$);
- 4) Aplicou o *link* nas células e incubou-as durante 30 min em câmara umidificada;
- 5) As lâminas foram então lavadas 2x em APAAP (solução tampão), por 5 min cada;
- 6) Estas foram depois enxugadas;
- 7) Foi aplicado o APAAP (regente) e incubou-as por 30 min em câmara umidificada;

- 8) As lâminas foram então lavadas 2x com APAAP (TBS), por 5 min cada;
- 9) As mesmas foram depois secadas;
- 10) Foi aplicada a solução de substrato: 1 tablete para 2 mL da solução tampão substrato, e incubou-as por 40 min;
- 11) As lâminas foram lavadas em água destilada durante 5 min, sendo em seguida secadas;
- 12) A hematoxilina (1:4) foi aplicada por 1 min;
- 13) As lâminas foram então lavadas em água corrente;
- 14) As células foram observadas no microscópio óptico.

14. Imunofluorescência

14.1. Expressão da fosfatidilserina na membrana celular

As células HL60 foram incubadas por 48 h em placas de 6 poços, com 5×10^5 céls./mL em 2 mL de meio. Os compostos utilizados foram: Oncocalyxona A (5 µg/mL) e Doxorubicina (1 µg/mL).

- 1) 200 µL da suspensão de células foram transferidos para o tubo eppendorf;
- 2) O tubo foi centrifugado durante 10 min;
- 3) O sobrenadante foi aspirado e as células lavadas com solução de PBS (10 mM Kpi, salina pH 7,4);
- 4) O precipitado foi resuspenso e misturado com 100 µL de solução de annexina-PI, ficando em repouso durante 30 min, a 4°C;
- 5) Posteriormente, foram lavadas 2x com solução tampão a 1 mL;
- 6) 100 µL de Streptavidina-fluor foi acrescentado, deixando em repouso por 30 min, a 4°C;

- 7) As células foram lavadas 2x com PBS a 0,5 mg/mL;
- 8) Ao precipitado, foram acrescentados 20 μ L de PBS (pH 8,5) + Glicerol na proporção de 2:1;
- 9) As células apoptóticas foram identificadas pelo microscópio imunofluorescente;
- 10) As lâminas foram feitas tendo sido verificada a presença de células fluorescente ou não, e coradas PI. As células fluorescentes são consideradas células apoptóticas.

15. Eletroforese

15.1 Análise da topoisomerase II

Procedimento:

- 1) As células CEM foram incubadas com 1×10^6 céls./mL e as células SW-1573 com 3×10^7 céls./mL de meio. As substâncias Oncocalyxona A (5 μ g/mL), doxorubicina (0,1 μ g/mL), etoposida (1 μ g/mL) e o controle negativo (sem droga) foram incubadas durante 1 h, a 5% de CO₂ e a temperatura de 37°C;
- 2) Após esse tempo, as células foram contadas;
- 3) A suspensão de células foi coletada e centrifugada por 5 min a 1.000 rpm, a temperatura de 4°C;
- 4) O sobrenadante foi removido e o precipitado foi resuspendido em 3 a 5 mL de TEM frio, dispersando assim as células;
- 5) O tubo foi colocado no gelo por 10 min;
- 6) Os tubos foram centrifugados por 5 min a 1.000 rpm, à temperatura de 4°C;
- 7) O sobrenadante foi removido e o precipitado foi agitado em vórtex, rapidamente;

- 8) 10 mL de tampão lise NP-40 foi adicionado, agitado no vórtex e deixado no gelo por 10 min;
- 9) O tubo foi centrifugado por 5 min a 1.700g, a temperatura de 4°C;
- 10) O sobrenadante foi removido;
- 11) O passo 9 foi repetido, resuspendendo o precipitado com apenas 1 mL de tampão TEMP frio. Após centrifugação (passo 10), as paredes dos tubos foram enxugadas para remover o excesso de tampão;
- 12) O sobrenadante foi removido, e o núcleo foi resuspendido com 500 µl (50 µl) de tampão TEP (10 mM tris, pH 7,4; 1 mM de EDTA; 0,5 mM de PMSF), sendo o tubo eppendorf marcado e esfriado;
- 13) 50 µl de 1 M NaCl foi adicionado e deixado em repouso no gelo por 30 a 60 min;
- 14) O tubo foi centrifugado à temperatura de 4°C, durante 15 min;
- 15) No sobrenadante, estava presente a enzima topoisomerase I e II. Posteriormente, foi realizada a reação seguindo o procedimento abaixo.

Tabela 4. Preparação da reação na análise da topoisomerase

Reagentes	L (µl)	K (µl)	D (µl)	C (µl)	A₁₀ (µl)	A₅ (µl)	D₁ (µl)	E₁ (µl)
Água	19,5	21,0	19,5	11,0	9,0	10,0	9,0	9,0
Tampão	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
L	1,5	–	–	–	–	–	–	–
K	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
D	–	–	1,3	–	–	–	–	–
Amostra	–	–	–	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Droga	–	–	–	–	2,0	1,0	2,0	2,0

Legendas: L= DNA linear; K= kDNA; D= DNA Decatanato; C= Controle; A₁₀= Oncocalyxona A₂ (10 µg/mL); A₅= Oncocalyxona A (5 µg/mL); D₁= Doxorubicina (1 µg/mL); E₁= Etoposida (1 µg/mL)

16. Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

16.1. Comparação da citotoxicidade oncocalyxona A com a fração clorofórmica da *Auxemma oncocalyx* (FCAO)

A fração clorofórmica da *Auxemma oncocalyx* (1 mg/mL) e oncocalyxona A (1 mg/mL) foi coletada no HPLC diretamente em placas de 96 poços no intervalo de 90 min, a cada 15 seg. Foi usado o gradiente isocrático, tendo como eluentes metanol e água (1:1), com um comprimento de onda de 254 nm, fluxo de 1 mL/min, pressão de 250 kgf e *loop* 20 µL. Em seguida, as placas foram secadas a temperatura ambiente, para posterior teste de citotoxicidade nas células CEM ($0,25 \times 10^5$ céls./mL), utilizando o método do MTT.

17. Teste da Atividade Antitumoral

17.1 Escolha do animal

Os camundongos selecionados foram da espécie *Mus Musculus* e *DBA/2* de ambos os sexos, com peso variando entre 20 e 25 g, mantidos no biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX), alimentados sem restrição com ração Purina e água.

17.2. Via de administração

A via utilizada para a administração das substâncias foi a intraperitoneal, por se constituir num local de extensa área e intensa vascularização, e por conseguinte, uma excelente via de absorção. As doses foram estabelecidas de acordo com a DL₅₀ obtida em camundongos. A duração do tratamento foi de 8 a 10 dias, sendo iniciado 24 h após a inoculação do tumor, bem como em dias alternados, para avaliação da sua sobrevida, entre o intervalo de 2 em 2 dias.

17.3. Preparação das soluções

A solubilização dos produtos constituiu uma etapa importante na análise dos testes *in vitro* e *in vivo*, sendo utilizado como veículo o DMSO, a água e salina. As soluções foram estocadas na máxima concentração, em temperaturas variando de 20°C a -70°C.

17.4. Determinação da toxicidade aguda

O teste de toxicidade foi realizado numa etapa preliminar, fazendo parte de uma triagem farmacológica inicial, na qual é observado a ação da substância teste na fisiologia do organismo (Berlon, 1988). Neste estudo, foi determinada a DL₅₀ aproximada da fração clorofórmica da *Auxemma oncocalyx* pelo método Miller & Tainter (1944). Os animais foram observados durante as primeiras 24 h após a aplicação das substância, tendo sido anotado qualquer alteração comportamental apresentada. Na determinação da DL₅₀ pelo método de Miller & Tainter, foram feitas duas considerações: A primeira, ou ensaio preliminar, constituiu em determinar a maior dose aplicada que não mata nenhum dos animais (D1) e a menor dose capaz de matá-los (D2). Foram utilizados quatro

lotes, com dez animais cada, sendo administradas doses em diferentes concentrações para cada lote. A segunda, ou ensaio definitivo, foi realizado após 48 h do ensaio preliminar. Neste teste, as doses utilizadas foram compreendidas entre D1 e D2 em quatro lotes de dez animais. A mortalidade foi registrada durante 24 e 48 h após a administração da fração. O resultado da tabela 11 foi calculado obedecendo as instruções abaixo:

Para a correção, as seguintes fórmulas foram utilizadas:

N= número de animais mortos em cada grupo;

Para 0% de morte: $100 \times (0,25/n)$;

Para 100% de morte: $100 \times (n-0,25/n)$.

Os valores dos probitos foram correlacionados com o percentual de morte. Os resultados foram plotados num gráfico, onde a abcissa era o logaritmo da dose da FCAO e a ordenada o valor do probito. Para a obtenção do desvio padrão, diferença entre as doses foram consideradas, definida por 2S. O desvio (D) foi calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$$D \text{ (mg/Kg)} = \frac{2S}{\sqrt{2n}}$$

17.5. Avaliação da atividade antitumoral

Para os testes antitumorais, foram utilizados tumores sólidos do tipo Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich, com 10 a 12 dias de implantes na região axilar direita. O animal doador, ou da manutenção, foi sacrificado com éter etílico, sendo realizada assepsia com álcool iodado. Em seguida, foi retirado o líquido ascítico da cavidade abdominal, tendo sido preparado uma suspensão de células com 4,0 mL de Ringer lactato, 0,5 mL de cloranfenicol (5 mg/mL) e 0,5 mL do

líquido ascítico, para posterior contagem das células. Nos animais receptores, foram injetadas 2×10^5 céls./0,2 mL na região axilar dos animais (camundongos Wistar). Na linhagem leucêmica L1210, as células foram mantidas em cultura, em meio RPMI, e no dia do experimento foram contadas. A suspensão de células foi inoculada na região axilar, na concentração de 2×10^5 cels./0,2 mL em camundongos da espécie *DBA/2*.

No primeiro estudo, os animais inoculados com Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180 foram tratados no 2º, 4º, 6º e 8º dias após o implante, com a fração clorofórmica da *Auxemma oncocalyx* nas doses de 50 e 70 mg/mL, 5-Fluorouracil (controle positivo) nas doses de 20 e 40 mg/mL e 5% de DMSO (controle negativo); tendo sido avaliada a sobrevivência dos animais até a morte e a variação de peso durante o período de tratamento.

No segundo estudo, os animais foram inoculados com os tumores Sarcoma 180, Carcinoma de Ehrlich e linhagem leucêmica L1210, sendo em seguida tratados durante 10 dias consecutivos após o implante, com as substâncias fração clorofórmica da *Auxemma oncocalyx* nas doses de 70 e 100 mg/kg, 5-Fluorouracil na dose de 30 mg/mL e 5% de DMSO. A média dos pesos dos tumores foi determinada no 11º dia após o implante.

18. Análise Estatística

Os testes utilizados foram o não paramétrico Kaplan-Meyer, o teste *t-student* e a análise de variância. Quando existiu diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle foi realizado o teste Dunnett. Considerou-se que havia diferença entre os grupos tratados e o controle quando o p-valor foi menor ou igual a 0,05, existindo diferença significativa a 5%, e menor ou igual a 0,01, com significância a 1%.

IV.RESULTADOS

1. Citotoxicidade de Compostos Obtidos das Plantas do Nordeste Brasileiro

A ação citotóxica *in vitro* de algumas substâncias puras obtidas de diferentes plantas do Nordeste brasileiro foi inicialmente avaliada pelo método do MTT em linhagens de células humanas CEM (leucemia), SW-1573 (carcinoma de pequenas células do pulmão) e CCD-922 (fibroblastos normais). Este teste foi utilizado para selecionar aqueles compostos que demonstraram elevada ação citotóxica e, conseqüentemente, possível potencial antitumoral (**tabela 5**). Foram considerados como resultados relevantes aqueles que apresentaram IC_{50} igual ou menor que 10 $\mu\text{g/mL}$ (Fávaro, 1990). Dentre as substâncias estudadas, quatro compostos (oncocalyxona A, oncocalyxona C, clerodano A e ternatina) foram os mais citotóxicos, com valores de IC_{50} abaixo de 10 $\mu\text{g/mL}$ nas células CEM e SW-1573. Dentre estes, as oncocalyxonas A e C apresentaram uma maior atividade nas células CEM em relação às células SW-1573 ($p < 0,01$), com valores de IC_{50} inferiores a 2 $\mu\text{g/mL}$, o que ressalta a sua especificidade por células neoplásicas com elevado índice de divisão celular. A **figura 3** mostra a curva dose-resposta dos quatro compostos mais ativos nas células CEM, que foram selecionados para os estudos posteriores.

Alguns compostos, como clerodano B, xantona A, xantiletina, vinhaticol, seselina e fasciculatina, apresentaram baixa citotoxicidade nas células estudadas, com valores estimados de IC_{50} entre 13 e 25 $\mu\text{g/mL}$. Por outro lado, embora a jatrofona tenha mostrado elevada citotoxicidade com valores de IC_{50} menores que 1 $\mu\text{g/mL}$, sua citotoxicidade foi inespecífica, atingindo tanto as linhagens tumorais (CEM) quanto a linhagem normal (CCD-922 (**tabela 5**)), o que a descredencia para o prosseguimento no estudo.

1. Citotoxicidade de Compostos Obtidos das Plantas do Nordeste Brasileiro

A ação citotóxica *in vitro* de algumas substâncias puras obtidas de diferentes plantas do Nordeste brasileiro foi inicialmente avaliada pelo método do MTT em linhagens de células humanas CEM (leucemia), SW-1573 (carcinoma de pequenas células do pulmão) e CCD-922 (fibroblastos normais). Este teste foi utilizado para selecionar aqueles compostos que demonstraram elevada ação citotóxica e, conseqüentemente, possível potencial antitumoral (**tabela 5**). Foram considerados como resultados relevantes aqueles que apresentaram IC₅₀ igual ou menor que 10 µg/mL (Fávaro, 1990). Dentre as substâncias estudadas, quatro compostos (oncocalyxona A, oncocalyxona C, clerodano A e ternatina) foram os mais citotóxicos, com valores de IC₅₀ abaixo de 10 µg/mL nas células CEM e SW-1573. Dentre estes, as oncocalyxonas A e C apresentaram uma maior atividade nas células CEM em relação às células SW-1573 (p<0,01), com valores de IC₅₀ inferiores a 2 µg/mL, o que ressalta a sua especificidade por células neoplásicas com elevado índice de divisão celular. A **figura 3** mostra a curva dose-resposta dos quatro compostos mais ativos nas células CEM, que foram selecionados para os estudos posteriores.

Alguns compostos, como clerodano B, xantona A, xantiletina, vinhaticol, seselina e fasciculatina, apresentaram baixa citotoxicidade nas células estudadas, com valores estimados de IC₅₀ entre 13 e 25 µg/mL. Por outro lado, embora a jatrofona tenha mostrado elevada citotoxicidade com valores de IC₅₀ menores que 1 µg/mL, sua citotoxicidade foi inespecífica, atingindo tanto as linhagens tumorais (CEM) quanto a linhagem normal (CCD-922 (**tabela 5**), o que a descredencia para o prosseguimento no estudo.

Tabela 5. Valores da IC₅₀ dos compostos obtidos de plantas do Nordeste do Brasil nas células CEM, SW-1573 e CCD-922.

Compostos	IC ₅₀ (média (µg/mL)) ± DP)		
	CEM	SW-1573	CCD-922
Oncocalyxona A	0,76 ± 0,05**	7,0 ± 1,7*	13,4 ± 0,6
Oncocalyxona C	1,5 ± 0,3**	7,5 ± 0,7*	12,4 ± 0,5
Clerodano A	6,25 ± 0,1*	5,8 ± 1,2*	10,0 ± 1,0
Ternatina	1,9 ± 1,2**	1,4 ± 0,7**	10,3 ± 0,5
Clerodano B	18,0 ± 3,4	18,0 ± 0,0	>25
Xantona A	13,5 ± 4,0	17,0 ± 5,1	>25
Fasciculatina	20,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0	>25
Vinhaticol	13,0 ± 0,7	17,0 ± 0,0	>25
Xantiletina	16,0 ± 0,0	>25	>25
Seselin	15,0 ± 0,0	17,3 ± 0,6	10,7 ± 1,0
Jatrofona	0,098 ± 0,06**		0,22 ± 0,03**

As células foram cultivadas em placas de 96 poços em estufa a 5% de CO₂, a 37°C, por 72 h, na presença de concentrações crescentes dos compostos (0,39-25 µg/mL). Cada concentração foi testada em triplicata, e as análises foram realizadas em três determinações. A IC₅₀ corresponde à concentração que inibe 50% do crescimento celular (média ± desvio padrão). Obs. *p<0,05; **p<0,01.

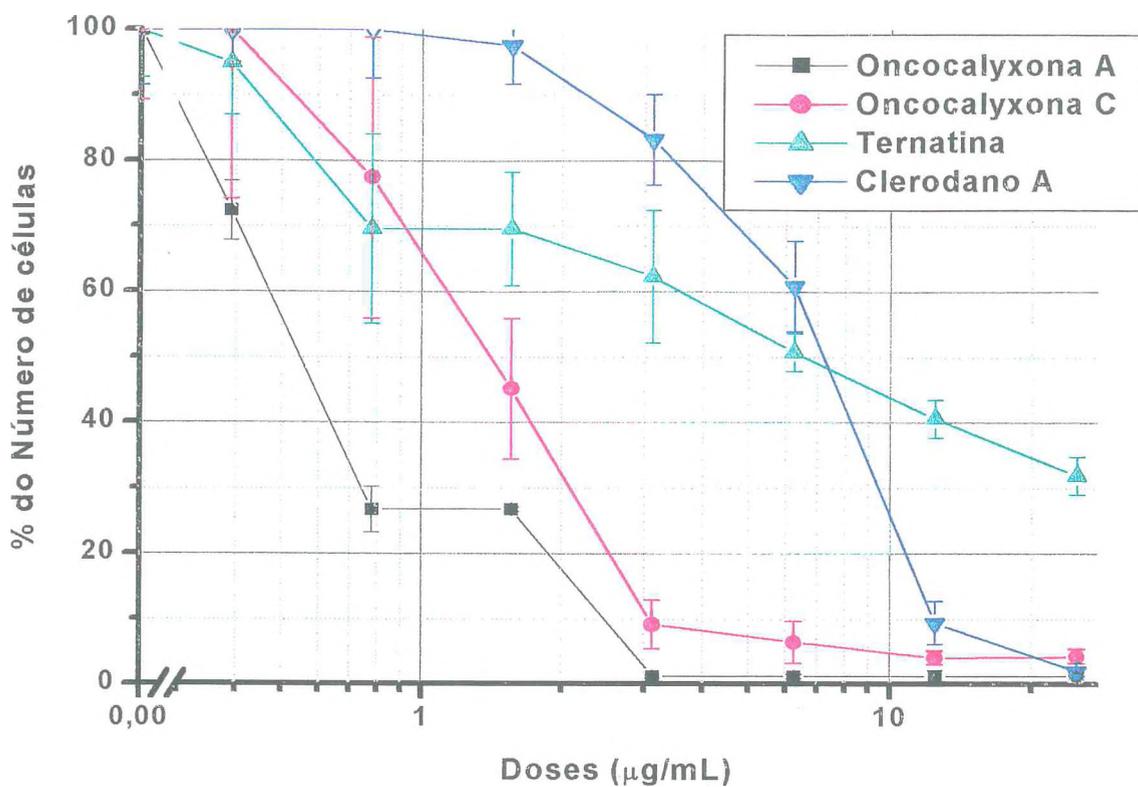


Figura 3. Ação citotóxica dos compostos obtidos de plantas nas células CEM. Porcentagem de células viáveis em relação ao efeito das diferentes concentrações dos compostos que constam na legenda. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de triplicatas em três diferentes experimentos.

2. Dano ao DNA nas Células CEM

A integridade do DNA foi avaliada nas células CEM (5×10^5 céls./mL) pela análise de fluorescência medindo ligação da bisbenzamida com fita simples e dupla do DNA, após 3 e 24 h de incubação, com os quatros compostos mais ativos previamente selecionados nos testes de citotoxicidade, a oncocalyxona A (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a oncocalyxona C (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), clerodano A (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a ternatina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram comparados a Etoposida (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As **figuras 4 e 5** representam a quantidade de DNA que permaneceu com dupla fita após exposição aos compostos testados.

Inicialmente os compostos foram submetidos a apenas 3 h de incubação para verificar aqueles que apresentavam uma reatividade mais rápida com o DNA. Neste teste, observou-se que a fração da dupla fita de DNA foi notadamente diminuída após 3 h de incubação na concentração de 10 vezes a IC_{50} das oncocalyxonas A e C, sendo a oncocalyxona A mais efetiva que a oncocalyxona C (**figura 4**). Esses valores foram superiores aos da ternatina e do clerodano A que apresentaram reatividade menor utilizando concentração superiores aos das oncocalyxonas A e C, correspondente a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Após incubação por 24 h pode-se determinar a reatividade dos compostos em um maior período de tempo, cujo resultado evidenciou uma reatividade significativa de todos esses compostos em relação ao controle, sendo que as oncocalyxonas A e C apresentaram valores mais elevados (**figura 5**).

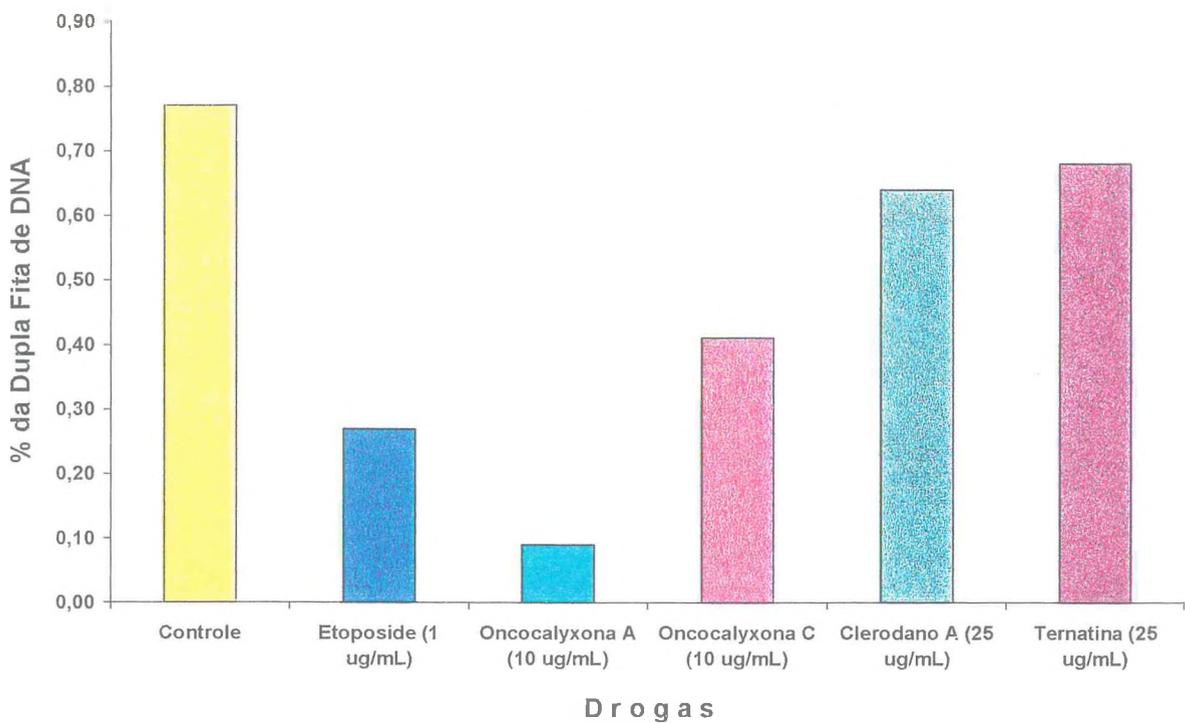


Figura 4. Determinação do dano ao DNA nas células CEM durante 3 h de incubação. A figura representa a quantidade da dupla fita de DNA ligada à bisbenzamida nas células incubadas com os compostos etoposida (1 $\mu\text{g/mL}$) (controle positivo), oncocalyxonas A e C (10 $\mu\text{g/mL}$), clerodano A e ternatina (25 $\mu\text{g/mL}$), medida através do percentual da dupla fita de DNA.

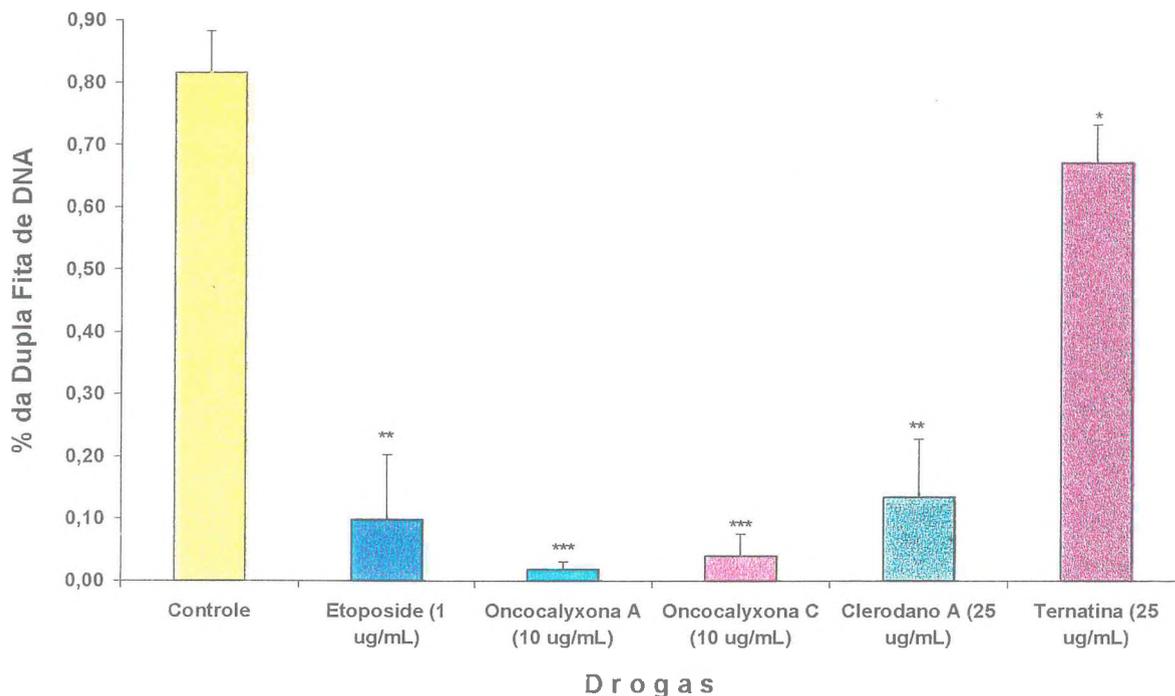


Figura 5. Determinação do dano ao DNA nas células CEM durante 24 h de incubação. A figura representa a quantidade da dupla fita de DNA ligada à bisbenzamida nas células incubadas com os compostos etoposida (1 $\mu\text{g/mL}$) (controle positivo), oncocalyxonas A e C (10 $\mu\text{g/mL}$), clerodano A e ternatina (25 $\mu\text{g/mL}$), medida através do percentual da dupla fita de DNA. Obs. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3. Avaliação da Inibição da Síntese de DNA nas Células CEM

Algumas substâncias antineoplásicas agem através da inibição da síntese de ácidos nucleicos. Nesse sentido, foi escolhida uma metodologia para avaliação do índice de proliferação celular, pela incorporação do BrdU detectado pela reação imunohistoquímica com o anticorpo anti-5-BrdU, onde identificou-se as células que permaneceram em síntese após um período de 24 h de incubação com os compostos. Três horas antes do término do experimento, acrescentou-se 5-BrdU (10 uM) para posterior análise imunohistoquímica.

Na presença da oncocalyxona A (5 µg/mL), oncocalyxona C (5 µg/mL) e clerodano A (25 µg/mL), houve redução de aproximadamente 90% e 80% respectivamente ($p < 0,01$) da incorporação de 5-BrdU (**tabela 6 e figuras 6, 7 e 8**) o que indica significativa inibição da síntese de DNA. Comparando oncocalyxona A com a oncocalyxona C, observa-se que a primeira foi mais efetiva numa dose menor do que a segunda, esses valores foram superiores aos da ternatina e do clerodano A (**tabela 6**). As células tratadas com o agentes anticâncer convencionais, como o etoposida (1 µg/mL) e doxorrubicina, etoposida (1 µg/mL), mostraram níveis de inibição da síntese do DNA, semelhantes aos das oncocalyxonas A e C, embora em doses menores.

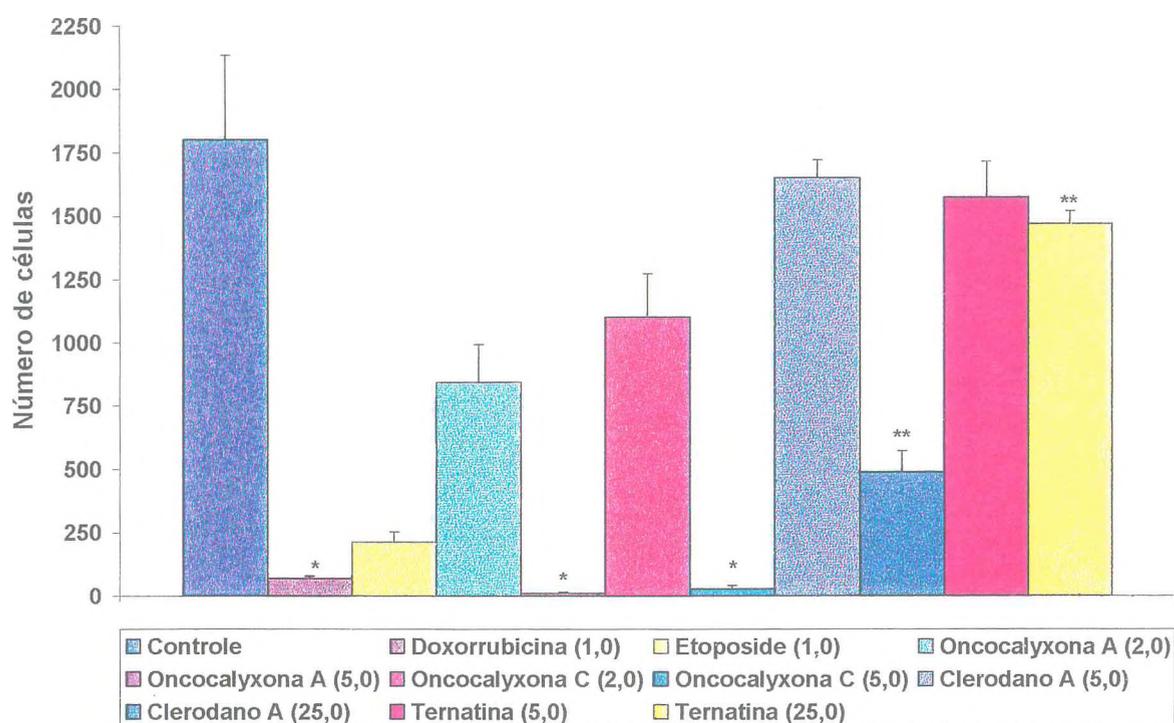


Figura 6: Determinação do número de células. Proliferação celular na presença das diferentes concentrações dos compostos durante 24 h de incubação e após 3 h de exposição a 5-BrdU (n = 2). Obs. *p<0,01; **p<0,05.

Tabela 6. Inibição da síntese de DNA nas células CEM

Compostos	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% do número de células incorporadas com 5-BrdU
Controle	0	100
Doxorrubicina	1	3,7
Etoposida	1	12*
Oncocalyxona A	2	47
	5	0,6*
Oncocalyxona C	2	60,5
	5	1,6*
Clerodano A	5	91,6
	25	27*
Ternatina	5	87
	25	81

As células foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 céls./mL, durante 24 h, em estufa a 5% de CO_2 , a 37°C . Três horas antes do término da incubação acrescentou-se 5-BrdU (10 mM). A porcentagem de células incorporadas com 5-BrdU foi comparada com o número de células marcadas do controle ($n = 2$). Obs. * $p < 0,01$.

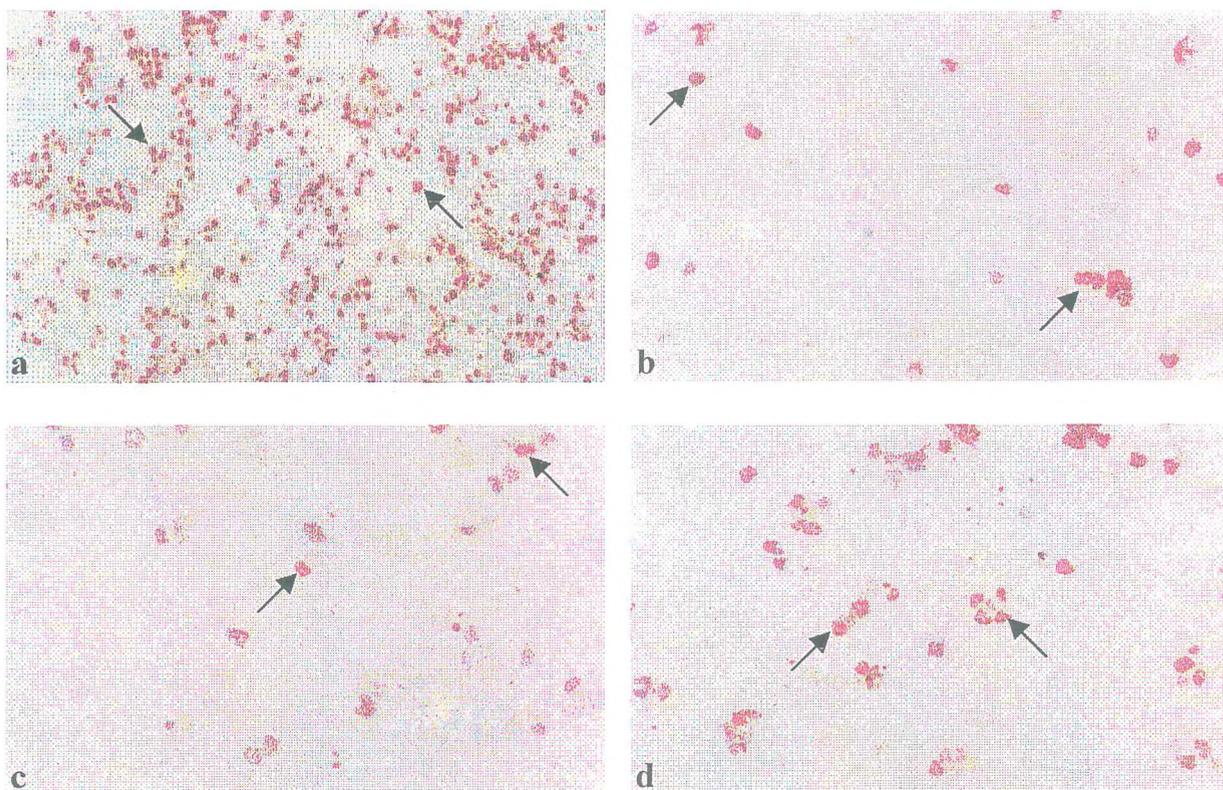


Figura 7. Reação imunohistoquímica para evidenciação da incorporação da 5-BrdU nas células CEM. As células CEM foram plaqueadas (5×10^5 céls./mL) e incubadas na (a) ausência de drogas e na (b) presença de doxorubicina ($1 \mu\text{g/mL}$), (c) oncolyxona A ($10 \mu\text{g/mL}$) e (d) etoposida ($1 \mu\text{g/mL}$), durante 24 h, e na presença de 5-BrdU (10 mM), por 3 h, antes do término da incubação em estufa a 5% de CO_2 , a 37°C . A porcentagem de células marcadas foi determinada posteriormente ($n = 2$).

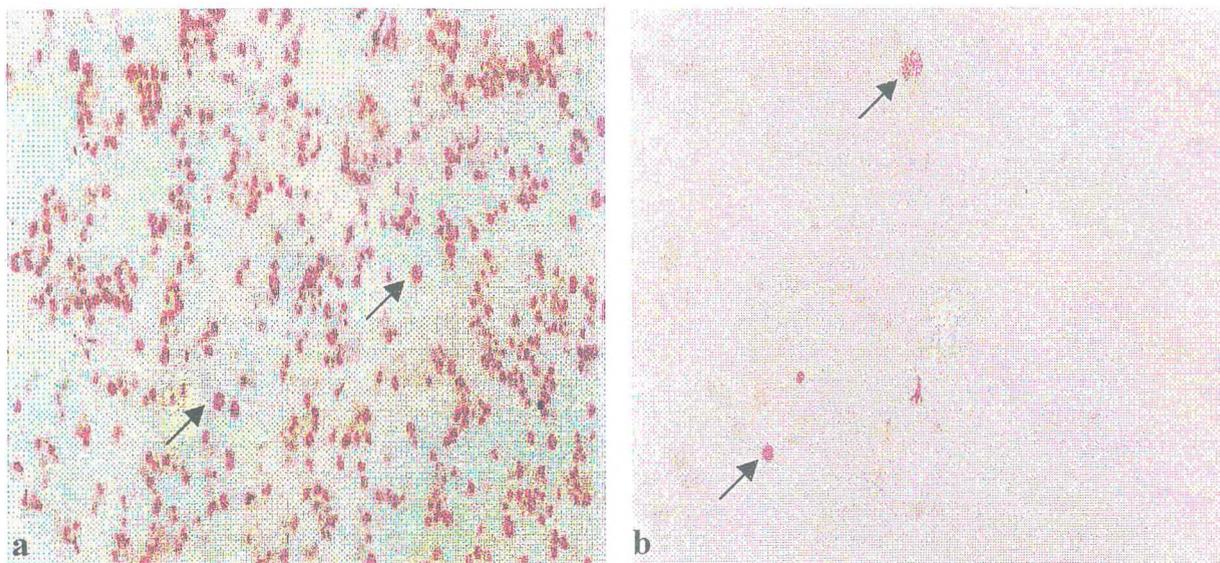


Figura 8. Reação imuno-histoquímica para evidenciação da incorporação da 5-BrdU nas células CEM. As células CEM foram plaqueadas (5×10^5 céls./mL) e incubadas na (a) ausência de drogas e (b) clerodano A ($25 \mu\text{g/mL}$), durante 24 h, e na presença de 5-BrdU (10 mM), por 3 h, antes do término da incubação em estufa à 5% de CO_2 , a 37°C . A porcentagem de células marcadas foi determinada posteriormente ($n = 2$).

4. Avaliação da Indução à Apoptose

O índice de indução à apoptose foi avaliado nas células HL60 nas análises imunohistoquímicas (TUNEL) e imunofluorescência (fosfatidilserina) pelo fato dessas células apresentarem expressão do gene p53 (Hoffman *et al*, 199). As células foram incubadas durante 48 h na presença e na ausência da oncocalyxona A (5 µg/mL). A **figuras 9** e a **tabela 7** mostram uma significativa indução à apoptose em 78,6% das células expostas à oncocalyxona A na concentração 5 µg/mL ($p < 0,001$) quando comparadas ao controle. A **figura 10a** mostra que as células marcadas com anexina são indicativos de apoptose, enquanto que na **figura 10b**, as células marcadas com propídio apresentam indicativo de necrose.

Tabela 7. Percentual de avaliação da indução à apoptose pelo método do TUNEL

	Controle	Oncocalyxona A (5 µg/mL)
Apoptose	17%	78,6%*
Não apoptose	83%	21,4%

As células foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 céls./mL, durante 48 h, em estufa a 5% de CO₂, a 37°C. Após o término da incubação foi realizada a análise do TUNEL. A porcentagem de células marcadas foi comparada com o número de células do controle (n = 2). Obs. * $p < 0,001$.

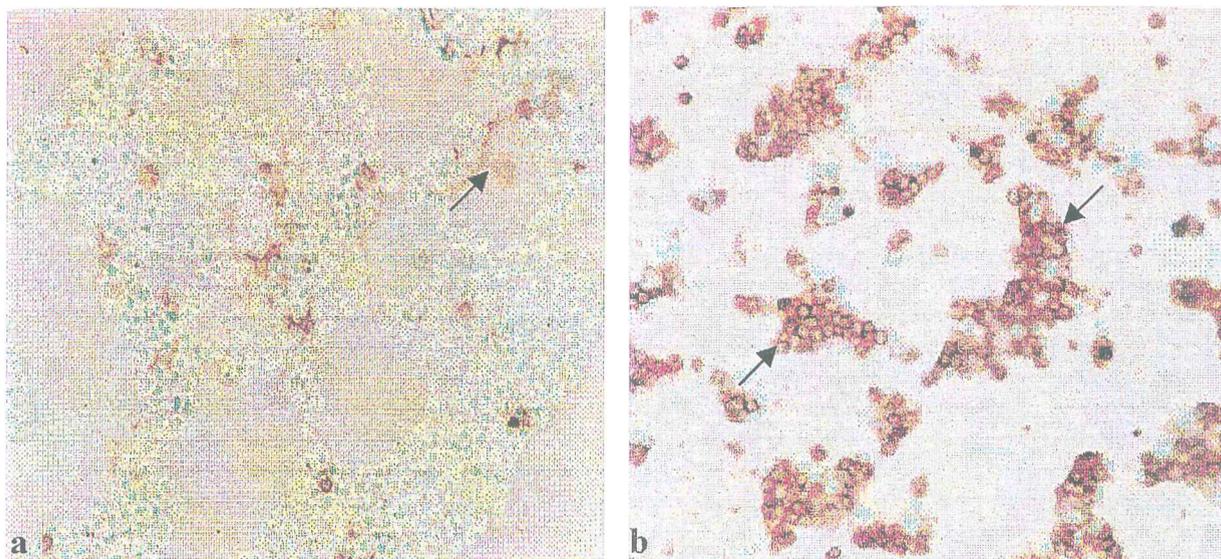


Figura 9. Avaliação da indução à apoptose na presença da oncofalconina A, por imunohistoquímica. As células HL60 foram plaqueadas ($0,5 \times 10^6$ céls./mL) e incubadas na (a) ausência de drogas e na (b) presença da oncofalconina A ($5 \mu\text{g/mL}$), durante 48 h, em estufa a 5% de CO_2 , a 37°C . O percentual de células marcadas pela análise do TUNEL foi determinada e comparada com o controle ($n=2$).

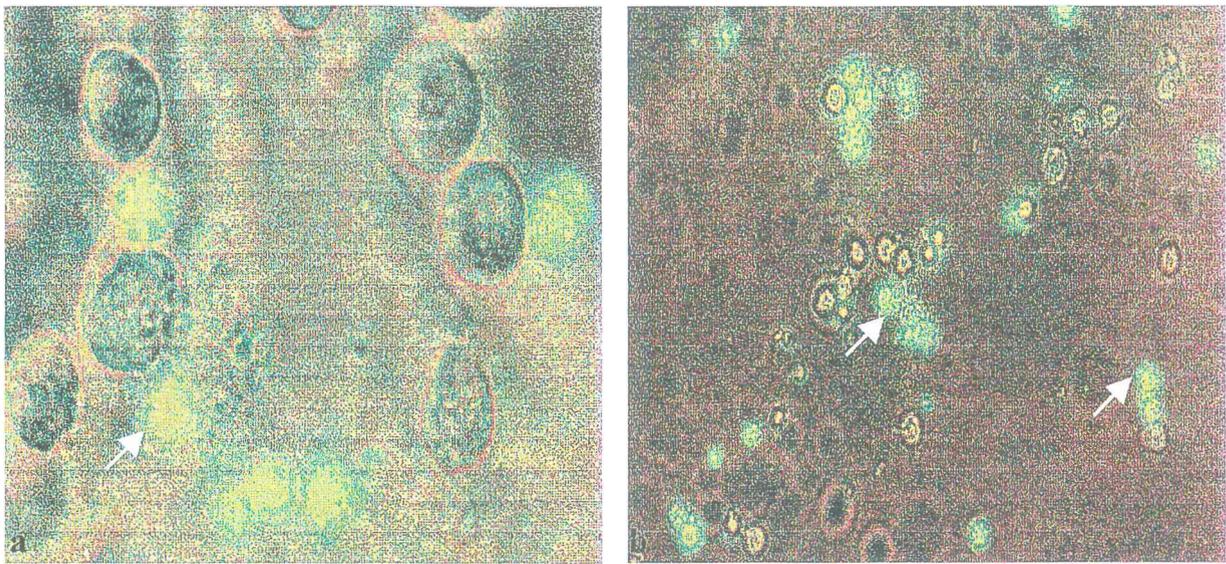


Figura 10. Visualização da indução à apoptose através da expressão da fosfatidilserina. As células HL60 foram plaqueadas (5×10^5 céls./mL) e incubadas na (a) presença da oncofalyxona A ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) e na (b) presença da doxorubicina ($0,05 \mu\text{g}/\text{mL}$) durante 48 h, em estufa a 5% de CO_2 , a 37°C . A expressão das células marcadas pela presença da fosfatidilserina foi identificada através da fluorescência ($n = 2$).

5. Estudo da Citotoxicidade dos Compostos Oncocalyxonas A e C Comparados com a Mitoxantrona e Doxorubicina

Os estudos anteriores demonstraram que as oncocalyxonas A e C foram os compostos citotóxicos mais promissores dos estudos preliminares. Com o intuito de avaliar, comparativamente, o perfil citotóxico dessas duas quinonas em relação a duas outras, doxorubicina e mitoxantrona, já utilizadas na terapêutica anticâncer, foram realizados experimentos pelo mesmo método do MTT, já descrito anteriormente. Embora, as oncocalyxonas A e C tenham demonstrado menor potência do que as antraquinonas, doxorubicina e mitoxantrona, deve ser ressaltada a importância da sua seletividade citotóxica pelas células leucêmicas (CEM e HL60) (**tabela 8**). As oncocalyxonas A e C apresentaram-se com potências citotóxicas estatisticamente diferentes (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, respectivamente) nas células CEM quando comparadas as outras linhagens (**tabela 8**).

Na prospecção de novas drogas antineoplásicas é de fundamental importância a busca de novas moléculas ativas em neoplasias resistentes aos fármacos já utilizados na terapêutica. Nesse sentido, foram obtidas partir da linhagem SW1573, células resistentes a múltiplas drogas, SW1573-S1 e SW1573-2R160. Assim, foi possível avaliar a atividade dos compostos estudados. O resultado mais relevante, foi a demonstração da maior sensibilidade dessas linhagens as oncocalyxonas A e C quando comparadas a doxorubicina e mitoxantrona (**tabela 9**).

Tabela 8. Valores das IC₅₀ em diferentes linhagens celulares

Linhagem Celular	IC ₅₀ (média ± DP)			
	Oncocalyxona A (µg/mL)	Oncocalyxona C (µg/mL)	Mitoxantrona (ng/mL)	Doxorrubicina (ng/mL)
CEM	1,2 ± 0,5**	1,5 ± 0,8**	0,7 ± 0,3**	4,0 ± 1,8**
HL60	3,0 ± 1,7*	3,3 ± 1,2*	1,3 ± 0,6**	6,3 ± 3,5
MCF-7	15 ± 8,7	13 ± 6,0	3,0 ± 2,0*	20 ± 10
U373MG	18 ± 3,2	17 ± 2,0	2,2 ± 0,5*	20 ± 10
SW-837	14 ± 3,2	10 ± 3,0	3,0 ± 2,0*	8,0 ± 5,7
HCT8	17 ± 2,0	13 ± 5,0	1,2 ± 0,7**	50 ± 22
SW-1573	5,8 ± 1,1	6,0 ± 2,0	0,8 ± 0,2**	5,3 ± 4,0*

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, sendo incubadas em estufa a 5% de CO₂, a 37°C, por 72 h, na presença de concentrações crescentes dos fitoquímicos (0,39-25 µg/mL). Cada concentração foi testada em triplicata e as análises foram realizadas em três determinações. A IC₅₀ corresponde à inibição de 50% do crescimento celular (média ± desvio padrão). Obs. *p<0,05; **p<0,01.

Tabela 9. Citotoxicidade dos compostos das oncocalyxonas A e C, mitoxantrona e doxorrubicina em linhagens pulmonares multiresistentes às drogas

Linhagem Celular	IC ₅₀ (média ± DP)			
	Oncocalyxona A (µg/mL)	Oncocalyxona C (µg/mL)	Mitoxantrona (ng/mL)	Doxorrubicina (ng/mL)
SW-1573	5,8 ± 1,1	6,0 ± 2,0	0,8 ± 0,2	5,3 ± 4,0
SW-1573-S1	6,0 ± 2,0	11 ± 4,0**	2,3 ± 1,5	50 ± 17*
SW-1573-2R160	14 ± 6,0**	13 ± 6,0**	92 ± 30**	1700 ± 290**

As células foram plaqueadas em placas multiwell de 96 poços, sendo incubadas em estufa a 5% de CO₂, a 37°C, por 72 h, na presença de concentrações crescentes dos fitoquímicos (0,39-25 µg/mL). Cada concentração foi realizada em triplicata e as análises foram realizadas em três determinações. A IC₅₀ corresponde a inibição de 50% do crescimento celular (média ± desvio padrão). Obs. *p<0,05; **p<0,01.

6. Valores Comparativos da IC₅₀ da Oncocalyxona A e seus Derivados

A promissora atividade da oncocalyxona A direcionou a obtenção dos derivados semi-sintéticos clorooncocalyxona A, acetiloncocalyxona A e o diacetiloncocalyxona A.

A citotoxicidade desses compostos nas células CEM e SW-1573 foi avaliada utilizando a metodologia do MTT. A **tabela 10** e a **figura 11** apresentam os resultados da IC₅₀, nas quais pode ser constatado que a clorooncocalyxona A e a diacetiloncocalyxona A foram 2 vezes menos citotóxicas, e a acetiloncocalyxona A praticamente não apresentou diferença quando comparada à oncocalyxona A nas células CEM. Na linhagem SW-1573 não houve diferença entre os compostos. Mesmo assim, todos os compostos na concentração entre 3 e 5 µg/mL causaram morte nas linhagens estudadas, o que foi evidenciado por diminuição da atividade redutiva do MTT.

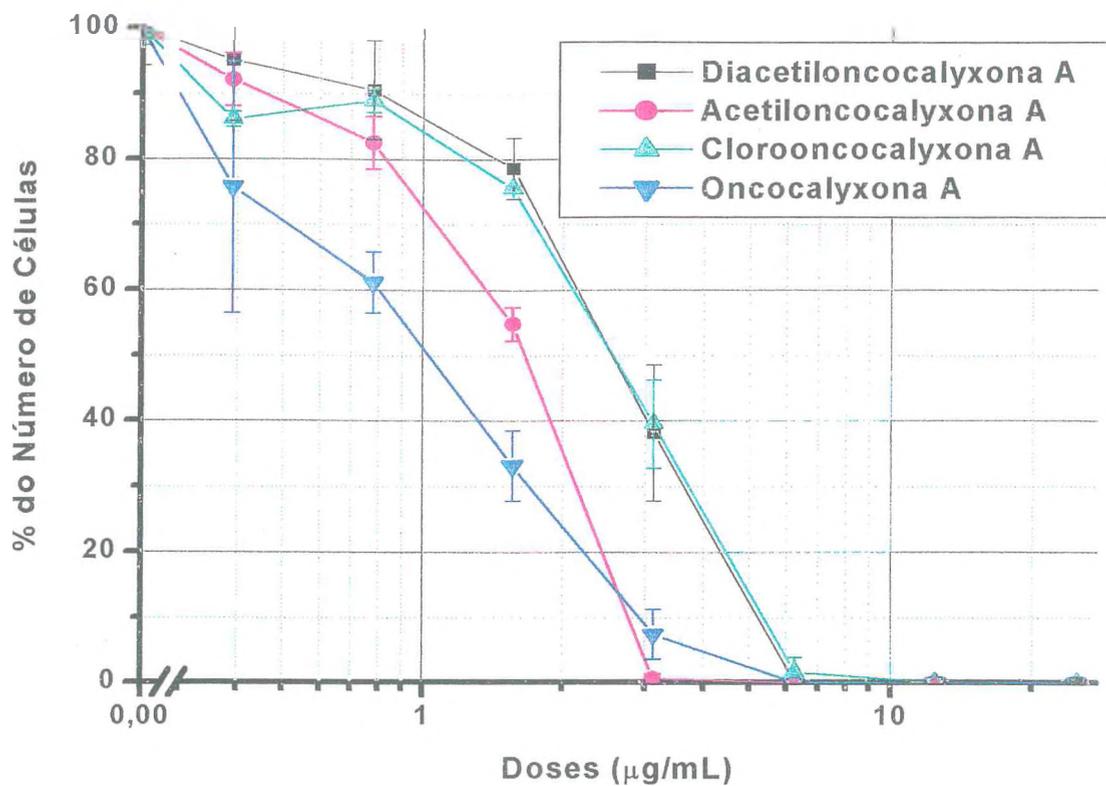


Figura 11. Ação citotóxica dos compostos derivados da oncoalyxona A nas células CEM. Porcentagem de células viáveis em relação ao efeito das diferentes concentrações dos compostos que constam na legenda. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de triplicatas em três diferentes experimentos.

Tabela 10. Determinação da IC₅₀ dos compostos derivados da oncocalyxona A (1,4-antracenodionas) nas células CEM e SW-1573

Compostos	IC ₅₀ (média (µg/mL)) ± DP)	
	CEM	SW-1573
(1) oncocalyxona A	1,4 ± 0,5	4,9 ± 1,5
(2) clorooncocalyxona A	3,3 ± 0,7*	4,7 ± 0,1
(3) acetilooncocalyxona A	2,0 ± 0,2	3,3 ± 0,4
(4) diacetilooncocalyxona A	3,5 ± 1,3*	5,2 ± 0,2

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, sendo em seguida incubadas em estufa a 5% de CO₂, a 37°C, por 72 h, na presença de concentrações crescentes dos compostos (0,39-25 µg/mL). Cada concentração foi realizada em triplicata e em três diferentes experimentos, determinando-se a IC₅₀. Obs. *p<0,05.

7. Dano ao DNA após Exposição dos Derivados da Oncocalyxona A

O dano ao DNA foi avaliado nas células CEM pelo análise de fluoresceína medindo diferentes ligações da bisbenzamida a fita simples e dupla do DNA, após 24 h de incubação com oncocalyxona A (1) e seus três derivados: clorooncocalyxona A (2), acetiloncocalyxona A (3) e diacetiloncocalyxona A (4), nas concentrações de 2 e 5 µg/mL, em estufa a 5% de CO₂, a 37°C (**figuras 12 e 13**).

A oncocalyxona A e os seus três derivados, na concentração de 5 µg/mL, causaram significativo dano ao DNA nas células CEM ($p < 0,01$), nota-se que a acetiloncocalyxona A causou um maior dano ao DNA (**figura 13**). Enquanto, que na concentração de 2 µg/mL, somente a oncocalyxona A causou significativo dano ao DNA ($p < 0,01$) (**figura 12**).

Os compostos oncocalyxona A (1), clorooncocalyxona A (2) e acetiloncocalyxona A (3), na concentração de 5 µg/mL, mostraram-se significativamente iguais a nível de significância 5% ($p < 0,05$) (**figura 13**). Na concentração de 2 µg/mL, apenas a oncocalyxona A apresentou uma significativa reatividade ao DNA ($p < 0,001$) (**figura 12**).

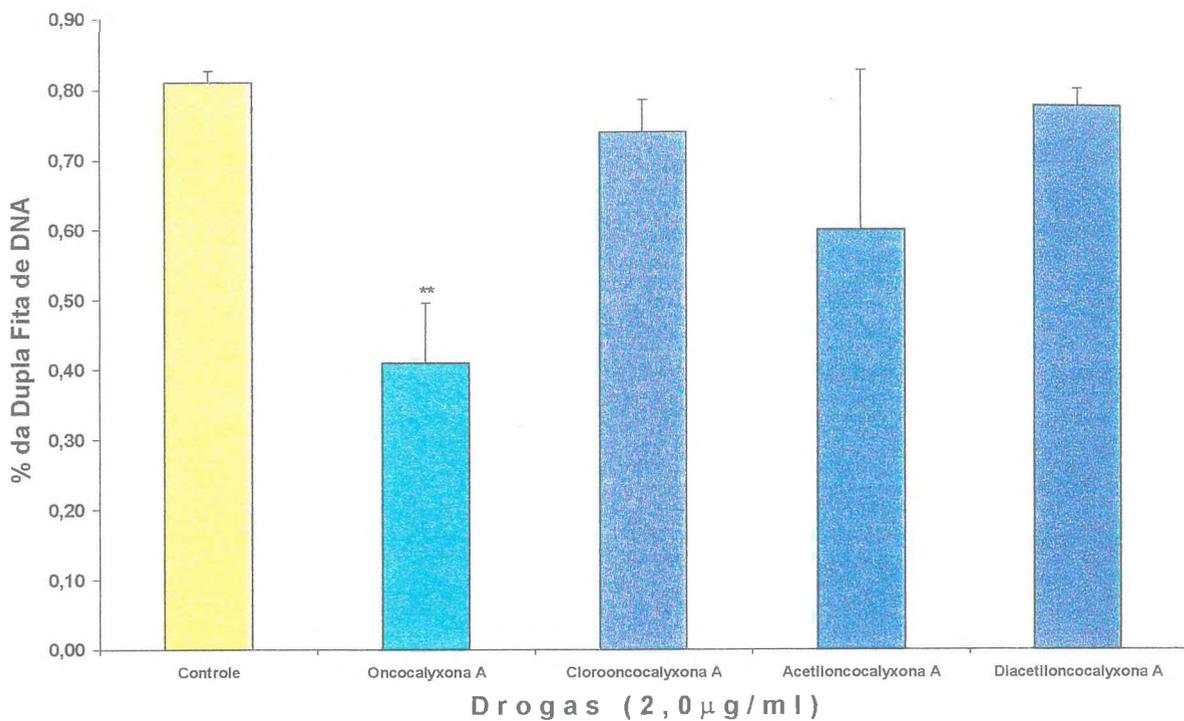


Figura 12. Determinação do dano ao DNA nas células CEM durante 24 h de incubação. A figura representa a quantidade da dupla fita de DNA ligada à bisbenzamida nas células incubadas com controle (sem droga), oncocalyxona A, clorooncocalyxona A, acetiloncocalyxona A e diacetiloncocalyxona A na concentração de 2 µg/mL, com o DNA, medido através do percentual da dupla fita de DNA (n = 3). Obs. **p<0,01.

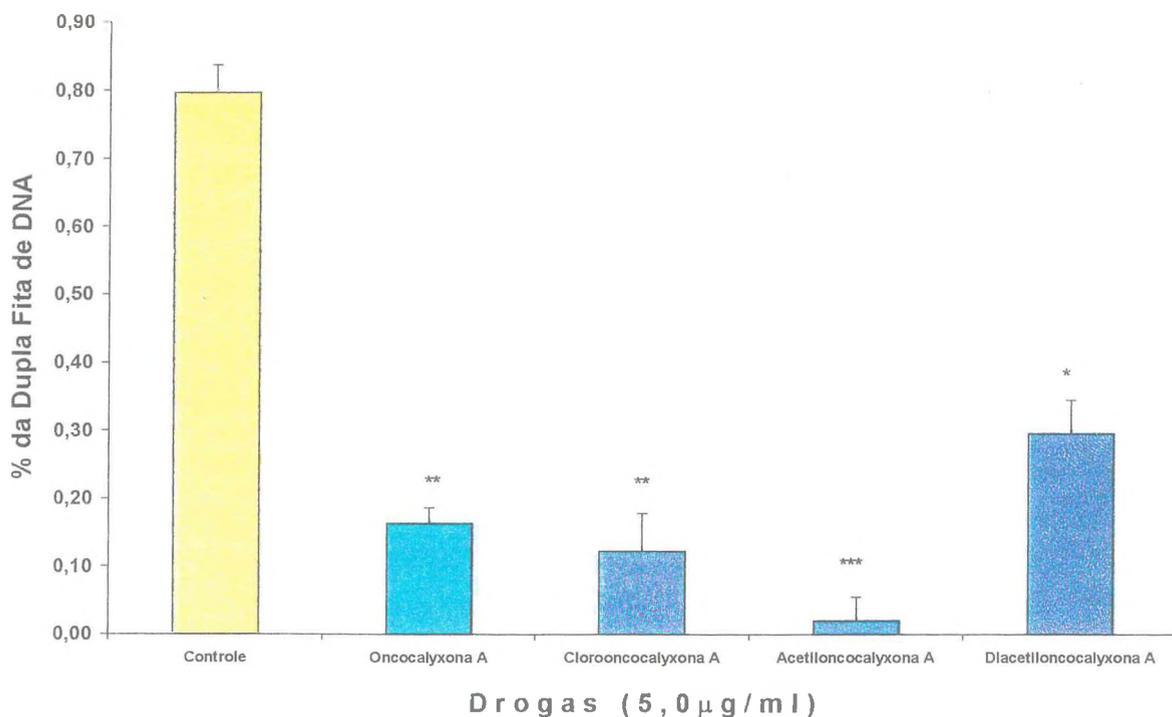


Figura 13. Determinação do dano ao DNA nas células CEM durante 24 h de incubação. A figura representa a quantidade da dupla fita de DNA ligada à bisbenzamida nas células incubadas com controle (sem droga), oncocalyxona A, clorooncocalyxona A, acetiloncocalyxona A e diacetiloncocalyxona A na concentração de 2 µg/mL, com o DNA, medido através do percentual da dupla fita de DNA (n = 3). Obs. **p<0,01.

8. Análise da Topoisomerase II

Os efeitos da oncocalyxona A (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$), da doxorubicina (1 $\mu\text{g/mL}$) e do etoposida (1 $\mu\text{g/mL}$) foram observados nos extratos nucleares das células CEM e SW-1573 com 3×10^7 céls./mL e $7,5 \times 10^6$ céls./mL, respectivamente. A incubação com as drogas foi a 4°C , durante de 30 a 45 min de reação com o substrato. Nas células CEM, o resultado da interação droga-topoisomerase II não foi conclusivo em virtude de não ter demonstrado tanta intensidade quanto na linhagem SW-1573. Entretanto, com as células SW-1573 o controle apresentou forte fluorescência nas suas bandas, que não foram tão intensas quando observadas com oncocalyxona A, presumindo a possível interação desse com as topoisomerasas (**figura 14**).

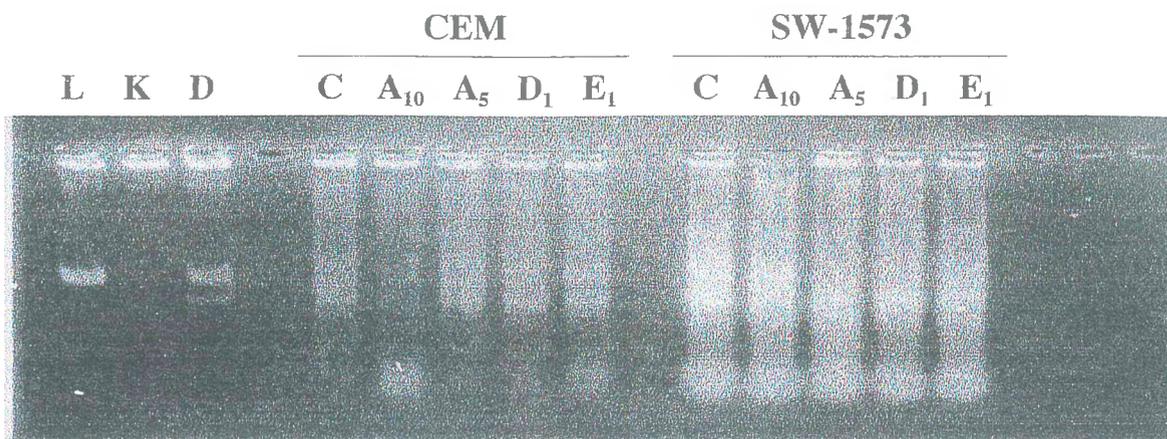


Figura 14. Análise da topoisomerase II em gel de eletroforese (1% de agarose).

Legendas: L = DNA linear; K = kDNA; D = DNA Decantado; C = Controle; A₁₀ = oncocalyxona A (10 µg/mL); A₅ = oncocalyxona A (5 µg/mL); D₁ = Doxorubicina (1 µg/mL); E₁ = Etoposida (1 µg/mL)

9. Sobrevida dos Animais Inoculados com o Carcinoma de Ehrlich

As **figuras 15, 16, 17 e 18** mostram a sobrevida dos animais após inoculação das células Carcinoma de Ehrlich (1×10^6 céls./0,2 mL) por via subcutânea, após o tratamento alternado em diferentes dias com as referidas substâncias. Os animais pertencentes ao grupo controle apresentaram sobrevida média de 43 dias, enquanto que os animais tratados com AOE (50 mg/Kg) apresentaram sobrevida média de 30 dias e o grupo tratado com o 5-Fluorouracil (20 mg/Kg) apresentou sobrevida média de 43 dias. Esses resultados mostram que não houve aumento de sobrevida entre os grupos.

Nos grupos dos animais tratados com doses mais elevadas de oncocalyxona A (70 mg/Kg) e 5-Fluorouracil (40 mg/Kg), a média de sobrevida foi de 24 e 28 dias, respectivamente, e o controle foi de 21 dias. A diferença entre os grupos 5-Fluorouracil e o controle foi significativa ($p < 0,001$). Entretanto, não houve diferença entre os grupos referentes à oncocalyxona A e ao 5-Fluorouracil e os grupos oncocalyxona A e o controle (**figuras 17 e 18**).

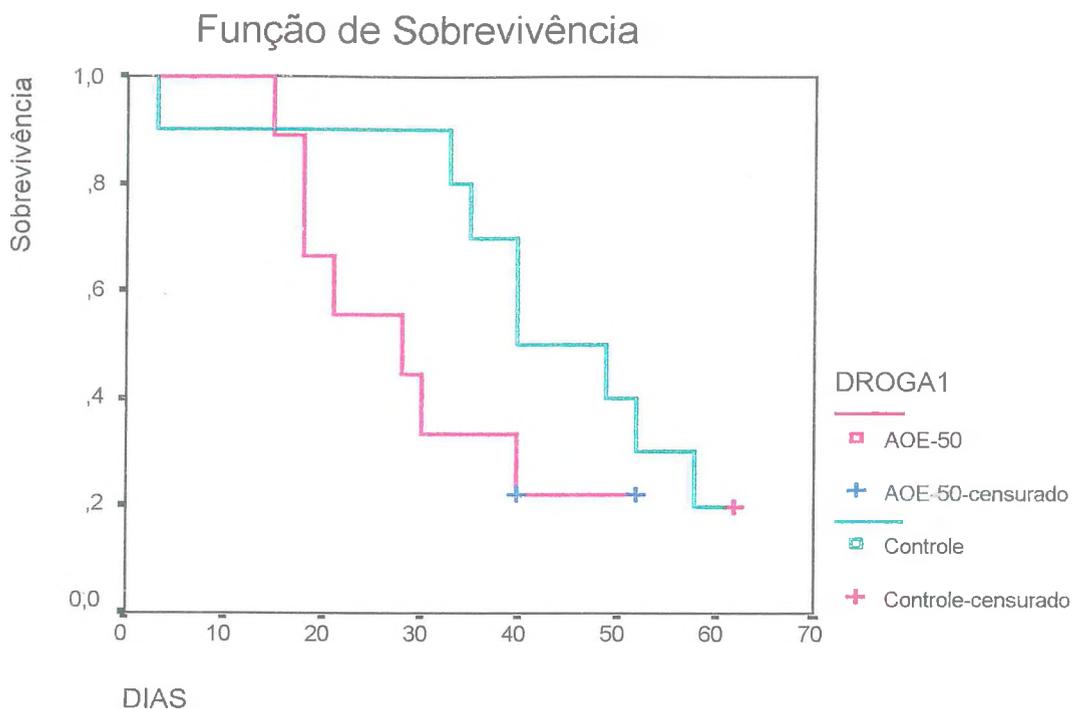


Figura 15. Porcentagem de sobrevivência dos animais com Carcinoma de Ehrlich pertencentes aos grupos Controle e AOE (50 mg/Kg). Censurado = desaparecido durante o experimento.

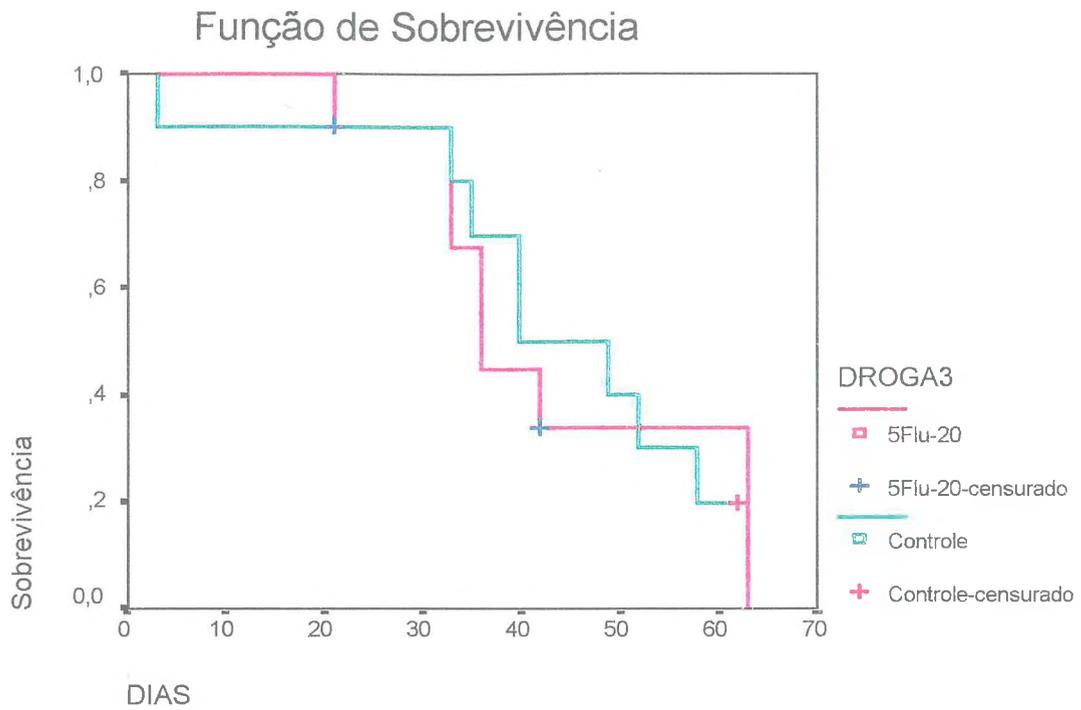


Figura 16. Porcentagem de sobrevida dos animais com Carcinoma de Ehrlich pertencentes aos grupos Controle e 5-FU (20 mg/Kg). Censurado = desaparecido durante o experimento.

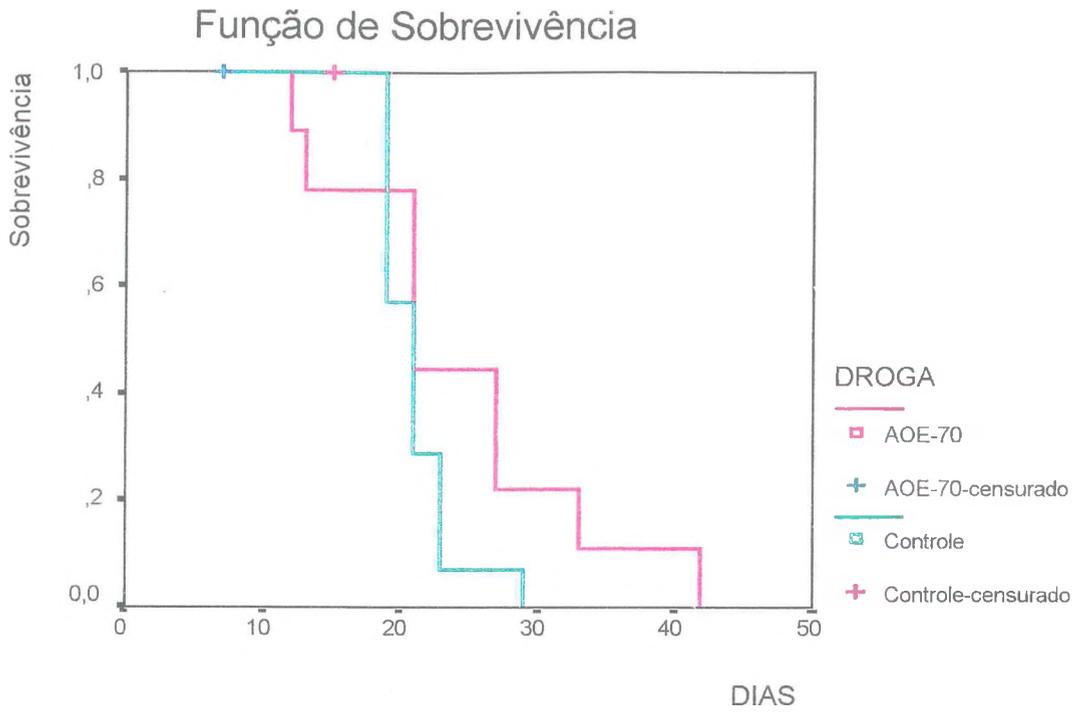


Figura 17. Porcentagem de sobrevivência dos animais com Carcinoma de Ehrlich pertencentes aos grupos Controle e AOE (70 mg/Kg). Censurado = desaparecido durante o experimento.

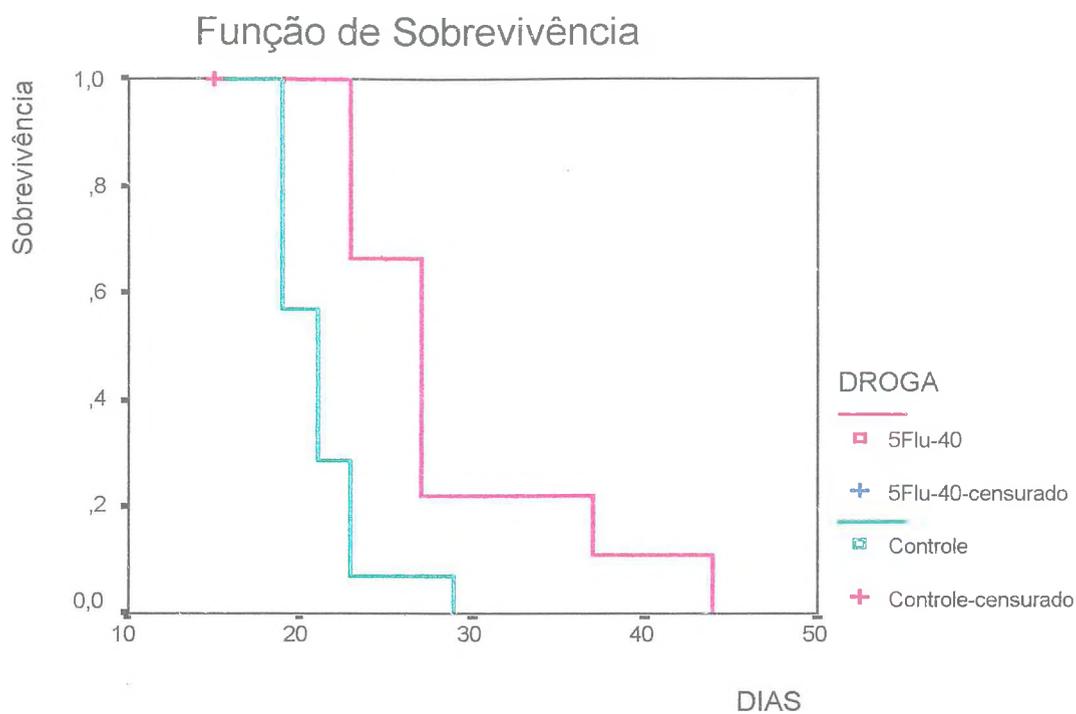


Figura 18. Porcentagem de sobrevida dos animais com Carcinoma de Ehrlich pertencentes aos grupos Controle e 5-FU (40 mg/Kg). Censurado = desaparecido durante o experimento.

10. Sobrevida dos Animais Inoculados com o Sarcoma 180

As **figuras 19 e 20** apresentam a sobrevida dos animais após inoculação das células Sarcoma 180 (1×10^6 cél/0,2mL) por via subcutânea, após o tratamento alternado em diferentes dias com as referidas substâncias. Os animais pertencentes ao grupo controle apresentaram sobrevida média de 17 dias, enquanto os animais tratados com AOE (50 mg/Kg) foram de 18 dias e os tratados com 5-Fluorouracil (20 mg/Kg) foi de 21 dias, havendo diferença significativa nesse último grupo em relação ao controle ($p < 0,05$).

No grupo dos animais tratados com doses mais elevadas de AOE (70 mg/Kg) e 5-Fluorouracil (40 mg/Kg), a média de sobrevida foram de 34 e 33 dias, respectivamente. Enquanto que no controle foi de 35 dias, não havendo diferença significativa entre os animais tratados e o controle (**figuras 21 e 22**).

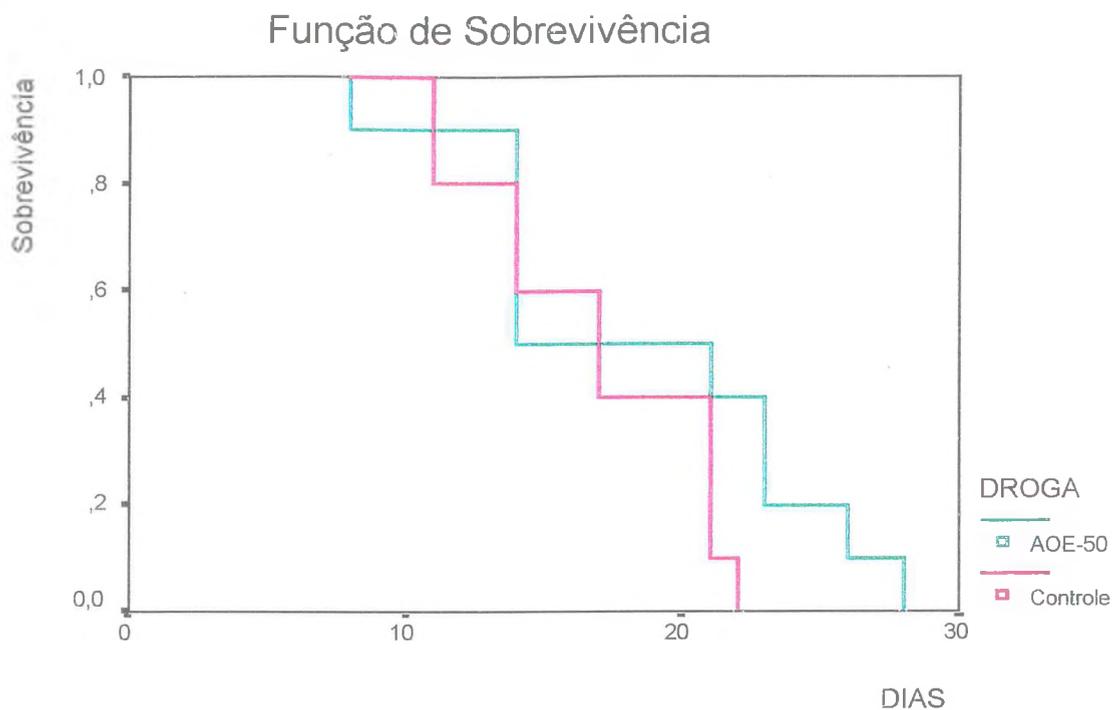


Figura 19. Porcentagem de sobrevivência dos animais com Sarcoma 180 pertencentes aos grupos Controle e AOE (50 mg/Kg). Censurado = desaparecido durante o experimento.

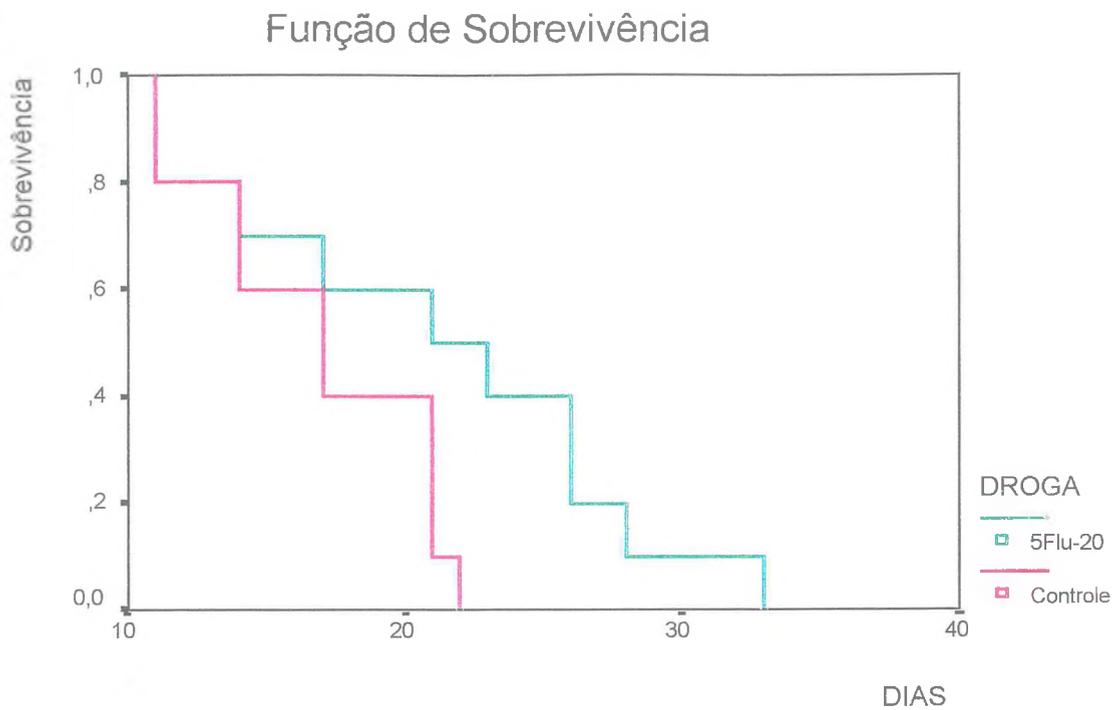


Figura 20. Porcentagem de sobrevida dos animais com Sarcoma 180 pertencentes aos grupos Controle e 5-FU (20 mg/Kg). Censurado = desaparecido durante o experimento.

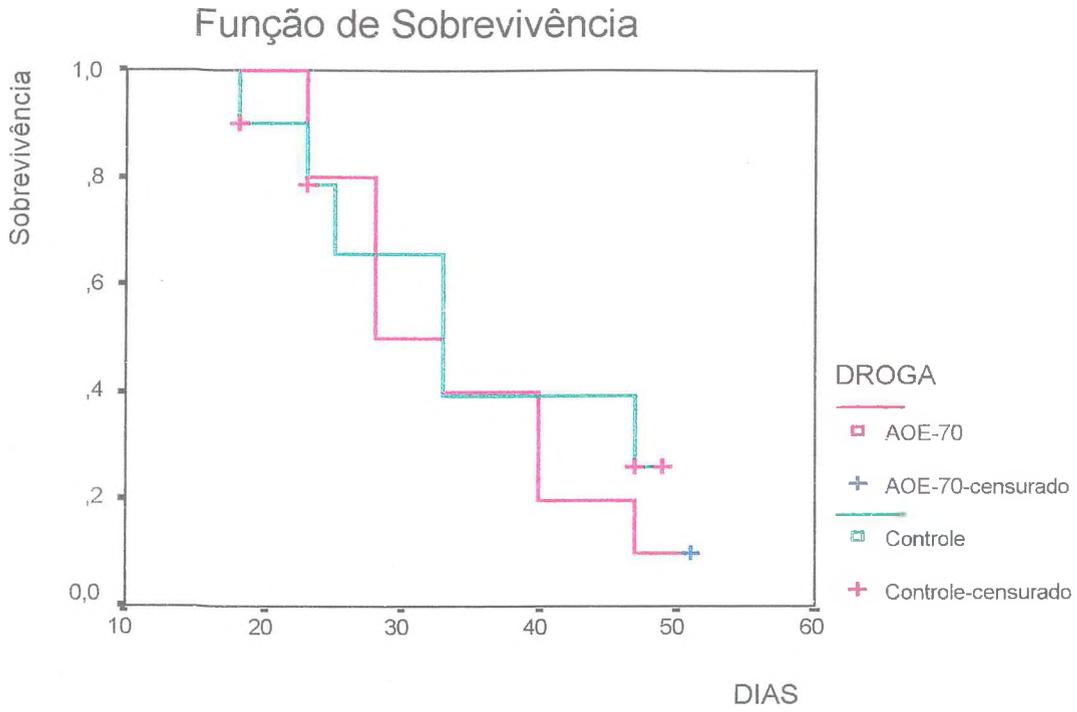


Figura 21. Porcentagem de sobrevida dos animais com Sarcoma 180 pertencentes aos grupos Controle e AOE (70 mg/Kg). Censurado = desaparecido durante o experimento.

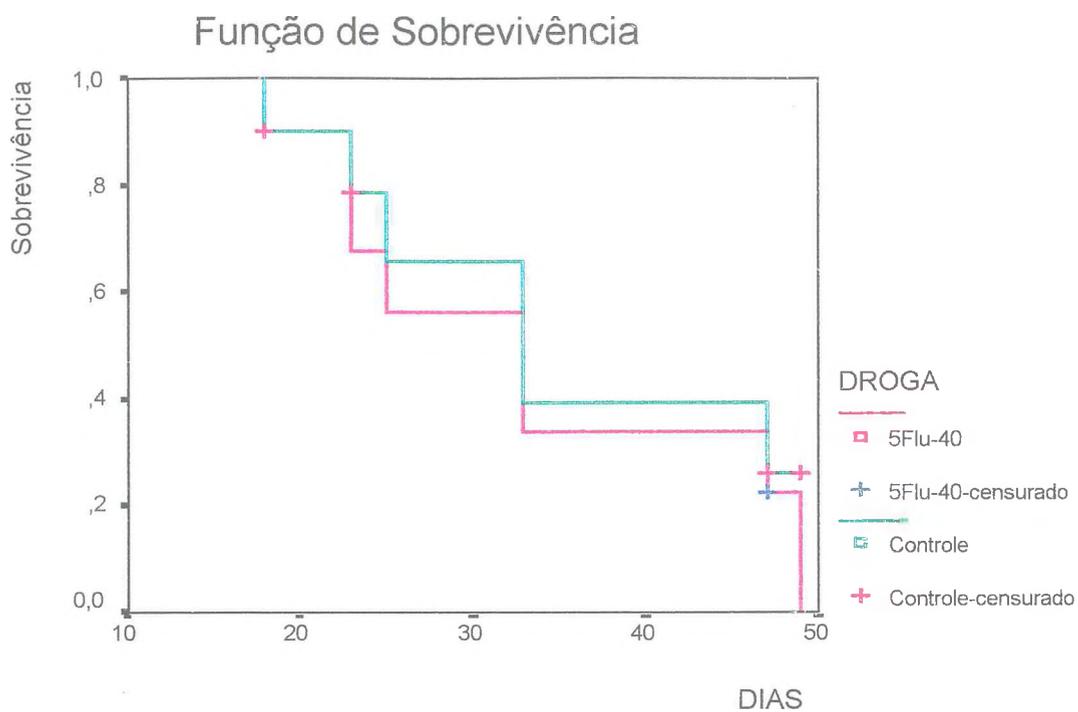


Figura 22. Porcentagem de sobrevida dos animais com Sarcoma 180 pertencentes aos grupos Controle e 5-FU (40 mg/Kg). Censurado = desaparecido durante o experimento.

11. Variação do Peso dos Animais Durante a Observação de Sobrevida

Os animais com Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich não apresentaram variação no peso corporal durante o período de tratamento com AOE (50 e 70 mg/Kg), 5-Fluorouracil (20 e 40 mg/Kg) e controle (5% de DMSO) durante o período de tratamento (resultado não mostrado).

12. Comparação da Citotoxicidade dos Cromatogramas da Oncocalyxona A com a Fração Clorofórmica da *Auxemma oncocalyx* (FCAO)

O cromatograma da fração clorofórmica da *Auxemma oncocalyx* Taub mostrou a presença de quatro diferentes picos, com diferentes tempos de retenção. Dentre esses picos, um dos compostos apresentou tempo de retenção de 7,011 min próximo ao obtido com a oncocalyxona A de 6,971 min (**figura 23**). Esses resultados levaram-nos a realizar a curva de calibração, em que o percentual da oncocalyxona A na FCAO foi de aproximadamente 28%.

A citotoxicidade das diferentes frações coletadas no HPLC em placas de 96 poços a cada 15 seg. foram determinadas pelo método do MTT. O potencial citotóxico da oncocalyxona A foi igual a um dos compostos presentes na fração FCAO (**figura 24**).

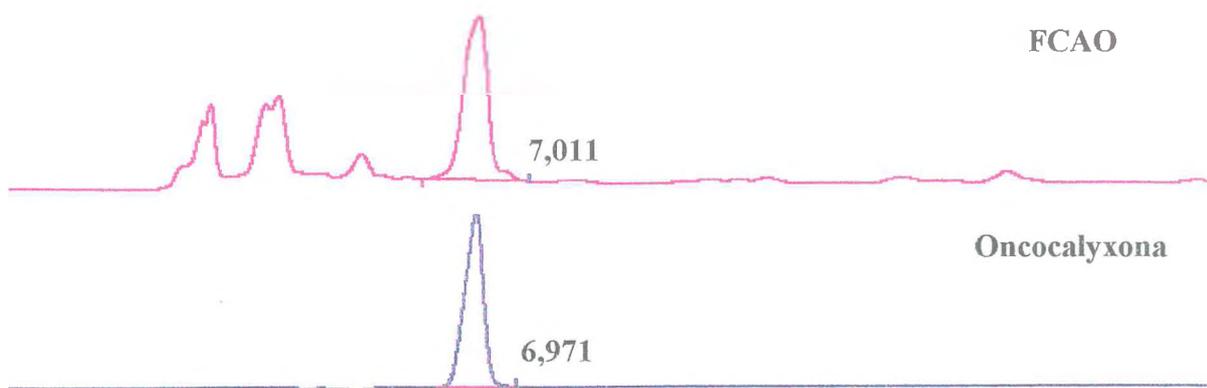


Figura 23. Cromatograma comparativo da fração clorofórmica da *Auxemma oncocalyx* e a *oncocalyxona A* no comprimento de onda de 254 nm.

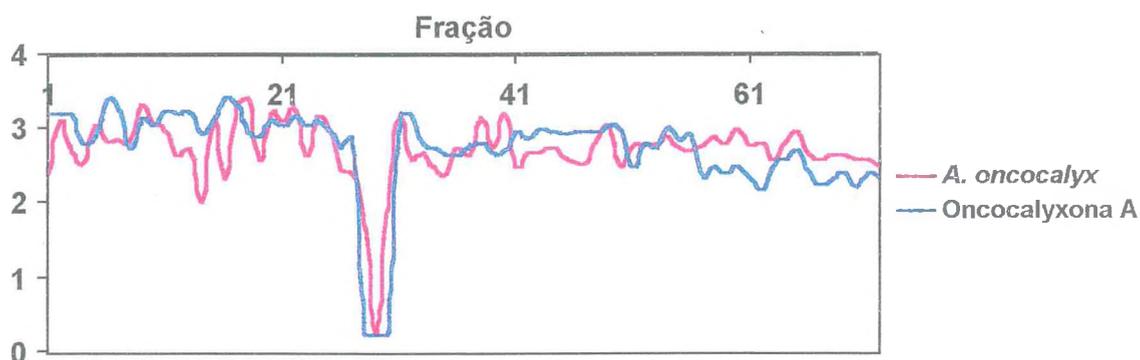


Figura 24. Análise da citotoxicidade das frações da *Auxemma oncocalyx* Taub e *oncocalyxona A* coletadas no HPLC. As frações do extrato clorofórmico da *A. oncocalyx* foram coletadas a cada 15 seg. e incubadas na presença de células CEM, em 5% de CO₂, a 37°C, por 72 h.

13. Determinação da Toxicidade Aguda

Na determinação da toxidez aguda da fração clorofórmica da *Auxemma oncocalyx*, utilizou-se doses entre 100 e 2000 mg/Kg, como expressa a **tabela 11**. Nas doses de 100 e 200 mg/Kg, não foi observado nenhuma alteração comportamental e os animais permaneceram vivos durante as 48 h de observação. Porém, nas doses de 1000 e 2000 mg/Kg, os animais apresentaram perda de postura, arreflexia, sedação e analgesia, vindo a morrer após 50 min da aplicação da droga. A determinação da DL₅₀ foi aproximadamente $498 \pm 67,98$ g/mL.

Tabela 11. Determinação da toxicidade aguda – DL₅₀

Droga Teste (mg/Kg)	Animais Mortos	Animais Vivos	% de Mortos	% Corrigida de Animais Mortos	Valor Probita
2000	10	0	100		
1000	10	0	100	97,5	6.967
500	6	4	60	60	5.253
250	0	10	0	2,5	3.032
100	0	10	0		

14. Inibição do Crescimento Tumoral

Os efeitos inibitórios ou estimulatórios do crescimento tumoral foram observados e seguiu-se os critérios descritos por Fávoro (1990) sendo considerados significativos os efeitos inibitórios acima de 40% no crescimento tumoral.

Os animais com Carcinoma de Ehrlich foram tratados durante 10 dias consecutivos com a fração clorofórmica *Auxemma oncocalyx* A (70 mg/Kg), 5-Fluorouracil (30 mg/Kg) e o Controle (5% de DMSO). Após o tratamento, foi verificada inibição do crescimento tumoral de 50% e 37% no grupo tratado com oncocalyxona A ($p < 0,01$) e 5-Fluorouracil, respectivamente, em relação ao controle (**figura 25**). O mesmo não foi observado em relação aos animais com Sarcoma 180 após o tratamento com os referidos compostos (**figura 26**).

Nos animais inoculados com a linhagem leucêmica L1210, houve uma inibição significativa de 42% ($p < 0,05$) e de 58% ($p < 0,01$) para os animais tratados com a fração clorofórmica da *Auxemma oncocalyx* (100 mg/Kg), e para o 5-Fluorouracil (30 mg/Kg), respectivamente (**figura 27**).

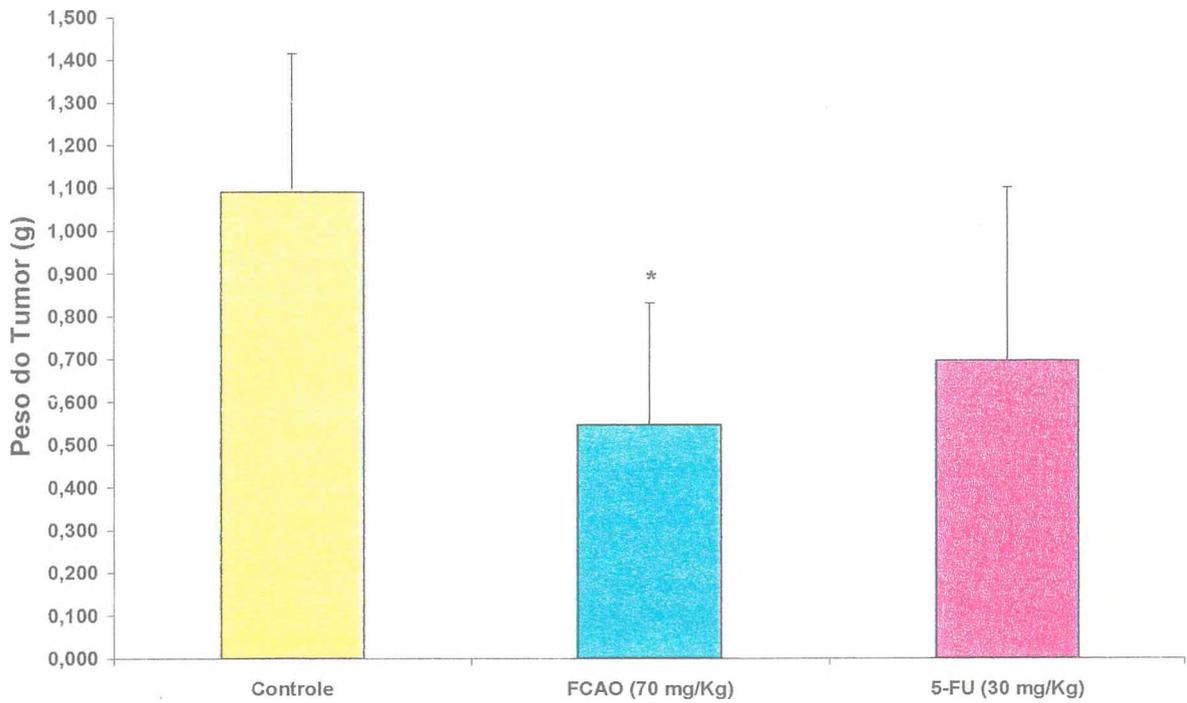


Figura 25. Inibição do crescimento tumoral no Carcinoma de Ehrlich após 10 dias de tratamento. Os animais foram tratados com FCAO (70 mg/Kg) e 5-FU (30 mg/Kg) durante 10 dias consecutivos (n = 6). Obs. * $p < 0,01$.

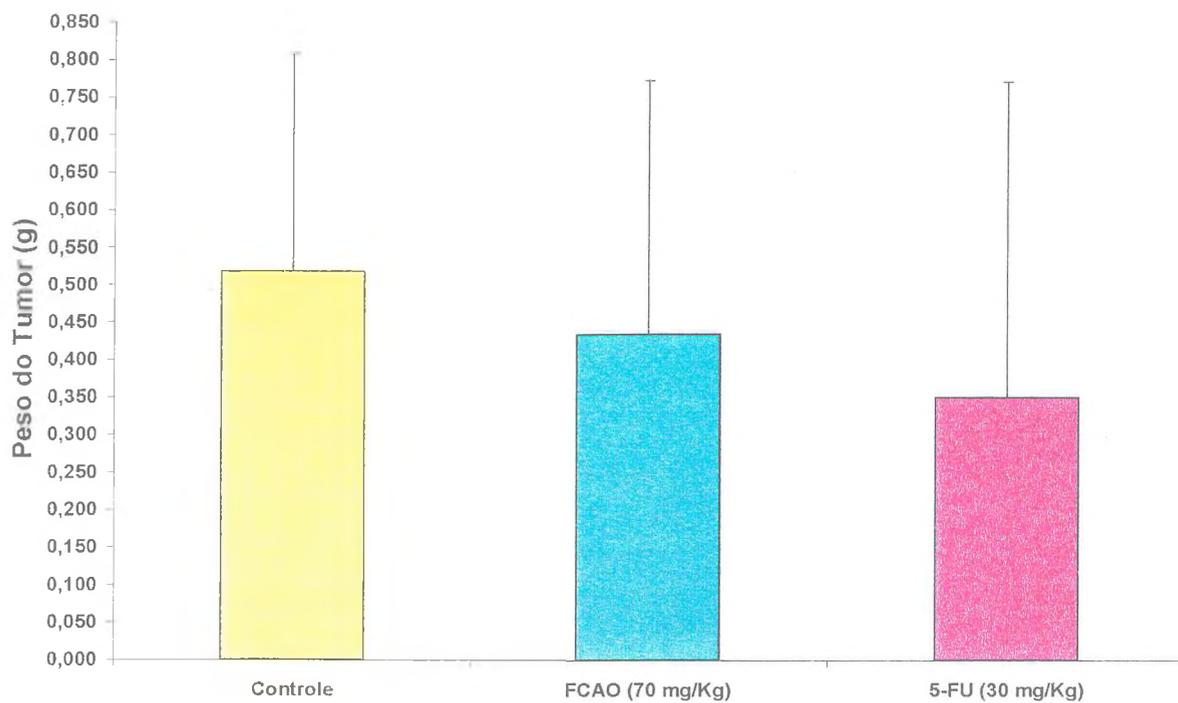


Figura 26. Inibição do crescimento tumoral no Sarcoma 180 após 10 dias de tratamento. Os animais foram tratados com FCAO (70 mg/Kg) e 5-FU (30 mg/Kg) durante 10 dias consecutivos (n = 6).

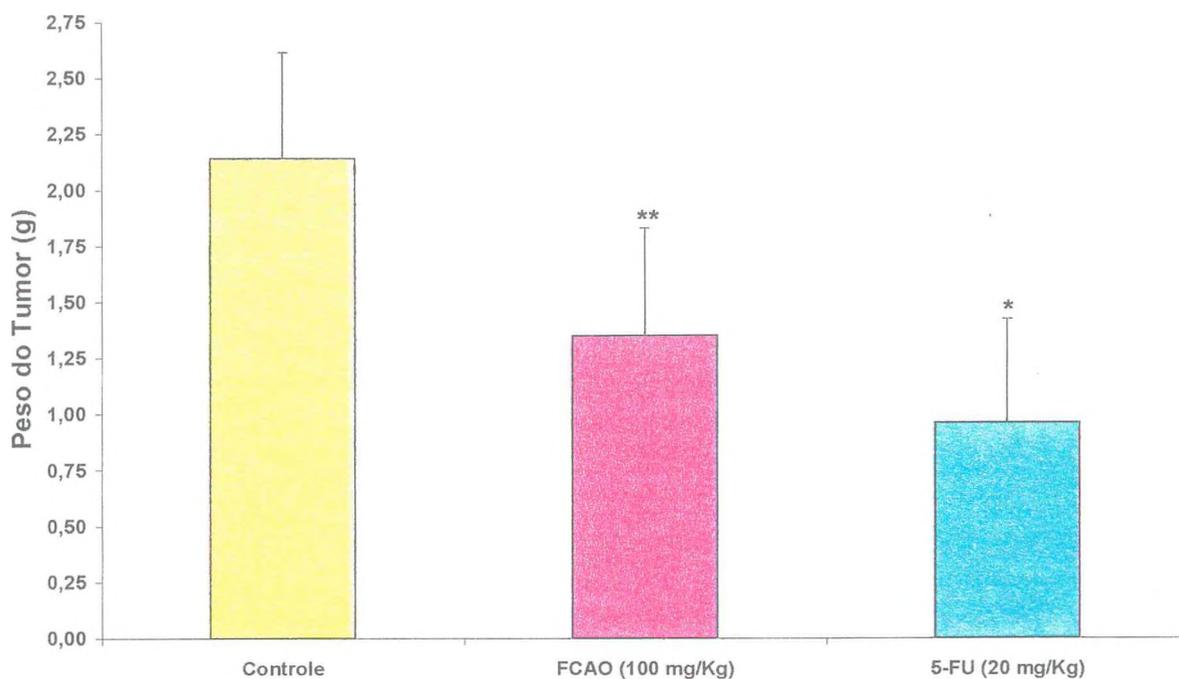


Figura 27. Inibição do crescimento tumoral da Linhagem Leucêmica L1210 após 10 dias de tratamento. Os animais foram tratados com FCAO (100 mg/Kg) e 5-FU (30 mg/Kg) durante 10 dias consecutivos (n = 6). Obs. * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$.

Tabela 12. Inibição do crescimento tumoral

Tumor	Composto	Dose (mg/Kg)	Peso Médio do Tumor ± Desvio (g)	Inibição do Tumor (%)
Ca. de Ehrlich	FCAO	70	0,546±0,28	50,00*
	5-FU	30	0,694±0,40	36,69
	Controle	5% de DMSO	1,090±0,32	-
Sarcoma 180	FCAO	70	0,434±0,29	16,20
	5-FU	30	0,350±0,34	32,40
	Controle	5% de DMSO	0,518±0,29	-
L1210	FCAO	100	1,35±0,48	42,0*
	5-FU	25	0,96±0,46	58,0**
	Controle	5% DMSO	2,30±0,47	-

Porcentagem da inibição do crescimento tumoral em diferentes tumores após 10 dias de tratamento (n = 6). Obs. *p<0,01; ** p<0,005.

V. DISCUSSÃO

O *screening* racional de produtos naturais como fonte de drogas antineoplásicas vem sendo norteado no sentido da obtenção de novos fármacos (Haunuske, 1996; Ishioka *et al.*, 1998). A análise citotóxica *in vitro* tem provado ser eficiente na prospecção de potentes agentes antitumorais, entretanto alguns compostos somente tornam-se ativos após formação de metabólitos, sendo portanto efetivos após testes *in vivo*, a exemplo da ciclofosfamida, que mostra atividade após ser transformada em metabólitos alquilantes ativos pelas enzimas microsossomais do fígado (Dolfini *et al.*, 1973; Ching *et al.*, 1991).

Apesar do programa de *screening* no NCI ter sido de baixa produtividade e de pouco suporte, a excitante descoberta de uma das mais novas drogas na recente história foi o Taxol, resultado direto desse esforço (Wani *et al.*, 1971). Desse modo, muitas drogas anticâncer são produtos naturais obtidos de plantas ou microorganismos, sendo ricas fontes usadas no tratamento de diversas doenças. A terapêutica de produtos naturais na quimioterapia do câncer distingue-se pelo fato de que muitas drogas correntemente são originárias de produtos naturais (Clark *et al.*, 1996; De Smet, 1997; Pettit *et al.*, 1994).

Nesse estudo, foram avaliados onze fitocompostos obtidos de diversas plantas do Nordeste do Brasil, os quais caracterizam-se pela diversidade estrutural. Dos onze compostos, quatro apresentaram atividade antiproliferativa nas linhagens de culturas de células humanas tumorais, de diversas origens histológicas. Os testes nas linhagens humanas foram utilizados em virtude de que os estudos de Venditi (1983) utilizando linhagem de leucemia murina mostravam que muitas drogas antineoplásicas apresentaram um pré-*screening* negativo. Entretanto, estas drogas quando testadas em tumores humanos, mostravam atividade inibitória na formação de colônias, sugerindo que a análise de *screening* usando células humanas era de importância significativa preferencial às linhagens murinas (Shoemaker *et al.*, 1984).

Dos compostos estudados, as oncocalyxonas A e C, obtidas da *Auxemma oncocalyx*, e a clerodano A e ternatina, originadas da *Egletes viscosa* Less, foram as que se destacaram na inibição do crescimento celular, particularmente na linhagem CEM (pró-mielocítica). Por outro lado, a jatrofona também inibiu o crescimento celular, mas de maneira inespecífica (Pessoa, *et al* 1999), de acordo com os achados obtidos com a *Jatropha gossypifolia* por Taylor (1983). Os estudos de Finlay (1984) e Alley *et al* (1996) demonstraram que a citotoxicidade é maior nas linhagens leucêmicas e de mama do que nos tumores sólidos como a linhagem SW 1573 e o câncer de colón, o que não foi evidenciado com a oncocalyxona A.

Dentre as plantas a *Auxemma oncocalyx* se destacou pelo potencial antitumoral (Pessoa *et al.*, 2000), que a identificou como uma das plantas com possível potencialidade anticâncer. Nesse estudo, foi observado pela primeira vez a potencialidade citotóxica do extrato hidro-alcoólico da referida planta nas células Kb, cuja IC₅₀ foi de 40 µg/mL e a inibição do crescimento tumoral de 46% e 43% no carcinoma de Ehrlich e sarcoma 180, nas doses de 300 e 100 mg/Kg, respectivamente. Acrescenta-se o fato de que, os testes farmacológicos preliminares Pessoa, C 1992; Moraes *et al*, 1997), revelaram características peculiares de dois fitocompostos obtidos da planta, oncocalyxona A e oncocalyxona C (Pessoa, 1993; Pessoa, 1992).

A utilização do método do MTT possibilita a visualização da ação citostática ou citotóxica de substâncias (Twentyman *et al.*, 1989). A ação citostática ou antiproliferativa caracteriza-se como a inibição do crescimento celular a qual suprime o aumento sem causar morte das células, enquanto que a atividade citotóxica pode ser definida como aquela que diminui o número de células, com morte celular (Suffness & Douros, 1982; Berridge *et al*, 1996). Neste estudo demonstramos que a oncocalyxona A e C e o clerodano A causaram morte celular, bem como inibição do crescimento nas células ativas metabolicamente, nas

concentrações iguais ou maiores que 2 µg/mL para as oncocalyxonas A e C, e maiores do que 5 µg/mL para o clerodano A. A ternatina somente inibiu o crescimento, como evidenciado pela curva dose-resposta, com uma dose de 25 µg/mL, dose essa que não causou citotoxicidade.

O valor da IC₅₀ para a linhagem leucêmica encontrado para oncocalyxona A e oncocalyxona C foi de 2 µg/mL (6,62 µM), que está próximo a de outros agentes anticâncer que apresentam atividades em concentrações abaixo de 4 µg/mL ou 4 mM (Geran *et al.*, 1972). Entretanto estes compostos apresentaram moderada atividade, com IC₅₀ entre 7-13 µg/mL nas células tumorais (SW-1573) e nas células normais (CCD-922), respectivamente. A Jatrofona destacou-se pela sua inespecificidade, uma vez que sua IC₅₀ foi menor do que 1,0 µg/mL, tanto nas linhagens tumorais quanto nas células normais. Outras substâncias como clerodano B, xantona A, xantiletina, vinhaticol e fasciculatina apresentaram baixa citotoxicidade nas linhagens de células fibrobláticas, leucêmicas e pulmonares, com valores de IC₅₀ próximos 20 - 25 µg/mL. O composto SESSELIN mostrou moderada atividade em todas as três linhagens celulares estudadas com IC₅₀ menor que 17 µg/mL. Dessa maneira, pode-se observar que das drogas estudadas três apresentaram potencialidade citotóxica a serem explorada no estudo da atividade antitumoral (Pessoa *et al.*, 2000a).

Os resultados mostram que várias linhagens têm diferentes sensibilidades ao composto oncocalyxona A, sendo a CEM e a HL60 consideravelmente mais sensíveis do que as linhagens SW-1573, SW-1573-S1, SW-1573-2R160, MCF-7, U373MG, SW-837, HCT8 e CCD-922. Existem inúmeros fatores que juntos causam efetiva seletividade a alguns tecidos proliferativos (Cole, 1986). O conceito de seletividade implica que existe diferença na resposta citotóxica pelas células, por causa da sua propriedade intrínseca. A seletividade pode ser devida à habilidade da célula em reparar o dano ao DNA,

após prévia exposição a agentes citotóxicos, ou pelas mudanças na duração do ciclo celular (Boobis *et al.*, 1990), podendo haver interferência das histonas que envolvem seletivamente o DNA durante diferentes fases do ciclo celular. Assim, é de se esperar que as drogas que se ligam ao DNA irão ter diferentes modelos de seletividade, oferecendo indefinida especificidade a uma variedade de neoplasias humanas (Valeriotte, 1973).

As células resistentes necessitaram concentrações de oncalyxona A 10 vezes a sua IC_{50} obtida nas células CEM, para inibir o crescimento celular. Uma comparação com a doxorrubicina, mostrou um perfil citotóxico semelhante, ou seja, nas sublinhagens das células SW-1573 que são resistentes à doxorrubicina e super expressam o gene *mdr* (SW-1573-2R-160) ou o gene *mrp* (SW-1573-S1 (Kaye, 1998), observamos que essas linhagens foram aproximadamente 500x mais resistentes à doxorrubicina e 100x mais resistentes à mitoxantrona, enquanto que para as oncalyxonas A e C foram apenas 2x menos sensíveis. Considerando que a doxorrubicina, mitoxantrona e as oncalyxonas pertencem ao mesmo grupo químico das quinonas pode-se a conjecturar que o mecanismo citotóxico dessas novas moléculas é possivelmente equivalente ao das antraquinonas (Leyva *et al* 2000).

Baseado na inibição do crescimento celular e no dano ao DNA, os derivados da oncalyxona A mostraram relativa diminuição na reatividade da ao de DNA, podendo ser devido à uma interação com essa molécula. A oncalyxona A é formada por um anel aromático, policíclico e planar, cuja característica é essencial a todos os agentes intercalantes (Lown, 1983). Por outro lado, ao contrário de agentes antitumorais como as antraquinonas, doxorrubicina e mitoxantrona, a oncalyxona A não apresenta, na sua estrutura lateral, radicais de amino-açúcares e/ou amino-alquilaminas, ou radicais hidroxila (Brown, 1983), que parecem ser responsáveis pela forte ligação com o DNA, através da ligação eletrostática com os grupos fosfatos (Imoto,1998). Entretanto, possui radicais metil,

acetil e cloreto, que podem interagir com a molécula de DNA, embora de forma menos intensa.

Fica claro, que a oncocalyxona A retém poder de citotoxicidade nas células multiresistentes de menor proporcionalidade do que a doxorubicina e a mitoxantrona. Deste modo, a oncocalyxona A poderá ser considerada como um pobre substrato para as glicoproteínas P e para as proteínas relacionadas à multiresistência, podendo ser enquadrada em um novo grupo de agentes quimioterápicos, os quais, poderão vir a ser utilizados em tumores resistentes, que expressem os genes *mrp* (Plumb, 1999). Baseado nesses fatos, as oncocalyxonas A e C vêm atraindo atenção por pertencerem a uma nova classe de benzoquinona, as antracenedionas, com elevada citotoxicidade nas células tumorais leucêmicas (Pessoa, C *et al* 2000).

As oncocalyxonas A e C são duas 1,4-antracenedionas, que em função da nomenclatura química foram denominadas *rel-8 α -hidroxi-5-hidroxi-metil-2-metoxi-8 β -metil-7,8,8a,9-tetra-hidro-1,4-antracenediona* e *rel-10 α ,11 β -epoxi-11 α -etoxi-8 α -hidroxi-2-metoxi-8 β -metil,-5,6,7,8,8a,9,10,10 β -octohidro-1,4-antracenediona*, respectivamente (Pessoa *et al.*, 1993; 1995).

As quinonas pertencem a uma classe de compostos orgânicos que podem ser considerados como produtos da oxidação de fenóis, do mesmo modo a redução de quinonas poderá originar os correspondentes fenóis. Sua característica decorre da presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C. Decorrente do tipo de ciclo no qual o sistema de ligações duplas e cetonas conjugadas esteja inserido, tem-se os grupos principais de quinonas, nos quais se enquadra a maioria dos compostos: benzo, nafto e antraquinonas (Falkenberg, 1999; Allinger *et al.*, 1978). Na natureza também encontramos quinonas terpênicas e policíclicas de estruturas mais complexas, a exemplo das oncocalyxonas A e C, cuja formação é decorrente da via

de ciclização intramolecular da cadeia terpênica com núcleo fenólico, ácido p-hidroxibenzóico, seguido por várias modificações secundárias formando um sistema linear do tipo antraceno, cuja formação estrutural é semelhantes aos cordiacromos previamente registrados, somente no gênero *Cordia* (Pessoa, 1994).

Várias quinonas de diferentes tipos estruturais têm mostrado atividades em diferentes sistemas de tumores. Como exemplo podemos citar o lapachol uma molécula simples, isolada da *Tabebuia avellanedae*, cuja alteração estrutural tem sido realizada com o intuito de verificar uma relação estrutura atividade com melhor potência (Saizarbitoria, 1997; Consola *et al* 1975). Novas quinonas estão sendo isoladas a partir de produtos naturais, e suas atividades citotóxicas *in vitro* vêm sendo continuamente avaliadas, pelo fato de interagirem com a molécula de DNA. Podemos dar como exemplos glicosídeos acetilados ou galactosídeos da lawsone (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), juglone (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) e o lapachol (2-hidroxi-3,3-metil-2-butenil-1,4-naftoquinona), os quais foram obtidos da *Juglans regia* L e *Tabebuia avellanedae*, tendo mostrado atividade sobre o tumor ascítico de Ehrlich (De Oliveira *et al.*, 1978; Sieber *et al.*, 1976; Qui *et al.*, 1998; Frydman *et al.*, 1997). A agataquinona, um diterpenoide quinônico obtido da *Agastache rugosa*, mostrou citotoxicidade nas células XF498 (SNC) (Lee *et al.*, 1995). Compostos cordiaquinonas A e B, isoladas da *Cordia corymbosa*, exibiram atividade citotóxica nas células KB (Silva *et al.*, 1993). Recentemente, duas novas quinonas (menadione e 2,3-dimetoxi-1,4-naftoquinona) foram testadas em 11 linhagens celulares, tendo a menadiona apresentado maior citotoxicidade nas células leucêmicas do que nos tumores sólidos, decorrente da atividade da quinona redutase, levando assim à produção subsequente de compostos reativos (Djuric *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1992).

Uma nova anoquinona com atividade citotóxica foi isolada da *Annona montana*, da família das Annonaceae, o fenantreno-1,4-quinona (Chen *et al.*, 1999). Acrescente-se a esta algumas naftoquinonas isoladas da *Psychotria rubra*

(Rubiaceae), da *Rhinac anthusnasutus* (Acanthaceae) e do *Diospyros morrisiana* (Ebenaceae), as quais tem exibido intensa citotoxicidade. Recentemente, novas quinonas de ocorrência natural têm sido obtidas, a exemplo da Mansonone-D (MD), Mansonone-H (MH), Thespone (TP) e Thespesone (TPE), extraídas da *Thespesia populnea*, estas têm apresentado citotoxicidade no adenocarcinoma de mama, nas células MCF-7. A citotoxicidade segue a ordem MD > TP > MH aproximada ao TPE decorrente da produção de radicais peróxidos que reduzem o ciclo (Inbaraj, *et al.*, 1999). Um outro composto é a primina, uma benzoquinona encontrada em dois gêneros de plantas: a *Miconia* e a *Eugenia* (Myrtaceae), que têm mostrado atividade antileucêmica *in vitro* comparável à daunorrubicina, cujo potencial terapêutico é limitado pela sua atividade alergizante (Efferth *et al.*, 1996).

No Brasil e em outros países, extratos de plantas a base de quinonas, (benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas) vem sendo amplamente empregado na indústria farmacêutica, devido suas propriedades farmacológicas ou como fonte de corantes naturais (Falkenber, 1999). Devido sua propriedade antitumoral vários mecanismos têm sido propostos, incluindo cisão e degradação da molécula de DNA nas células, formação de ciclo redox para formar congêneres semiquinonas, intermediários de oxigênio ativos e interações de semiquinonas na superfície da célula tumoral. Entretanto, nenhuma evidência tem apresentado explicação adequada no ataque preferencial dos radicais semiquinonas sobre os tumores em contraposição às células normais (De Oliveira *et al.*, 1978).

Vários agentes quimioterápicos interagem com o DNA por múltiplos mecanismos e causam diversas lesões citotóxicas. Estes diversos agentes incluem doxorrubicina, m-amsacarina, mitoxantrona, bleomicina, actinomicina-D e cis-platinum. Compostos DNA-reativos podem ligar-se à fita do DNA (mitramicina), intercalar-se (doxorrubicina e elipticina), ligação covalente (adriamicina e mitomicina-C) ou formar complexos. Entretanto, muitos compostos mostram complexas interações, como alquilação nas bases (pluramicina) e/ou quebra das

fitas (CC-1065) (Belgleiter & Leith, 1990). Além do efeito direto ao DNA, temos os que inibem atividade da topoisomerase II (Sorensen *et al.*, 1992), outros estabilizam ligações covalentes DNA-proteína (doxorubicina e m-amsacarina) ou bloqueiam atividade catalítica (merberone e fostriecin) (Hanauske, *et al.*, 1996).

Observações iniciais com a oncocalyxona (5 µg/ML) A possibilitaram verificar a possível ligação com DNA-topoisomerase nas células SW-1573 semelhante ao que ocorre com a doxorubicina (1µg/mL). As antraquinonas estabilizam ou inibem o complexo DNA-topoisomerase II, todavia, a ação da oncocalyxona A poderá ser independente da habilidade de induzir quebra ao DNA mediada pela topoisomerase II, comparável ao que acontece com as naftoquinonas (Hueber *et al.*,1998). A verificação fiel da interferência da oncocalyxona com a topoisomerase não foi conclusiva nas células CEM e SW-1573, o que impossibilitou um achado concreto, necessitando para tal fim a utilização de enzima pura ou anticorpos monoclonais anti-topoisomerase II. Pode-se supor que o grupamento quinona da oncoclayxona A, possivelmente apresenta um mecanismo de reatividade química com a molécula de DNA.

Recentes estudos têm sugerido mecanismos de interferência com as topoisomerases de forma diversa, a exemplo do 3,4-dihidro-2,2-dimetil, 2-piran-5,6-diona (beta lapachona) que inibe a ação da DNA topoisomerase (Hueber *et al.*,1998). A beta lapachona induz quebra no DNA mediada pela topoisomerase I, enquanto as naftoquinonas relacionadas como a menadiona, induzem uma ligação à proteína na presença da DNA-topoisomerase II alfa purificada. Estudos preliminares com a beta lapachona e naftoquinonas mostram que ambas são citotóxicas em um painel de linhagens de células tumorais resistentes, incluindo linhagens de células que têm expressão aumentada de *MDR-1* (Frydman *et al.*, 1997).

Na busca de novos compostos mais potentes e ativos em células tumorais que apresentam múltipla resistência a drogas, foram avaliados os derivados da oncocalyxona A (1), obtidos por reações de cloração e acetilação, o 6-clorooncocalyxona A (2), o 8-0-acetiloncocalyxona A (3) e o 8,11-di-0-acetiloncocalyxona A (4) respectivamente. Nesses derivados, manteve-se a estrutura primitiva por acreditar-se que a atividade biológica da oncocalyxona A poderia ser mais potente do que os derivados. Os resultados mostram que os derivados 2 e 3, mas não o 4, foram significativamente menos ativos que os compostos primários com valores de IC_{50} 2x acima. Não havendo nenhuma diferença na curva dose-resposta de todos os três derivados quando comparados com a oncocalyxona A. Todos os quatro compostos causaram morte celular, bem como inibição no crescimento celular em concentração acima de 5 $\mu\text{g/mL}$, nas células CEM e SW-1573, evidenciado pela alteração morfológica e morte celular.

Os três derivados, da oncocalyxona A, causaram significativo dano ao DNA ($p < 0,01$), nas células CEM, na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, equiparada a reatividade obtida com o etoposida. Os derivados testados para citotoxicidade nas células SW-1573, não mostraram nenhuma diferença entre eles quando comparados com a oncocalyxona A, o que nos sugere, que a alteração estrutural não levou a nenhuma diferença citotóxica nessas células, confirmando que o grupo antracenodiona parece modular a atividade desses compostos de forma equivalente a mitomicina C e 2,5-diaziridiny-3,5-bis (carboethoxyamino)-1,4 benzoquinona (Begleiter & Leith, 1990). Esse fato precisará ser melhor examinado com outros derivados e em várias diferentes linhagens tumorais, considerando que isso pode ter um impacto na seletividade do efeito citotóxico de um tipo de célula comparado a outro.

A atividade da oncocalyxona A provavelmente decorre do grupo hidroxil no carbono 8 ou 11 da oncocalyxona A que poderá estar envolvido na interação ao DNA através de uma ligação hidrogênica, desde que sua acetilação

poderá reduzir a atividade biológica. A cloração no C₆ leva à uma mudança de carga negativa, podendo afetar a ligação hidrogênica com o grupo hidroxil C₁₁, competindo assim com a interação eletrostática das moléculas de ribose do DNA, podendo também diminuir a reatividade ao DNA.

A citotoxicidade nas células leucêmicas com oncocalyxona A e C e clerodano A, suportam evidências da interação desses fitocompostos com o DNA (Pessoa, *et al.*, 2000a; 2000b). Nesse sentido considerável esforço foi focado para o melhor entendimento da interação fitoquímico-DNA, com a intenção de identificar novos compostos que liguem-se ao DNA.

Verificou-se que a oncocalyxona A, nas concentrações de 5 µg/mL, induziu a apoptose e inibição da síntese de DNA, resultando em aproximadamente 100% de morte celular. Por essas observações parece que a interação da oncocalyxona A com o DNA é indispensável na indução à apoptose. Assim, é possível que as células na fase S incorporem ativamente a oncocalyxona A, a qual poderá intercala-se na molécula do DNA ou interagir com a topoisomerase II, inibindo a proliferação celular e culminando com a indução da apoptose.

Enquanto o clerodano A, na concentração de 25 µg/mL, inibiu a síntese de DNA ao redor de 80%, a ternatina, inibiu moderadamente, parecendo não ter interagido com o DNA uma vez que não inibiu significativamente a sua síntese. Portanto, trata-se de uma ação citostática, ao contrário das oncocalyxonas e do clerodano A.

A apoptose é de grande importância como um fenômeno dentro da dinâmica da manutenção das células viáveis de regulação, sujeitos a impactos de estimulação e inibição, onde a interação droga-núcleo funciona como um sinal de lesão ao DNA, podendo engatilhar a apoptose. Entretanto, ainda são necessárias mais evidências para que seja comprovado que a apoptose é um dos mecanismos da

morte celular induzida por droga (Smets, 1994), embora já tenha sido demonstrado que a apoptose pode ser induzida por muitos agentes citotóxicos e radiação ionizante (Hiraku & Kawanishi, 1996).

No tocante à inibição do crescimento tumoral no Carcinoma de Erhlich, houve uma redução de 50% durante o tratamento contínuo com a fração clorofórmica de *A. oncocalyx* na dose de 70 mg/Kg ($p < 0,01$), de forma distinta ao obtido com 5-fluouracil na dose de 30 mg/Kg, que foi de apenas 37%. Esses resultados confirmam os achados iniciais obtidos por Pessoa, C (1992), no estudo com o extrato hidroalcoólico da *A. oncocalyx*, que evidenciou uma redução no crescimento tumoral de aproximadamente 46% na dose de 300 mg/Kg, o que nos faz conjecturar que a FCAO retém maior concentração do composto potencialmente antitumoral do que o extrato hidroalcoólico, uma vez que foi necessário uma dose quatro vezes menor para a obtenção de resultado semelhante.

Por outro lado, nos animais inoculados com Sarcoma 180, e tratados com a fração clorofórmica de *A. oncocalyx* na dose de 70 mg/Kg, a redução foi de apenas 16% do crescimento tumoral, resultado inferior ao obtido anteriormente com o extrato hidroalcoólico da *A. oncocalyx* na dose de 100mg/Kg que foi de 43% (Pessoa, C, 1992). Esse fato se deve, provavelmente, a uma maior resistência do tipo tumor ao composto. Todavia, na leucemia L1210, os animais tratados com dose de 100mg/Kg, mostraram uma significativa redução no crescimento tumoral correspondente a 42% ($p < 0,01$), enquanto para o 5-fluouracil foi de 52% ($p < 0,01$). Pode-se considerar que diferente sensibilidade à inibição do crescimento dos tumores reflete a heterogeneidade das células tumorais (Heppner & Miller, 1998) e ao pequeno número de animais avaliados por grupo. Esse fato sugere que novas avaliações deverão ser realizadas com outras neoplasias da mesma natureza leucêmica, bem como um estudo da degradação metabólica da fração *in vivo*. Os dados *in vivo* reforçam o potencial citotóxico da oncocalyxona A, sugerindo que o composto tem potencial atividade antineoplásica.

Nos estudos *in vivo* com tumores sólidos, a propriedade antitumoral foi avaliada tendo como parâmetro o tempo de sobrevida dos animais inoculados com Carcinoma de Erlich e Sarcoma 180, e tratados com fração clorofórmica da *A. oncocalyx*, nas doses de 50 e 70 mg/Kg. Os resultados mostraram que não houve aumento significativo no tempo de sobrevida em ambos os tumores quando comparados com o controle. Isso pode ter ocorrido, possivelmente, devido ao fato de que os animais foram tratados com doses alternadas, possibilitando uma maior expressão da malignidade tumoral (Schabel *et al.*, 1977), levando alguns animais à morte ainda no início do desenvolvimento do tumor. Entretanto, nos grupos tratados com o 5-fluouracil, nas doses de 40 e 20 mg/Kg, houve aumento significativo da sobrevida dos animais inoculados com o carcinoma de Erlich e sarcoma 180.

A tudo isso deverá ser acrescentado o fato de que o nível plasmático citotóxico adequado da oncocalyxona A pode não ter sido atingido com o uso da fração clorofórmica da *A. oncocalyx* em doses alternadas, uma vez que o seu rendimento foi apenas de 28% quando analisada em HPLC. É importante salientar que a baixa lipossolubilidade apresentada pela substância poderá levar a um menor índice de absorção, e conseqüentemente, à uma menor biodisponibilidade, os quais juntos poderão ser fatores limitantes para a ação da droga, semelhante ao que aconteceu com o lapachol, sendo necessárias altas doses para atingir concentrações terapêuticas no plasma o que implicou em efeitos tóxicos relevante (Falkenberg, 1999; Levin *et al.*, 1989).

A variabilidade na resposta antitumoral não descredita a potencialidade antitumoral da FCAO, já que achados publicados pelo NCI mostram a existência de compostos ativos nas células KB, *in vitro*, mas que não apresentaram atividade na leucemia P388 *in vivo*. Estes pertencem a várias classes de sesquiterpenos (metacrilato de erioflorina e vernolide), diterpenos (podolide), algumas cucurbitacinas, lignanas e flavanoídes. Além desses, alguns compostos

como o lapachol, foram mais ativos contra o carcinoma Walker 256 e não efetivos na leucemia P388 e células KB (Arcamone & Cassinelli, 1980; Kashiwada *et al* 1997).

Mesmo causando dano de menor extensão na molécula do DNA do que outros grupos de similar estrutura (Fry, 1991), a oncocalyxona A provavelmente também interfere com o crescimento e morte celular por interação com a molécula do DNA, o que resulta na quebra da cadeia nucleotídica, inibição da síntese de novas moléculas e/ou apoptose, possivelmente via topoisomerase II, a exemplo do que ocorre com os grupos antraquinonas (Epstein, 1990; Gewirtz *et al.*, 1998). Além disso, foi mostrado anteriormente que quinonas como a beta-lapachona, menadiona e ortoquinona apresentam elevada reatividade química com a molécula do DNA (Chen *et al*, 1992; Garn *et al.*, 1994).

Drogas semelhantes a doxorubicina e a mitoxantrona formam compostos reativos com o DNA devido à formação de espécies reativas de oxigênio, com propriedades carreadoras de elétrons nos processos metabólicos das células, tendo a capacidade de interagir com sistemas redox ou de transferência de elétrons em ambientes físico ou biológico, os quais poderão promover dano ao DNA, ou inibir diferentes passos da reação da topoisomerase II (Munday *et al.*, 1994). A oncocalyxona A representa uma nova classe de benzoquinonas, as antracenodionas, cuja atividade anti-leucêmica *in vivo* e *in vitro* poderá também ser decorrente da formação de espécies reativas de oxigênio, em especial nas células neoplásicas que apresentam resistência a múltipla drogas anticâncer (Lown, 1993), como acontece na presença do dimetoxibenzosemiquinona (Morgan, 1998) e com 2-ciclopropilindoquinonas (Naylor *et al.*, 1997).

Os promissores resultados da oncocalyxona A poderão credenciá-la, em breve, a somar-se a outros novos compostos, que correntemente já vêm sendo investigados na quimioterapia do câncer, como a gemcitabine (Huang & Plunkett,

1995), o elemene isolado da *Rhizoma zedoariae* (Yang & Wang, 1996), o homoharringtonine obtido *Cephalotaxus harringtonia* e o elliptinium isolado *Bleekeria vitensis* todas originadas de plantas chinesas (Christian *et al*, 1997; Cragg & Newman, 1999).

VI. CONCLUSÃO

A oncocalyxona A, representante de uma nova classe de benzoquinonas, as 1,4-antracenodionas, demonstrou efetiva citotoxicidade nas linhagens tumorais de pequenas células pulmonares e leucêmicas humanas CEM e HL60.

Os derivados da oncocalyxona A, com modificação estrutural no anel C, apresentaram menor potência do que o composto original, devido a uma redução na reatividade com o DNA.

Células multiresistentes a drogas antineoplásicas apresentaram uma maior sensibilidade à oncocalyxona A quando comparadas às antraquinonas, possivelmente por funcionarem como fraco substrato para as bombas de fluxo intramembrana, glicoproteína P e proteína MRP

A citotoxicidade nas células leucêmicas induzida pela oncocalyxona A deve-se, provavelmente, a sua reatividade com a molécula de DNA, comprovada pelo dano ao DNA e possível indução à apoptose.

A oncocalyxona A reduziu o crescimento dos tumores da Linhagem Leucêmica L1210 e do Carcinoma de Ehrlich, o que lhe confere um promissor potencial antitumoral.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, R. T., HUNTER III, W. J., AGRAWAL, D. K. Morphological and Biochemical characterization and Analysis of apoptosis. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v. 37, p. 215-228, 1997.
- ALLEY, M. C. *et al.* Validation of an automated microculture tetrazolium assay (MTA) to asses growth and drug sensitivity of human tumor cell lines. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, v. 27, p. 389, 1996.
- ALLEY, M. C. *et. al.* Feasibility of drug screening with Panels of Human Tumor Cells lines using microculture tetrazolium Assay. **Cancer Res.**, v. 48, n. 1, p. 589-601, 1998.
- ALLINGER, N. L., CAVA, M. P., DE JONGH, D. C. *et al.* **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978. cap. 15: Reações de compostos aromáticos, p. 309-347.
- AMES, B. N. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. **Mutat. Res.**, v. 214, n. 1, p. 41-46, 1989.
- ARCAMONE, F., CASSINELLI, G., CASAZZA, A. M. New antitumor drugs from plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 2, n. 2, p. 149-160, 1980.
- BELGLEITER, A. & LEITH, M. K. Activity of quinone alkylating agents in quinone resistant cells. **Cancer Res.**, v. 50, n. 10, p. 2872-2876, 1990.
- BERRIDGE, M. *et al.* The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays. That use tetrazolium salts. **Biochemical**, v. 4, p. 14-19, 1996.
- BOOBIS, A. R., FAWTHROP, D. J., DAVIES, D. S. Mechanisms of cell toxicity. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v.-2, n. 2, p. 231-237, 1990.
- BOYD, M. R. The future of new drug development. Current therapy in oncology. **Anticancer Drug**, p. 11-22, 1992.
- BRAGA, R. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. 3a. ed. Fortaleza: Progresso, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Controle do câncer: uma proposta de integração de ensino serviço**, Rio Janeiro: INCA, 1999. Cap. 1: O problema do câncer no Brasil, p. 3-53.

- BROWN, T. C. *et al.* Cellular responses to damage in DNA Human. **Carcinog.**, p. 217-229, 1983.
- BUDD, G. T., WEBSTER, K. D., LIVINGSTON K. B. Treatment of advanced cancer with cisplatin, adriamycin, and cyclophosphamide effect of treatment and incidence of intracranial metastases. **J. Surg. Oncol.**, v. 24, n. 3, p. 192-195, 1983.
- BUOLAMWINI, J. K. Novel anticancer drug discovery. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 3, n. 4, p. 500-509, 1999.
- CALIXTO, J. B. & SANT'ANNA, E. A. Evidence for the mechanism of the inhibitory action of Jatrophone in the isolate rat uterine muscle. **Gen. Pharmacol.**, v. 21, n. 1, p. 117-142, 1990.
- CAPRANICO, G. & ZUNINO, F. DNA topoisomerase-trapping antitumor drugs. **Eur. J. Cancer**, v. 28A, p. 2055-2060, 1992.
- CAPRANICO, G. *et al.* Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1132, n. 1, p. 43-48, 1992.
- CHABNER, B. A. *et al.* Agentes antineoplásicos. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., GILMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9a. ed. McGrawHill, 1996, cap. 51, p. 910-949.
- CHEN, A. *et al.* Menadione (vitamin K3) induces topoisomerases II-mediated DNA cleavage. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, v. 33, p. 2588, 1992.
- CHEN, C. Y. *et al.* Aromin, an Annonaceous acetogenin from *Annona cherimola*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 3, p. 429-433, 1999.
- CHING, L. M. *et al.* *In vitro* methods for screening agents with an indirect mechanism of antitumor activity: xanthenone analogues of flavone acetic acid. **Eur. J. Cancer**, v. 27, n. 12, p. 1684-1689, 1991.
- CHRISTIAN, M. C. *et al.* Promising new agents under development by the division of cancer treatment, diagnosis, and centers of the National Cancer Institute. **Semin. Oncol.**, v. 24, p. 219-240, 1997.

- CLARK, A. M. Natural products as a resource for new drugs. **Pharm. Res.**, v. 13, n. 8, p. 1133-1140, 1996.
- COELHO, F. R. G. Controle do câncer. In: BRENTANI, M. M. *et al.* **Bases da Oncologia**. São Paulo: LEMAR, Marino, 1998. cap. 1, p. 1-21.
- COLE, S. P. C. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 17, n. 3, p. 259-263, 1986.
- CONSOLA *et al.* A lapachol derivative active against mouse lymphocytic leukemia P-388. **J. Med. Chem.**, v. 18, n. 11, p. 1159-1161, 1975.
- CORDELL, G. A. *et al.* Novel strategies for the discovery of plant derived anticancer agents, in human medicinal agents. In: KINGHORN, A. D. & BALANDRIN, M. F. (Eds.). **Human Medicinal Agents from Plants**. Washington: American Chemical Society, 1992. cap. 13, p. 191-204. (ACS Symposium Series, 534).
- CRAGG, G. M. *et al.* Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 52-60, 1997.
- CRAGG, M. & NEWMAN, D. J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Invest.**, v. 17, n. 2, p. 153-163, 1999.
- CRAVEIRO, A. & SILVEIRA, E. Two cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 10, p. 2571-2574, 1982.
- DAIDONE, M. G. *et al.* Reliability of an *in vitro* short-term assay to predict the drug sensitivity of human Breast cancer. **Cancer**, v. 56, p. 450-456, 1985.
- DANCEY, Y. & EISENHAVER, E. A. Current perspective on camptothecine in cancer treatment. **Br. J. Cancer**, v. 47, p. 327-328, 1996.
- DE GEORGE, J. *et al.* Regulatory considerations for pre-clinical development of anticancer drugs. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 41, n. 3, p. 173-185, 1998.
- DE OLIVEIRA, M. M., LINARDI, M. C., SAMPAIO, M. R. Effects of quinone derivatives on an experimental tumor. **J. Pharm. Sci.**, v. 67, p. 562-563, 1978.
- DE SMET, P. A. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v. 54, n. 6, p. 801-840, 1997.

- DENIZOIT, F. & LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.
- DIVE, C. *et al.* Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multi parametric flow cytometry. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1133, p. 275-285, 1992.
- DJURIC, Z. *et al.* Detoxification ability and toxicity of quinones in mouse and human tumor cell lines used for anticancer drug screening. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 36, p. 20-26, 1995.
- DOLBEARE, F. *et al.* Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, p. 5573-5577, 1983.
- DOLFINI, E. *et al.* Method for tissue culture evaluation of the cytotoxic activity of drugs active through the formation of metabolites. **Eur. J. Cancer**, v. 9, p. 375-378, 1973.
- DRAKE, P. H. *et al.* Biochemical and pharmacological properties of p170 and 180 forms of topoisomerase II. **Biochemistry**, v. 28, p. 8154-8160, 1989.
- DRISCOLL, J. S. The pre-clinical new drug research program of the national cancer institute. **Cancer Treat. Rep.**, v. 68, p. 63-76, 1984.
- DRLICA, K. & COUGHLIN, S. Inhibitors of DNA gyrase. **Pharmacol. Ther.**, v. 44, p. 107-121, 1989.
- EFFERTH, T. *et al.* Detection of apoptosis in KG1 leukemia cells treated with investigational drug *Arzneim-Forsch.* **Drug Res.**, v. 46, n. 1, p. 196-200, 1996.
- ELLEDG, S. J. & DARIS, R. W. Identification of DNA damage responsive element of RNE2 and the evidence that four destined cellular factors bind it. **Mol. Cell Biol.**, v. 9, p. 5372-5386, 1989.
- ENDICOTT, J. A. & LING, V. The biochemistry of p-glycoprotein-mediated multidrug resistance. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 137-161, 1989.
- EPSTEIN, R. J. Drug induced DNA damage and tumor chemosensitivity. **J. Clin. Oncol.**, v. 8, p. 2062-2084, 1990.

- FACUNDO, V. A. **Contribuição do conhecimento químico de plantas do gênero *Zantho xybrem* do estado do Ceará.** Fortaleza, 1999, Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação de Química Orgânica.
- FALKENBERG, M. B. Quinonas. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.) **Farmacognósia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999, p. 545-570.
- FÁVARO, O. C. N. *et al.* 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.
- FINLAY, G. J. & BAGULEY, B. C. The use of human cancer cell as a primary screening system for antineoplastic compounds. **Eur. Cancer Clin. Oncol.**, v. 20, p. 947-954, 1984.
- FLECK, J. **Câncer: integração clínico biológica.** Rio de Janeiro: Médica e Científica, 1992.
- FOLEY, G. H. *et al.* Isolation and serial propagation of malignant and normal cells in semi-defined media. Origins of CCRF cell lines. **Cancer Res.**, v. 20, p. 930-939, 1960.
- FRY *et al.* Biochemical pharmacology of anthracenediones and anthrapyrazoles. **Pharmacol. Ther.**, v. 2, n. 1, p. 109-125, 1991.
- FRYDMAN, B. *et al.* Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by β -Lapachone and related Naphthoquinones. **Cancer Res.**, v. 57, p. 620-627, 1997.
- GARN, H., KRAUSE, H., ENZMANN, V., DROBLER, K. An improved MTT assay using the electron-coupling agent menadione. **J. Immunol. Methods**, v. 168, p. 253-256, 1994.
- GERAN, R. I. *et al.* Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. **Cancer Chemother. Rep.**, v. 3, p. 1-1037, 1972.

- GEWIRTZ, D. A. *et al.* Induction of DNA damage, inhibition of DNA synthesis and suppression of c-myc expression by the anthracycline analogue, idarubicine (4-demethoxy-daunorubicin) in the MCF-7 breast tumor cell line. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 41, p. 361-369, 1998.
- GIACCONE, G. DNA Topoisomerases and topoisomerase inhibitors. **Pathol. Biol.**, (Paris) v. 42, p. 346-352, 1994.
- GIACCONE, G. *et al.* Multidrug sensitivity phenotype of human lung cancer cells associated with topoisomerase II expression. **Cancer Res.**, v. 52, n. 1, p. 1666-1674, 1992.
- GLISSON, B. S. & ROSS, W. E. DNA topoisomerase II a primer on the enzyme and its unique role as multidrug target in cancer chemotherapy. **Pharmacol. Ther.**, v. 32, p. 89-106, 1987.
- GOULART, M. *et al.* Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos Jatrolonas A e B. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p. 95-100, 1993.
- GRATZNER. Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. **Science**, v. 218, p. 474-475, 1982.
- GUO, M. & HAY, B. A. Cell proliferation and apoptosis. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 11, p. 745-752, 1999.
- HAMBURGER, A. W. Use of *in vitro* tests in predictive cancer chemotherapy. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 66, n. 6, p. 981-988, 1981.
- HANAUSKE, A. R. The development of new chemotherapeutic agents. **Anticancer Drugs**, v. 7, suppl. 2, p. 29-32, 1996.
- HARTWELL, J. L. & ABBOT, B. J. Antineoplastic principles in plants; recent developments in the field. **Adv. Pharmacol. Chemother.**, v. 7, p. 117-209, 1969.
- HAY, R. *et al.* (Eds.). **ATCC. Cell lines and hybridomas**. 8th. ed. Maryland: American Type Culture Collection, 1994.
- HEPPNER, G. H. & MILLER, F. R. The cellular basis of tumor progression. **Int. Rev. Cytol.**, v. 177, p. 1-56, 1998.

- HIRAKU, Y. & KAWANISHI, S. Oxidative DNA damage, an apoptosis induced by benzene metabolites. **Cancer Res.**, v. 56, n. 22, p. 5172-5178, 1996.
- HOCKENBERY, D. Defining apoptosis. **Am. J. Pathol.**, v. 146, n. 1, p. 16-19, 1995.
- HOLMES, F. A. *et al.* Phase II treat of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 83, p. 1777-1803, 1991.
- HUANG, P. & PLUNKETT, W. Induction of apoptosis by gemcitabine. **Semin. Oncol.**, v. 22, p. 19-25, 1995.
- HUEBER, A. *et al.* The topoisomerase I inhibitors camptothecine and beta lapachone, induce apoptosis of human pigment epithelial cells. **Exp. Eye Res.**, v. 67, n. 5, p. 525-30, 1998.
- IMOTO, M. Molecular target therapy of cancer: a cell cycle. **Kagaku Ryo No Ryoiki**, v. 14, n. 13-19, 1998.
- INBARAJ, J. J., GANDHIDASAN, R., MURUGESAN, R. Cytotoxicity and superoxide anion generation by some naturally occurring quinones. **Free Radical Biol. Med.**, v. 26, p. 1072-1078, 1999.
- ISHIOKA, C. *et al.* Current strategies on discovery of anticancer drugs in the United States of America. **Saishin Igaku**, v. 53, p. 1940-1945, 1998.
- JOHNSON, R. K. Screening methods in antineoplastic drug discovery. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, n. 13, p. 1082-1083, 1990.
- JUENKA, J. M. & HOLDEN, J. A. The distribution of DNA topoisomerase II isoforms in differentiated adult mouse tissues. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1216, p. 191-196, 1993.
- KANTER, P. M. & SCHWARTZ, H. S. A fluorescence enhancement assay for cellular DNA damage. **Pharmacology**, v. 22, p. 145-151, 1982.
- KARDINAL, C. G. & YARBRO, J. W. A conceptual history of cancer. **Semin. Oncol.**, v. 6, p. 396-408, 1979.
- KASHIWADA, Y. *et al.* Antitumor agents 180. Chemical studies and cytotoxic evaluation of cumingianosides and cumindysoside A, antileukemic triterpene

- glucosides with a 14,18-cycloapotirucallane skeleton. **J. Natl. Prod.**, v. 60, p. 1105-1114, 1997.
- KAUFAMAM, S. **Apoptosis Pharmacological Implications and Therapeutic Opportunities**. San Diego, Academic Press, v. 41, p. 1-320, 1997
- KAUFMANN, S. & HANCOCK, R. Topoisomerase II as a target for anticancer chemotherapy. **Acta Biochim. Pol.**, v. 42, n. 4, p. 381-394, 1995.
- KAYE, S. B. Multidrug resistance: clinical relevance in solid tumours and strategies for circumvention. **Cur. Opin. Oncol.**, v. 10, n. 1, p. 15-19, 1998.
- KEISARI, Y. A. Colorimetric microtiter assay for the quantification of cytokine activity on adherent cells in tissue culture. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 155, 1992.
- KERR, J.F. *et al*, Apoptosis its significance in cancer and cancer therapy. **Science**., v.259, p.239- 252, 1972
- KUBOTA, M. Generation of DNA damage by anti-neoplastic agents. **Anticancer Drugs**, v. 2, p. 531-541, 1991.
- LEE, H. K. *et al*. Agataquinone, a new cytotoxic diterpenoid quinone from *Agastache rugosa*. **J. Natl. Prod.**, v. 58, n. 11, p. 1718-1721, 1995.
- LEVIN, G. S. *et al*. Mechanism of the antiagregation activity of 1,4-naphthoquinone derivatives. **Farmacol. Tolksikol.**, v. 52, n. 5, p. 37-41, 1989.
- LEYVA, A. *et al*. Oncocalyxones A and C, 1,4-anthracenediones from *Auxemma oncocalyx*: comparison with anticancer 1,9-anthracenediones. **Anticancer Res.**, v. 20, n. 2, p. 1029-1031, 2000.
- LIMA, M. A. *et al*. Biologically active flavonoids and terpenoids from *Egletes viscosa*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 1, p. 217-223, 1996.
- LIMA, M. A. S. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste da *Egletes viscosa***. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, 1993.
- LIN, J. H. & CASTORA, F. J. DNA topoisomerase II from mammalian mitochondria is inhibited by the antitumor drugs, m-AMSA and VM-26. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 176, p. 690-697, 1991.

- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, 1998.
- LOWN, J. W. Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments. **Pharmacol. Ther.**, v. 60, p. 185-214, 1993.
- LOWN, J. W. The chemistry of DNA damage by antitumor drugs. In: NEIDLE & WARING (Eds.). **Molecular Aspects of Anticancer Drug Action**. The Pitman, 1983, cap. 9, p. 283-314.
- MAGNO, G. & JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis; an overview of cell death. **Am. J. Pathol.**, v. 146, p. 3-15, 1995.
- MATEZOLI, J. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil, *Trigonía fasciculata* griseb e *Psidium* spp.** Fortaleza, 1996. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica.
- MATOS, F. J. **Farmácias vivas**. 3a. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1998. 219p.
- MAXWELL, A. Protein gates in DNA topoisomerase II. **Natl. Struct. Biol.**, v. 3, n. 2, p. 109-112, 1996.
- McATEER, J. A. & DAVIS, J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In: DAVIS, J. M. (Ed.) **Basic Cell Culture: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1994. cap. 4, p. 104-123.
- MENDES, F. N. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste: *Dipteryx lacunífera* Ducke**. Fortaleza, 1987. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) -- Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica.
- MILLER, L. C. & TEINTER, M. B. Estimation of the DL₅₀ and its error by means of logarithmic probit graph paper. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 57, p. 261-264, 1944.
- MORAES, M. O. Screening for anticancer activity of plants from the Northeast of Brazil. **Fitoterapia**, v. LXVIII, n. 3, 1997.
- MORGAN, C. D., LEFKOWITZ, S. S., EVERSE, J. Synergism of dimethoxybenzosemiquinone free radicals and CD4⁺ T-lymphocytes to

- suppress Ehrlich ascities tumor. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 217, n. 1, p. 89-96, 1998.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MUNDAY *et al.* Comparative toxicity of alkyl-1,4-naphthoquinones in rats: relationship to free radical production *in vitro*. **Free Radical Biol. Med.**, v. 16, p. 725-731, 1994.
- NAYLOR, M. A. *et al.* 2-Cyclopropylindoloquinones and their analogues as bioreductively activated antitumor agents: structure-activity *in vitro* and efficacy *in vivo*. **J. Med. Chem.**, v. 40, p. 2335-2346, 1997.
- OSHEROFF, N., COBERT, A., ROBINSON, M. J. Mechanism of action topoisomerase II-target antineoplastic drugs. **Adv. Pharmacol.**, v. 29B, p. 105-112, 1994.
- PALANI, V., SENTHILKUMARAN, R. K., GOVINDASAMY, S. Biochemical evaluation of antitumor effect of *Muthu marunthu* (an herbal formula in rats). **J. Ethnopharmacol.**, v. 65, n. 3, p. 257-265, 1999.
- PERERA, F. P. Environment and cancer: Who are susceptible? **Science**, v. 278, p. 1068-1071, 1997.
- PESSOA, C. *et al.* Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil. **Phytother. Res.**, v. 14, n. 3, p. 187-191, 2000a.
- PESSOA, C. *et al.* Avaliação da atividade antitumoral e citotoxicidade da Jatrofona, um diterpeno extraído da *Jatropha elliptica* Muell Arg. **Rev. Bras. Farm.**, v. 80, n. 3, p. 59-60, 1999.
- PESSOA, C. *et al.* Oncocalyxone A, a cytotoxic 1,4-anthracenedione from *Auxemma oncocalyx*, induces apoptosis *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo*. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, San Francisco-USA, n. 2700, 2000b.
- PESSOA, C. **Testes *in vivo* e *in vitro* para avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral de plantas do Nordeste Brasileiro.** Fortaleza, 1992.

Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará,
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia.

PESSOA, O. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas nativas do Nordeste: *Auxemma oncocalyx* Taub.** Fortaleza, 1994. Tese (Doutorado em Química orgânica) - Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica.

PESSOA, O. D. L. *et al.* Cordiachromes from *Auxemma oncocalyx*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1777-1786, 1995.

PESSOA, O. D. L. *et al.* Novel cordiachromes isolated from *Auxemma oncocalyx*. **Natl. Product. Lett.**, v. 2, p. 145-150, 1993.

PETTIT, G. R., PIERSON, F. H., HERALD, C. L. **Anticancer drugs from animals, plants, and microorganisms.** New York: J. Wiley, 1994.

PEZZUTO, J. M. Plant-derived anticancer agents. **Biochem. Pharmacol.**, v. 53, p. 121-133, 1997.

PLUMB, J. A. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: BROWN, T. C. & BOGER-BROWN, U. (Eds.). **Cytotoxic Drug Resistance Mechanisms.** Totowa, NJ: Human Press, 1999. Cap. 3, p. 25-30.

POTT, P. Cirurgical observations relative to cancer of the scrotum. In: **Classics in Oncology.** New York: American Cancer Society, 1987. p. 9-17.

POWIS, G. Signaling targets for anticancer drug development. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 12, p. 188-194, 1991.

QUI, T. B. *et al.* Anticancer quinones induce pRb-preventable G2/M cell cycle arrest and apoptosis. **Free Radical Biol. Med.**, v. 24, n. 5, p. 848-854, 1998.

RAJEWSKY, M. F. *et al.* Relevance of DNA repair to carcinogenesis and cancer therapy. Recent Results. **Cancer Res.**, v. 154, p. 127-146, 1998.

RAO, V. S. N. *et al.* Investigations on the gastroprolective and antidiarrheal properties of ternatin, a tetramethoxy flavone from *Egletes viscosa*. **Planta Méd.**, v. 63, n. 2, p. 146-149, 1997.

- RAO, V. S. N. *et al.* Protective effect of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* less, in experimental live injury. **Pharmacology**, v. 48, p. 392-397, 1994.
- ROS, F. A rapid and simple method for detection of apoptosis in human cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 20, n. 19, p. 5243, 1992.
- ROWE, P. M. Camptothecines: new enthusiasm for an old drug. **Lancet**, v. 347, n. 9005, p. 892, 1996.
- SAIZARBITORIA, C. *et al.* Bioactive furanophytoquinones from *Tabebuia barbata* (Bignoniaceae). **Acta Cient. Venez.**, v. 48, n. 2, p. 42-46, 1997.
- SANTOS, F. A., RAO, V. S. N., SILVEIRA, E. R. The leaf essential oil of *Psidium gualanensis* protection against Pentylentetrazouole-induced seizures. **Planta Med.**, v. 63, n. 2, p. 133-135, 1997.
- SCHABEL, F. M. *et al.* Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacol. Ther.**, v. 1, p. 411-435, 1977.
- SHENKENBERG, T. D. & VON HOFF, D. D. Mitoxanthrone; a new anticancer drug with significant clinical activity. **Ann. Intern. Med.**, v. 105, n. 1, p. 67-81, 1986.
- SHOEMAKER, R. *et al.* Antitumor drug screening with a human tumor colony forming assay (HTCFA). **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, v. 25, p. 1292, 1984.
- SIEBER *et al.* Pharmacology of antitumor agents from higher plants. **Cancer Treat. Rep.**, v. 60, n. 8, p. 1127-1139, 1976.
- SILVA, A. *et al.* Biological activity of cordiaquinones A and B isolated from *Cordia corymbosa*. **Fitoterapia**, v. LXIV, n. 1, p. 78-80, 1993.
- SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.
- SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.
- SLICHENMYER, W. J. & VON HOLFF, D. New natural products in cancer chemotherapy. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 30, n. 9, p. 770-778, 1990.

- SMETS, L. A. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. **Ann. Cancer Drugs**, v. 5, p. 3-9, 1994.
- SOFINA, Z. P. Experimental selection of antitumor compounds: Products of synthetic and vegetable origin. **Natl. Cancer Inst. Monogr.**, v. 45, p. 245-253, 1977.
- SORENSEN, B. S. *et al.* Mode of action of topoisomerase II-targeting agents at a specific DNA sequences uncoupling the DNA binding, cleavage and religation events. **J. Mol. Biol.**, v. 228, p. 778-786, 1992.
- STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science**, v. 267, p. 1445-1462, 1995.
- STEWART, H. L. *et al.* Transplantable and transmissible tumors of animals. In: **Atlas of Tumor Pathology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology. 1959. Sec. XII, fascicle 40.
- SUFFNESS, M. & DOUROS, J. Current status of the NCI plant and animal product program. **J. Natl. Prod.**, v. 54, p. 1-14, 1982.
- SUGIURA, K. Tumor transplantation. In: GAY, W. (Ed.). **Methods of Animals Experimentation**. London: Academic Press, 1965. v. 2, p. 171-182.
- TAYLOR, M. T. *et al.* New antileukemic Jatrophone derivatives from *Jatropha gossypifolia*: structural and stereochemical assignment through nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 105, p. 3177-3183, 1983.
- TEWEY, K. M. *et al.* Adriamycin induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. **Science**, v. 226, p. 466-468, 1984.
- THATTE, U. & DAHANUKAR, S. Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation. **Drugs**, v. 54, p. 511-532, 1997.
- TWENTYMAN, P. R., FOX, N. E., REES, J.K. Chemosensitivity testing of fresh leukemia cells using the MTT colorimetric assay. **Br. J. Haematol.**, v. 71, p. 19-24, 1989.
- VALERIOTE, F. & VIETTI, T. Kinetics of the lethal affection of actinomycin D normal and leukemia. **Cells**, v. 33, p. 658-2661, 1973.

- VENDITI, J. M. The national cancer institute antitumor drug discovery program, current and future perspectives: a commentary. **Cancer Treat. Rep.**, v. 67, p. 767, 1983.
- WALKER, P. R. *et al.* Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. **Cancer Res.**, v. 51, p. 1078-1085, 1991.
- WALL, M. & WANI, M. C. Antineoplastic agents from plants. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 17, p. 117-132, 1977.
- WANG, J. C. DNA topoisomerases as targets of therapeutics: An overview. **Adv. Pharmacol.**, v. 29, p. 1-19, 1994.
- WANI, M. C. *et al.* Plant antitumor agents: The isolation of a structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 93, p. 2325-2327, 1971.