



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

**DAISY JEREISSATI BARBOSA LIMA**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DA MARINOBUFAGENINA, UM  
BUFADIENOLÍDEO EXTRAÍDO DE ANFÍBIOS DA ESPÉCIE *Rhinella marina***

**FORTALEZA**

**2016**

DAISY JEREISSATI BARBOSA LIMA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DA MARINOBUFAGENINA, UM  
BUFADIENOLÍDEO EXTRAÍDO DE ANFÍBIOS DA ESPÉCIE *Rhinella marina***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia. Área de concentração: Oncologia Experimental.

Orientador: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- L697e Lima, Daisy Jereissati Barbosa.  
Estudo da atividade anticâncer da marinobufagenina: um bufadienolídeo extraído de anfíbios da espécie *rhinella marina* / Daisy Jereissati Barbosa Lima. – 2016.  
90 f.: il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2016.  
Área de concentração: Biológicas II.  
Orientação: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.
1. Anticarcinógenos. 2. Ciclo Celular. 3. Morte Celular. 4. Adenocarcinoma. I. Título.

DAISY JEREISSATI BARBOSA LIMA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DA MARINOBUFAGENINA, UM  
BUFADIENOLÍDEO EXTRAÍDO DE ANFÍBIOS DA ESPÉCIE *Rhinella marina***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia. Área de concentração: Oncologia Experimental.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira  
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

---

Prof. Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, minha família, amigos e à ciência.  
Minhas maiores fontes de alegria e inspiração.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me presentear com a sua presença na forma das pessoas que conheci ao longo das minhas travessias.

Aos meus pais, **Nelidia e Edmundo**, e família, por serem meus exemplos e sempre me apoiarem, estimularem e compreenderem minhas necessidades. Pela paciência e por acreditar sempre nos meus propósitos e me permitirem realizá-los.

À minha orientadora desde a iniciação científica, **Prof<sup>a</sup> Dra. Claudia do Ó Pessoa**, por todo o suporte estrutural, científico, e por nos inspirar sempre como pessoa e pesquisadora.

Ao **Prof<sup>o</sup> Dr. Manoel Odorico de Moraes**, por iniciar e continuar mantendo e aperfeiçoando o Laboratório de Oncologia Experimental. E, em extensão a ele, a **Adelânia Marinho**, por ser sempre tão solícita.

Ao **Prof<sup>o</sup> Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira**, pela imensurável contribuição com minha formação como estudante e cientista.

À minha banca de qualificação, **Prof<sup>as</sup> Dras. Alice Martins, Mariana Lima Vale** pelas valiosas ressalvas em relação ao meu trabalho e em especial ao **Dr. Danilo Rocha** pela contribuição e atuação no mesmo.

Ao **Prof<sup>o</sup> Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior**, por ser uma inspiração como pesquisador e docente, desde a graduação, e por aceitar o convite de participar desta banca.

A todas as pessoas do Laboratório de Oncologia Experimental que de alguma forma contribuíram com este trabalho e com a minha formação e que fazem do lab uma extensão da minha casa: **Bruno Coelho, Bruno Soares, Carlos, Cássia, Cláudia, Cris, Daniel, Fran, Gabriel, Guto, Igor, Kaio, Maju, Neto, Treissy e Washington**, e em especial, **Stefânio, Andréa e Renan**, pela imensa colaboração em todos os momentos. **Delano, Jérсия e Diego**, por sempre terem estado dispostos a ensinar, discutir e colaborar. Eu sei que agradecimento não vai pro lattes, mas minha gratidão é imensa!

À **Sarah Sant'Anna**, minha amiga e companheira de aflições e alívios da pós (rsrs).

Agradeço especialmente à **Silvana, Karina e dona Rogéria**, por todo o suporte técnico, e sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

Aos meus amigos da vida, **Anália, Anamaria, Bruna, Camila, Fernanda** (*in memoriam*), **Juliana, Juliano, Livia, Luana, Mariana e Tamiris** por todo o suporte psicológico e pela compreensão sobre as minhas inúmeras ausências.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela ajuda indispensável em questões relacionadas à coordenação do programa de pós-graduação.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com a minha formação e com a execução deste trabalho... muito obrigada!

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

**Universidade Federal do Ceará**

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq**

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES**

**Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP**

**Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa - FUNCAP**

“A sabedoria da natureza é tal que não produz nada de supérfluo ou inútil.”

*Nicolau Copérnico*

## RESUMO

### ESTUDO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DA MARINOBUFAGENINA, UM BUFADIENOLÍDEO EXTRAÍDO DE ANFÍBIOS DA ESPÉCIE *Rhinella marina*

O câncer é uma complexa doença de origem genética, considerada uma das principais causas de morte por doença no mundo. A utilização de substâncias derivadas de produtos naturais tem crescido com o passar dos anos, constituindo uma importante fonte no arsenal terapêutico. Os bufadienolídeos são esteróides cardioativos de 24 carbonos, isolados de extratos de glândulas de sapos da família Bufonidae. Essas moléculas possuem grande variedade de atividades biológicas, incluindo atividade anticâncer. Os bufadienolídeos tem demonstrado comportamento antiproliferativo em várias linhagens de células cancerígenas humanas por induzir morte e parada do ciclo celular. A marinobufagenina, um bufadienolídeo extraído do anfíbio *Rhinella marina*, foi escolhida para determinamos o seu padrão citotóxico e mecanismo de ação. Apesar de demonstrar alta citotoxicidade em células tumorais humanas, a amostra não apresentou citotoxicidade para linhagens murinas. Experimentos *in vitro* foram realizados utilizando-se a linhagem de adenocarcinoma de próstata PC3. As células foram tratadas com diferentes concentrações da amostra marinobufagenina (0,37, 0,75 e 1,5  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas. A viabilidade das células PC3 foi avaliada por citometria de fluxo, mostrou que o número de células reduziu a partir da menor concentração (0,37  $\mu\text{M}$ ) testada sem, contudo, haver redução na porcentagem de células com membrana íntegra. A análise da externalização da fosfatidilserina por citometria de fluxo revelou aumento de células com padrão apoptótico nas concentrações 0,75 e 1,5  $\mu\text{M}$ . Já a análise do conteúdo nuclear, nos mostrou acúmulo de células na fase G2/M em todas as concentrações testadas. A marinobufagenina não foi capaz de causar danos ao DNA de PC3 e de CMSP. Observou-se, ainda, uma série de alterações morfológicas e no citoesqueleto de células tratadas com o bufadienolídeo, a exemplo da acentuada retração citoplasmática e formação de halos perinucleares. Além disso, modificações do padrão adesivo das células também foram observadas em células tratadas com o bufadienolídeo. Apesar de necessitar de mais estudos para delinear seu mecanismo de ação anticâncer; as modificações morfológicas, o comportamento ciclo-específico e a ausência de genotoxicidade tornam a Marinobufagenina uma molécula interessante na prospecção de novos fármacos com potencial antitumoral.

**Palavras-chave:** Bufadienolídeos; Marinobufagenina; Citotoxicidade.

**ABSTRACT**  
**STUDY OF ANTICANCER ACTIVITY OF MARINOBUFAGENIN, A**  
**BUFADIENOLIDE EXTRACTED FROM AMPHIBIANS OF *Rhinella marina***  
**SPECIES**

Cancer is a complex genetic disease, considered one of the leading causes of death in the world. The use of substances derived from natural products has grown over the years and is an important source for the therapeutic arsenal. Bufadienolides, a group of cardioactive steroids with a 24 carbon structures are commonly found in glands of toads from Bufonidae family. These molecules have a wide range of biological activities, including anti-cancer effects. Bufadienolides have shown anti-proliferative effect on various human cancer cell lines by inducing death and cell cycle arrest. Marinobufagenin, a bufadienolide extracted from *Rhinella marina* toad species was chosen to determine its standard cytotoxic and mechanism of action. Despite showing high cytotoxicity in human tumor cells, the sample showed no cytotoxicity to murine strains. In vitro experiments were performed using the PC3 prostate adenocarcinoma lineage. Cells were incubated with different concentrations of marinobufagenin (0.37, 0.75 and 1.5 mM) for 24 hours. The viability of PC3 cells was evaluated by flow cytometry, which showed that the number of cells reduced when incubated with the lowest concentration (0.37 mM) tested. However, no reduction in the percentage of cells with intact membranes was seen. The analysis of phosphatidylserine externalization by flow cytometry also revealed the increase of apoptotic cells at concentrations 0.75 and 1.5  $\mu$ M. The flow cytometry analysis of the nuclear contents, showed the accumulation of cells in G2 / M phase in all tested concentrations. Marinobufagenin did not damage the DNA in either PC3 or PBMC. In addition, morphological changes were observed, including cytoplasmic shrinkage and perinuclear halo formation. Moreover, modifications on the pattern of cells adhesion were also observed in cells treated with the bufadienolide. Despite lack of further studies to confirm its anticancer mechanisms, morphological changes occurred, the cycle-specific behavior and the lack of genotoxicity of Marinobufagenin make it an interesting molecule in the search for new drugs with antitumor potential.

**Key-words:** Bufadienolides; Marinobufagenin; Cytotoxicity

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Lista de reagentes e soluções .....	29
<b>Tabela 2.</b> Lista de equipamentos .....	30
<b>Tabela 3.</b> Linhagens utilizadas no ensaio de citotoxicidade MTT .....	33
<b>Tabela 4.</b> Avaliação da atividade citotóxica da Marinobufagenina, um bufadienolídeo extraído da espécie <i>Rinella marina</i> , frente a linhagens de células tumorais e normais (L929) avaliados pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação .....	45
<b>Tabela 5.</b> Avaliação da atividade citotóxica da Marinobufagenina, um bufadienolídeo extraído da espécie <i>Rinella marina</i> , frente à linhagem PC3, avaliados pelo ensaio do MTT após 24 e 72 horas de incubação com o composto .....	47

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Características das células tumorais (Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011) .....	17
<b>Figura 2.</b> Principais sítios de incidência de câncer previstos para 2016/ 2017 (INCA, 2015) .....	18
<b>Figura 3.</b> Carcinogênese: Formação e heterogeneidade de tumores malignos. (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013) .....	19
<b>Figura 5.</b> As fases do ciclo celular, ciclinas, inibidores de ciclinas e pontos de controle (RANG et al., 2007) .....	21
<b>Figura 6.</b> Estruturas moleculares de cardenólídeos (digoxina e ouabaína) e bufadienólídeos (bufalina e marinobufagenina) .....	25
<b>Figuras 7.</b> <i>Digitalis purpúrea</i> (A), <i>Strophanthus gratus</i> (B), <i>Bufo marinus</i> (C) .....	26
<b>Figura 8.</b> Estrutura molecular da marinobufagenina .....	33
<b>Figura 9.</b> Tipos de cometa e classificação por categoria de dano .....	45
<b>Figura 10.</b> Perfil antiproliferativo da Marinobufagenina frente à linhagem PC3 após 24 horas de tratamento determinado pelo método MTT .....	48
<b>Figura 11.</b> Efeito da Marinobufagenina na viabilidade de PC3 determinado pelo ensaio por exclusão de azul de Trypan após 24 horas de tratamento .....	49
<b>Figura 12.</b> Efeito da Marinobufagenina sobre a proliferação celular das células PC3, avaliado por densidade celular, determinada por citometria de fluxo .....	50
<b>Figura 13.</b> Efeito da Marinobufagenina sobre a proliferação das células PC3, avaliado pela integridade de membrana, determinada por citometria de fluxo .....	51
<b>Figura 14.</b> Efeito da Marinobufagenina sobre as fases do ciclo celular .....	53
<b>Figura 15.</b> Efeito da Marinobufagenina sobre externaização da fosfatidilserina .....	55
<b>Figura 16.</b> Efeito da Marinobufagenina sobre externaização da fosfatidilserina, representado graficamente .....	56
<b>Figura 17.</b> Efeito da Marinobufagenina sobre a proliferação, viabilidade e alterações morfológicas em PC3, por XCELLigence .....	58
<b>Figura 18.</b> Efeito da marinobufagenina sobre a morfologia celular de PC3 .....	60
<b>Figura 19.</b> Efeito da marinobufagenina sobre o citoesqueleto celular de PC3 .....	62
<b>Figura 20.</b> Efeito da amostra marinobufagenina sobre a indução de dano ao DNA em CMSP e PC3, após 24 horas de incubação .....	63

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

(Na/K)-ATPase	Bomba de sódio e potássio atpase
®	Marca registrada
ANOVA	Analysys of Variance (Análise de Variância)
B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CDk	Quinases Dependentes de Ciclinas
CI50	Concentração Inibitória Média
CMSP	Células Mononucleadas do Sangue Periférico
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
HCT 8	Linhagem celular de carcinoma colorretal
HCT116	Linhagem celular de carcinoma colorretal
HeLa	Linhagem celular de câncer cervical
HL 60	Linhagem celular de Leucemia Prómielocítica Humana
IC50	Concentração Inibitória Média
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IV	Infravermelho
L929	Linhagem celular de fibroblastos murinos
MCF7	Linhagem celular de Câncer de Mama
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
PBS	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
PC3	Linhagem celular de câncer de próstata
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Rosswell Parrk Memorial Institute Medium
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 Câncer .....	16
1.1.1 Ciclo celular .....	21
1.2 Bioprospecção de produtos naturais .....	24
1.2.1 Esteróides cardiotônicos derivados de produtos naturais: cardenolídeos e bufadienolídeos .....	27
1.3 Glicosídeos cardíacos no tratamento do câncer .....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
2.1 Objetivo Geral .....	31
2.2 Objetivos específicos .....	31
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 Material utilizado .....	32
3.1.1 Material biológico .....	32
3.1.2 Reagentes e soluções .....	32
3.1.3 Equipamentos .....	33
3.2 Desenho Experimental .....	34
3.3 Métodos experimentais .....	35
3.3.1 Coleta, isolamento e identificação do composto .....	35
3.3.2 Citotoxicidade Basal .....	35
3.3.2.1 Cultivo Celular .....	35
3.3.2.2 Teste do MTT .....	37
3.3.2.3 Avaliação da atividade antiproliferativa pelo método de exclusão por azul de Trypan .....	38
3.3.2.4 Determinação da integridade da membrana, densidade e morfologia celular por citometria de fluxo .....	39
3.3.2.5 Análise da proliferação e viabilidade celular- xCELLigence .....	39
Análise morfológica .....	41
3.3.2.6 Coloração diferencial com corante panótico rápido .....	41
3.3.3 Mecanismo de ação .....	42
3.3.3.1 Microscopia confocal .....	42
3.3.3.2 Análise de conteúdo e fragmentação de DNA (Ciclo Celular) por citometria	

de fluxo .....	43
3.3.3.3 Determinação da Externalização da Fosfatidilserina – Anexina V por citometria de fluxo.....	43
3.3.3.4 Estudo da ação da marinobufagenina sobre o dano ao DNA em células PC3 através do ensaio do cometa alcalino.....	44
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
4.1 Avaliação da atividade citotóxica da Marinobufagenina- MTT .....	48
4.2 Avaliação do efeito da Marinobufagenina sobre a viabilidade celular frente à linhagem PC3- Exclusão do corante azul de Trypan e Citometria de fluxo.....	50
4.3 Avaliação da integridade da membrana e do ciclo celular de células PC3 tratadas com Marinobufagenina por citometria de fluxo .....	52
4.4 Avaliação da ação da Marinobufagenina sobre a proliferação, viabilidade e alterações morfológicas em células PC3 por xCELLigence.....	54
4.5 Avaliação do efeito da Marinobufagenina em células PC3 sobre a morfologia e citoesqueleto celular por corante panótico e microscopia confocal .....	60
4.6 Análise do efeito da marinobufagenina sobre o ciclo celular de células PC3 ..	54
4.7 Avaliação do padrão de morte celular por externalização da fosfatidilserina: Anexina + 7AAD .....	56
4.8 Avaliação do potencial genotóxico da marinobufagenina sobre o DNA de células PC3 através do ensaio alcalino do cometa.....	64
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

Câncer, tumores malignos e neoplasias são termos utilizados para designar um grupo de doenças que pode afetar várias partes do corpo. Estas doenças são caracterizadas por um crescimento anormal de células além dos seus limites, o que pode ocasionar a invasão de partes adjacentes do corpo ou mesmo a migração de células tumorais para outros órgãos, processo denominado metástase, que é a principal causa de morte por câncer (WHO, 2015).

O surgimento do câncer pode ser desencadeado por diversas desordens, tanto de ordem exógena quanto endógena. Fatores ambientais, biológicos e predisposições genéticas associadas a desequilíbrios hormonais são situações que podem comprometer o comportamento celular, gerando situações onde haja favorecimento para surgimento de neoplasias malignas (COTRAN et al., 2005; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2000; SILVA, 2006).

O câncer pode ser iniciado em praticamente qualquer parte do organismo humano, que é constituído de trilhões de células. De acordo com as necessidades do corpo, as células normais crescem e se dividem para dar origem a novas células. Seguindo este ciclo, as células que sofrem danos ou envelhecem, naturalmente morrem para dar lugar a outras. Entretanto, quando o câncer ocorre, há uma falha deste processo. Novas células passam a ser formadas sem que haja necessidade, e aquelas que deveriam morrer permanecem vivas. Esse excesso de células em divisão descontrolada dá origem aos tumores malignos (NCI, 2015).

Neoplasias malignas são a principal causa de morte no mundo, e entre seus principais sítios de incidência, podemos citar pulmões, fígado, estômago, cólon, mama e esôfago como os cânceres responsáveis pelo maior número de mortes. Dentre as principais causas do câncer figuram os carcinógenos físicos como a radiação ionizante, carcinógenos químicos como os componentes do tabaco, arsênico e aflatoxinas, e carcinógenos biológicos como vírus, bactérias e outros parasitas. O avanço da idade é também considerado um fator de risco para o câncer, uma vez que a doença está relacionada aos mecanismos de reparo do DNA

e com o aumento da idade há uma tendência à diminuição da efetividade destes mecanismos (WHO, 2015).

Embora ainda não se tenha alcançado uma compreensão completa a respeito das mutações que controlam o câncer, sabe-se que vias regulatórias críticas para a proliferação, crescimento e sobrevivência da célula podem ser perturbadas por estas alterações. Em células tumorais, observa-se um desequilíbrio entre proliferação desenfreada, instabilidade genômica, alterações do ciclo celular e evasão da morte celular por apoptose (HAHN, 2004). Essas transformações mutam as células normais em cancerosas através da desregulação de um amplo espectro de vias reguladoras e efetoras, e é esta complexidade que tem dificultado o desenvolvimento de terapias específicas e efetivas contra o câncer (PULVERER et al., 2001).

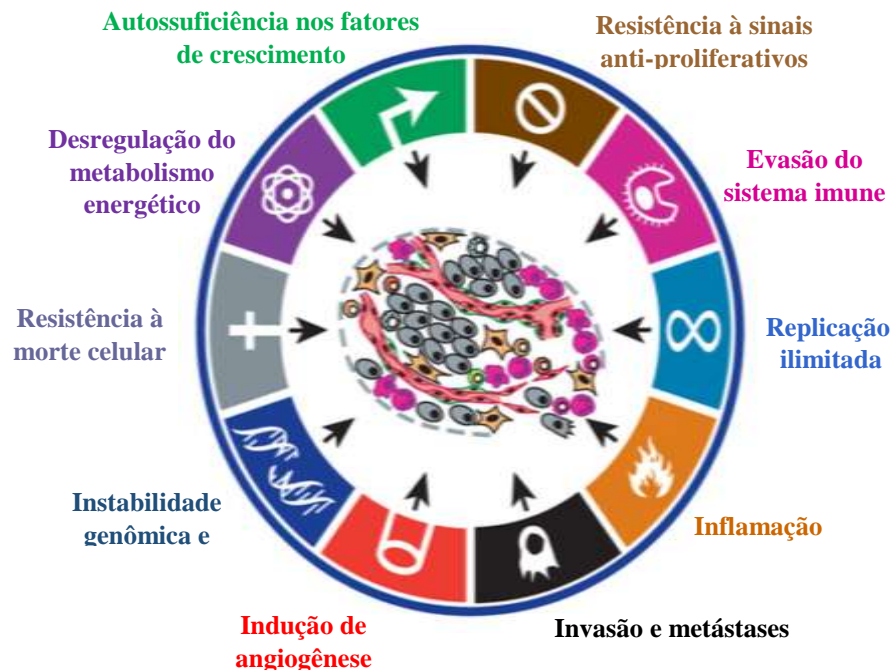
A gênese tumoral pode levar vários anos até que se identifique a presença de um tumor. Considera-se que existem três estágios para a carcinogênese: a iniciação, onde a célula sofre mutações por carcinógenos; a promoção, onde a continuidade da exposição aos carcinógenos impede o reparo celular e inicia a produção de células malignas e a progressão, que consiste na multiplicação desenfreada das células e aparecimento de sintomas clínicos (DE ALMEIDA, et al., 2005; SOARES, 2013)

Apesar dos mecanismos complexos de iniciação do câncer, muito tem-se pesquisado sobre como ele se origina e sobre o seu comportamento. Hanahan e Weinberg (2011) enumeraram as capacidades biológicas adquiridas por células tumorais durante seu desenvolvimento.

Fuga dos supressores do crescimento, resistência à morte celular/imortalidade replicativa, indução de angiogênese, ativação de processo invasivo e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011; LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009), reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição pelo sistema imune (KROEMER & POUYSSEGUR, 2008) são características adquiridas por células tumorais para manutenção da sinalização proliferativa (**Figura 1**). Muitas destas características são provavelmente suportadas pela instabilidade genômica (que acelera a aquisição das características dos marcadores supracitados) e inflamação (que alimenta muitas das funções dos marcadores). Além das células tumorais, os tumores apresentam uma outra dimensão de complexidade: eles contêm um repertório de recrutamento de células aparentemente normais que

contribuem para a aquisição de traços característicos, criando o que chamamos de "microambiente do tumor", que torna propício o seu crescimento e desenvolvimento (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

**Figura 1.** Características das células tumorais.



Adaptado de HANAHAN & WEINBERG (2011).

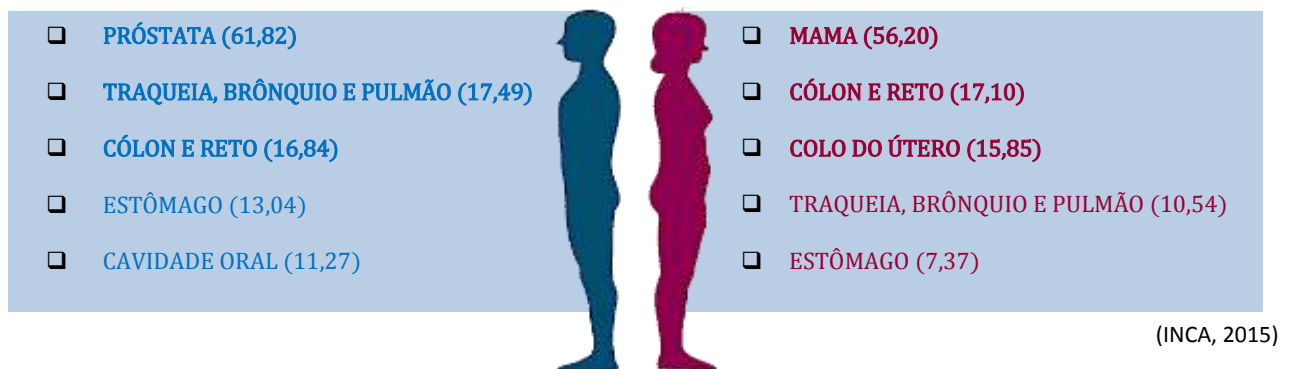
Além das características propostas anteriormente, Luo, Solimini & Elledge (2009) vêm demonstrar um outro conjunto de marcadores indicadores de células cancerosas: estresse metabólico, o estresse proteotóxico, estresse mitótico, estresse oxidativo e estresse por dano ao DNA. Segundo os autores, essas habilidades ajudariam a promover o status de tumorigênese e a suprimir o estresse oncogênico.

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Em 2012 houve 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas à esta doença. Estima-se que o número de novos casos de câncer aumentará para 22 milhões dentro das próximas duas décadas (WHO, 2014).

Com 190 mil óbitos por ano, o câncer é a segunda maior causa de morte no Brasil. Para o ano de 2016/2017 é estimada a incidência de cerca de 596 mil novos casos de neoplasias malignas. Em ordem de acontecimento, os principais tipos de neoplasias afetarão pele (não melanoma), próstata e mama (**Figura 2**). Outros cânceres de importante ocorrência serão o de intestino grosso, pulmão, colo do útero, estômago e cavidade oral (INCA, 2015).

Ainda segundo o INCA, os hábitos de vida da população são fatores determinantes para o perfil epidemiológico, logo, além da idade, outros fatores de risco relacionados com o aumento das ocorrências são o tabagismo, a obesidade, o sedentarismo, o consumo de carnes processadas (linguiça, salsicha, embutidos em geral) e o etilismo.

**Figura 2.** Principais sítios de incidência de câncer previstos para 2016/ 2017



\*Valores apresentados por 100 mil casos.

Fonte: MS/ INCA/ Estimativa de câncer no Brasil, 2016

MS/ INCA/ Coordenação de Prevenção e Vigilância/ Divisão de Vigilância

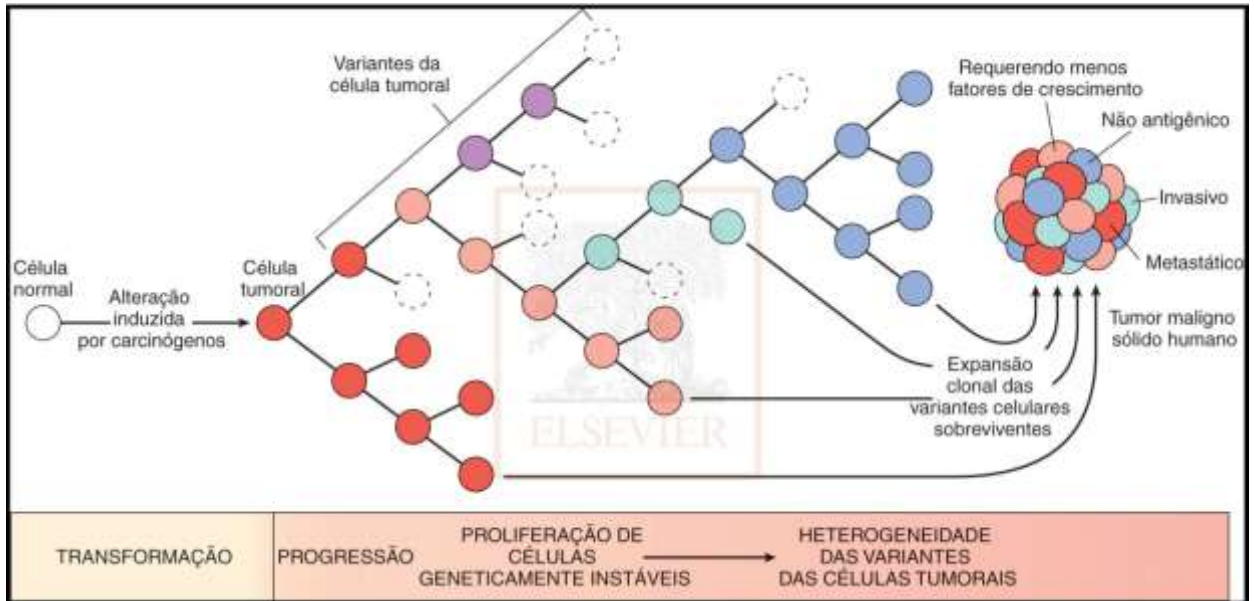
Nesta nova estimativa, 300.870 novos casos são esperados para o sexo feminino, dos quais 57.960 ou 28% afetam as mamas, enquanto que 295.000 novos casos têm ocorrência estimada para o sexo masculino, dos quais 61.000 ou cerca de 28% afetam a próstata, que inclusive, é invariavelmente o tipo de câncer de maior incidência em indivíduos do sexo masculino em todas as regiões do país (INCA,

2015), mesmo contando com os diversificados hábitos de vida dos habitantes das diferentes regiões.

As duas principais opções de tratamento do câncer são a quimioterapia e radiação. Esses agentes estimulam o aumento da sensibilização de células tumorais por dano ao DNA. Apesar de todos os estudos, ainda não se tem uma compreensão molecular de como esses agentes são “seletivos” (ou pelo menos relativamente, devido a sua alta toxicidade) para células tumorais ou o motivo pelo qual eles falham eventualmente (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009). Outras terapias anticâncer disponíveis são a ressecção cirúrgica, terapia biológica e hormônioterapia.

De acordo com KUMAR; ABBAS; ASTER (2013), as alterações complexas do câncer e heterogeneidade das células do tumor (**Figura 3**) tornam o tratamento uma questão difícil. As células tumorais fundamentam o fenótipo maligno através das inúmeras vias de crescimento e sobrevivência as quais acessam. Acredita-se que uma terapêutica promissora deve ser baseada na identificação de fatores críticos cuja inibição irá resultar na falha do sistema da rede oncogênica e a cessação do estado de tumorigênese por apoptose, necrose, senescência ou diferenciação. Associado a isso, os agentes terapêuticos que atacam estes tumores devem exibir seletividade por células tumorais quando comparadas a células normais (KAELIN, 2005). Caso contrário, os efeitos colaterais recaem sobre os pacientes, dificultando a adesão e consequentemente o sucesso do tratamento oferecido.

**Figura 3.** Carcinogênese: Formação e heterogeneidade de tumores malignos.



Kumar; Abbas; Aster (2013)

Contudo, apesar da ampla utilização clínica dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, que muitas vezes são responsáveis pelo controle do crescimento tumoral e até prolongar a vida dos pacientes em vários anos, oncologistas atestam que a melhor forma de combate do câncer não é o tratamento antineoplásico, mas o diagnóstico precoce e, substancialmente, a sua prevenção (ALMEIDA et al., 2005).

### 1.1.1 Ciclo celular

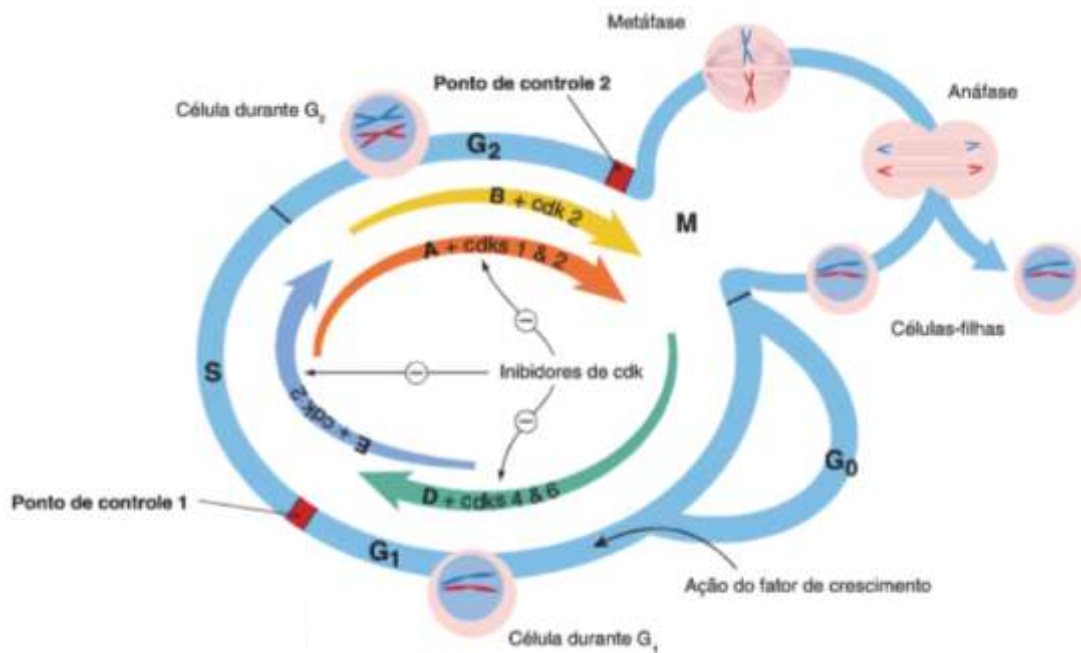
São diversos os mecanismos envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna (HAHN; WEINBERG, 2002), mas a maior parte deles interfere na divisão celular e, assim, o conhecimento sobre o ciclo celular e seus mecanismos torna-se relevante para que haja a compreensão da etiologia do câncer (SALMONM, 1998).

A proliferação celular é um processo de rígido controle que envolve um extenso número de moléculas e vias correlatas. A replicação das células é estimulada por fatores de crescimento ou por sinalização de constituintes da matriz extracelular, através das integrinas. Para realizar a replicação e divisão do DNA, a célula passa por uma rigorosa sequência de eventos conhecida como ciclo celular (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

O ciclo celular (**Figura 5**) consiste de algumas fases:  $G_1$  (pré-síntese de DNA), S (síntese de DNA),  $G_2$  (pré-mitótica) e M (mitótica) (MALUMBRES; BARBACID, 2009). A mitose é subdividida em outras seis fases que incluem prófase, que controla a segregação do envelope nuclear; pró-metáfase, a ligação dos cromossomos aos fusos polares; metáfase, onde os cromossomos atingem o máximo encurtamento e há formação do fuso mitótico, com algumas fibras que vão de polo a polo e outras que se ligam aos cromossomos pelos centrômeros; anáfase, o alinhamento dos cromossomos a placa metafásica; telófase- a separação das cromátides irmãs e citocinese, a separação das células em duas células filhas (MOIR et al., 2000). As denominadas células quiescentes são aquelas que se encontram momentânea ou definitivamente fora ciclo celular, e estão, portanto, em  $G_0$ .

Cada fase do ciclo depende de uma ativação e completude das fases anteriores. Devido ao seu papel de manutenção da homeostase dos tecidos e regulação dos processos de crescimento fisiológico como regeneração e reparo, o ciclo celular possui um ponto de restrição (entre  $G_0$  e  $G_1$ ) e checkpoints (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003) que regulam a entrada na fase S, a entrada na mitose e a saída da mitose (**Figura 5**). Esses pontos de checagem são essenciais para impedir a progressão de células com DNA danificado (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008).

**Figura 5.** As fases do ciclo celular, ciclinas, inibidores de ciclinas e pontos de controle



Fonte: adaptado de RANG et al., 2007.

Atuantes nos checkpoints, ciclinas dependentes de quinases (Cdks) são quinases Serina/Treonina e sua atividade catalítica é modulada por interações com ciclinas e inibidores de ciclinas (Cdkis). A ação destas moléculas é muito importante para garantir uma progressão ordenada do ciclo celular (LIM; KALDIS, 2013). Existem quatro famílias Cdks (Cdk2, Cdk3, Cdk4 e Cdk6) que regulam a intérfase em combinação com seus ligantes associados à ciclina (ciclinas A,B,D e E) (FHEARRAIGH; BRUCE, 2015). Fazendo uma analogia, Cdks são percebidas como o motor que aciona a progressão do ciclo celular enquanto que as ciclinas são consideradas as engrenagens que são alteradas para auxiliar a transição entre as fases do ciclo. A atividade quinase de complexos de Cdk/ciclina é fortemente regulada por uma variedade de inibidores de CDK (CKIs), que servem como freios para travar a progressão do ciclo celular sob condições desfavoráveis (MORGAN, 2007; LIM & KALDIS, 2013).

As propriedades conferidas às células tumorais são geralmente ocasionadas por um acúmulo de mutações nos oncogenes, nos genes supressores e nos genes reparadores de DNA, o que caracteriza o câncer como doença genética (FOSTER, 2008). De um modo geral, os oncogenes promovem a proliferação celular ordenada enquanto os genes supressores mantêm essa proliferação sob controle,

restringindo o crescimento celular. Os genes reparadores de danos no DNA estão constantemente restaurando as moléculas de DNA que sofrem mutação. O mau funcionamento dos mecanismos de regulação do ciclo celular permite a passagem das células mutadas pelo ciclo, acumulando mutações que contribuem para o surgimento das características do tumor maligno (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE & BERNEMAN, 2003; LOURO et al., 2002).

A resposta do sistema de controle de dano ao DNA está intimamente relacionada ao câncer quanto ao dano no DNA. Esse sistema oferece uma barreira biológica intrínseca contra o desenvolvimento de neoplasias, e os tumores se desenvolvem quando a manutenção da integridade genômica falha. Defeitos nos sensores dos sistemas de reparo de diversas lesões do DNA de células germinativas e somáticas danificam a sinalização e os mecanismos de ativação dos checkpoints, fatores que podem predispor ao câncer e fomentar a progressão tumoral (BARTEK; LUKAS, 2010).

A instabilidade genômica é uma das características mais comuns dos tumores humanos (HANAHAN; WEINBERG, 2011; LORD; ASHWORTH, 2012). A incapacidade da maioria das células cancerosas em tornarem-se células adultas não replicantes significa que as mesmas permanecem em um estado altamente proliferativo e superam as células normais. Uma abordagem para controlar esta proliferação é a utilização de agentes anti-neoplásicos, que podem matar as células através de mecanismos diversos. Assim, as células expostas a agentes químicos ou biológicos são induzidas a uma via de diferenciação que resulta em células adultas em fase terminal sem capacidade de replicação e que desencadearia um processo de morte celular (UZUNOGLU et al., 1999, ANAZETTI et al., 2003). Boa parte destes agentes quimioterápicos clinicamente disponíveis na atualidade, são oriundos de produtos naturais.

## **1.2 BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS**

Existem mais de 120 substâncias químicas distintas, derivadas de produtos naturais, consideradas moléculas muito importantes para o mercado farmacêutico. Outros medicamentos disponíveis no mercado são derivados de modificações semissintéticas de substâncias também de origem natural. De acordo

com as estimativas, aproximadamente 25% dos produtos farmacêuticos do mundo têm um grau significativo de origem em comunidades indígenas, o que representa uma quota de mais de 2000 bilhões de dólares no mercado global (SANDHU, 2011).

Plantas são organismos sésseis e, portanto, não podem mover-se em resposta a ameaças bióticas ou abióticas, elas desenvolveram suas próprias defesas em resposta a esses insultos, isso geralmente ocorre através da secreção de uma mistura de compostos químicos (PRITHIVIRAJ; PASCHKE; VIVANCO, 2007), os metabólitos secundários.

Embora metabolitos primários desempenhem um papel fundamental na sobrevivência da espécie, participando de funções primordiais como a fotossíntese e respiração, ausência de metabolitos secundários não resulta em morte imediata, mas pode ocasionar disfunção da sobrevivência do organismo a longo prazo, o que confere a eles um importante papel na defesa de organismos vegetais. Estes compostos constituem um grupo extremamente variado de produtos naturais sintetizados por plantas, fungos, bactérias, algas e animais. (AGOSTINI-COSTA ET AL., 2012).

A maioria dos metabólitos secundários, tais como terpenos, compostos fenólicos e alcalóides são classificados de acordo com sua origem biossintética. Diferentes classes destes compostos são muitas vezes associadas a um conjunto restrito de espécies dentro de um grupo filogenético e constituem o composto bioativo em diversas plantas. Uma simples classificação de metabólitos secundários inclui três grupos principais: terpenos (como glicosídeos cardíacos, carotenóides e esteróis), compostos fenólicos (como cumarinas, lignanas, estilbenos, flavonóides, taninos e lignina) e compostos azotados (tais como alcalóides e glucosinolatos) (AGOSTINI-COSTA et al., 2012).

Além dos organismos vegetais, metabólitos clinicamente importantes são derivados de fontes animais. Um exemplo importante é o anti-hipertensivo inibidor da enzima conversora de angiotensina, Captopril. Um dos medicamentos atualmente mais prescritos para o tratamento de hipertensão é oriundo do veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*), estudado por Sérgio Ferreira e Rocha e Silva (1965), na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto, os quais evidenciaram seus efeitos hipotensores (BARREIRO; FRAGA, 2001). Outros exemplos de fármacos obtidos de fontes naturais são ziconotida, um analgésico potente, identificado no gastrópode *Conus magus* (OLIVEIRA et al., 1987) e a

cefalosporina C, um antimicrobiano encontrado no fungo marinho *Cephalosporium sp.*, presente em água marinha (BURTON & ABRAHAM, 1951, KELECOM, 2002).

Segundo a Orientação Técnica CGEN/MMA nº 7, de 30 de julho de 2009, a bioprospecção é a etapa na qual os genótipos promissores, selecionados na fase da pesquisa científica, são submetidos a testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) e de valor de cultivo e uso (VCU), ou ensaios equivalentes (PALMA, 2012). A bioprospecção, com seu potencial como rica e importante fonte de novos agentes terapêuticos, é uma valiosa ferramenta para a descoberta e pesquisa de novos fármacos. Na década de 80, nenhuma parte dos orçamentos das indústrias farmacêuticas dos Estados Unidos foi gasto na pesquisa de vegetais superiores, mas o cenário vem se modificando e hoje se estima que mais de 200 companhias e organizações de pesquisa do mundo inteiro estão triando componentes de plantas e animais para fins medicinais (SANDHU, 2011).

A terapia oncológica ampliou seu leque de produtos graças aos avanços em pesquisas com produtos naturais no século XX. É principalmente devido à investigação com plantas e microorganismos que os tratamentos têm contado com um elenco maior de moléculas utilizadas na terapêutica antineoplásica, pois pelo menos 60% destes produtos são provenientes da natureza (KUMMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2007; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

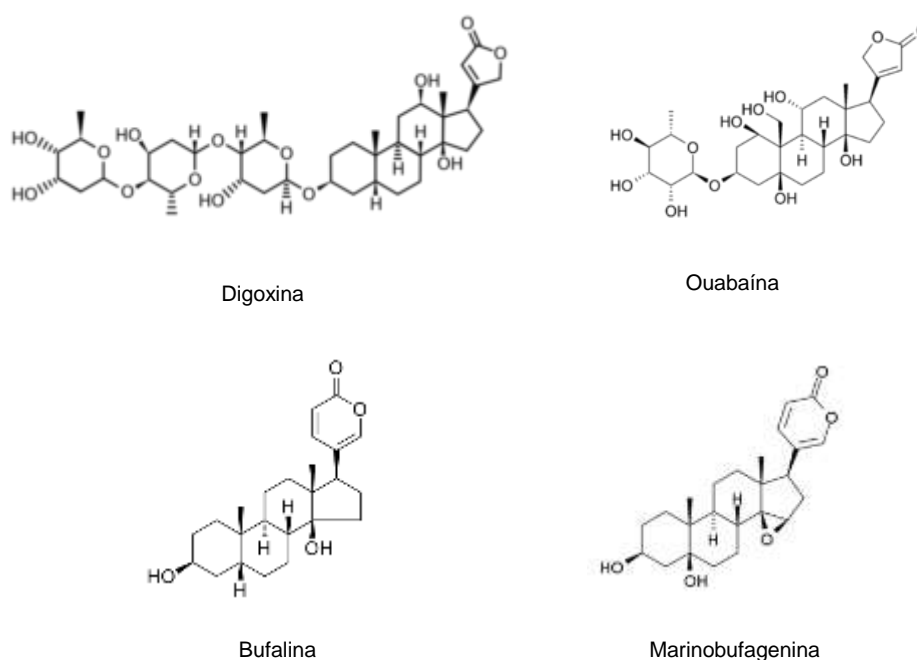
A maioria dos fármacos naturais usados na medicina são obtidos a partir de plantas e apenas um pequeno número vem dos reinos animal e mineral. Drogas obtidas a partir de animais podem ser produtos de origem glandular, extraída de sítios como a tireóide ou fígado. Óleos de fígado de peixe, musk, cera de abelha, certos hormônios, enzimas e antitoxinas também são exemplos de produtos obtidos a partir de fontes animais (KUMAR, 2009).

Animais contém ampla variedade de metabólitos secundários de estrutura peculiar que podem ser úteis como novos modelos para a descoberta de moléculas inéditas (FERREIRA et al., 2013; ROCHA et al., 2001; CUNHA-FILHO et al., 2010). A secreção da pele e veneno de anfíbios é uma fonte de compostos biologicamente ativos, como por exemplo, peptídeos, alcalóides, bufadienolídeos, aminas biogênicas e proteínas (TOLEDO & JARED, 1995; DMITRIEVA et al., 2000; XU-TAO et al., 2009; YANG et al., 2010; GAO et al., 2011; FERREIRA et al., 2013).

### 1.2.1 ESTERÓIDES CARDIOTÔNICOS DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS: CARDENOLÍDEOS E BUFADIENOLÍDEOS

Os glicosídeos cardíacos são uma família diversa de compostos derivados de produtos naturais. Glicosídeos esteróides C23 ou C24 têm sido encontrados em várias angiospermas e animais vertebrados (anfíbios). Cardenolídeos e bufadienolídeos diferenciam-se pela quantidade de membros do anel lactônico, sendo os primeiros de cinco membros e os demais de seis membros (BABULA et al., 2013) (**Figura 6**).

**Figura 6.** Estruturas moleculares de cardenolídeos (digoxina e ouabaína) e bufadienolídeos (bufalina e marinobufagenina).



Estas moléculas constituem um grupo de esteróides que se ligam e inibem a bomba de (Na, K)-ATPase, com elevada seletividade e afinidade. Tradicionalmente, estas substâncias são extraídas de plantas como *Digitalis purpurea* ou dedaleira (digitalis), *Strophanthus gratus* (ouabaína) ou pele de anfíbios (*Bufo marinus*- bufalina, marinobufagenina) (**Figura 7**). Além disso, essas substâncias são produzidas de forma endógena em mamíferos: vários glicosídeos

cardíacos diferentes foram identificados em tecidos de mamíferos, incluindo a ouabaína e a digoxina, e diversos bufadienólídeos incluindo a marinobufagenina (HAVIV; KARLISH, 2013).

Cardenólídeos e bufadienólídeos têm como alvo as subunidades  $\alpha$  da (Na, K)-ATPase. Além do equilíbrio iônico, esta bomba também funciona como um versátil transdutor de sinal e tem relevância na adesão celular. Sua atividade e expressão excessivas estão implicadas no desenvolvimento e progressão de diversos tipos de cânceres (MIJATOVIC; DUFRASNE; KISS, 2012; BANULS et al., 2013).

Glicosídeos cardíacos endógenos estão intimamente envolvidos no controle da pressão arterial e natriurese renal. Ouabaína endógena é sintetizada a partir de precursores de esteróides nas células da zona glomerular e na Zona fasciculata do córtex adrenal, semelhantemente a outros hormônios esteróides. Por sua vez, a digoxina (**Figura 6**), tem sido utilizada na prática clínica há mais de 200 anos e a nível terapêutico, exerce um efeito inotrópico positivo (um aumento na força contrátil) sobre o músculo cardíaco, melhorando assim a circulação em caso de débito cardíaco insuficiente (BAGROV; SHAPIRO; FEDOROVA, 2009).

**Figuras 7.** Da esquerda para a direita: *Digitalis purpúrea* (A), *Strophanthus gratus* (B), *Bufo marinus* (C), respectivamente.



(A)



(B)



(C)

Fonte: **A:** <http://www.plantinfo.co.za>

**B:** <http://www.rareflora.com>

**C:** <http://www.crazy4images.com>

### 1.3 GLICOSÍDEOS CARDÍACOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER

Por apresentar elevada citotoxicidade sobre células tumorais, os glicosídeos cardíacos podem se tornar reforços na terapia antineoplásica. A primeira geração de moléculas inspiradas nos glicosídeos está atualmente em testes de fase clínica (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

Dados recentes tem demonstrado que a digoxina consegue inibir o crescimento e induzir apoptose em células tumorais em concentrações comumente encontradas no plasma de pacientes tratados com este fármaco (LUKAS & DEMARTIN, 1969), porém alcançando perfil citotóxico apenas quando administrada via parenteral (PATEL et al., 2011). Além disso, publicações recentes indicam sua aplicabilidade em câncer de próstata (WALSH, 2012) e retinoblastoma (PATEL et al., 2011). A inibição da glicólise pode ser um mecanismo chave no qual os glicosídeos cardíacos alvejam as células tumorais, embora possam coexistir outros mecanismos (LOPEZ-LAZARO, 2007).

Alguns estudos clínicos estão focados na citotoxicidade e possível aplicabilidade dos glicosídeos cardíacos no tratamento do câncer: a ouabaína vem sendo testada em estudos clínicos de fase 1, em leucemia mielóide aguda (LOPEZ-LAZARO, 2007), e a digoxina em combinação com o erlotinib também vem sendo investigada em um estudo clínico de fase 2, com pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (KAYALI, 2009), o que denota o avanço dos estudos em relação a este grupo de compostos químicos.

Agentes anticâncer derivados de fontes naturais têm atraído significativa atenção no mundo inteiro. Por exemplo, a biodiversidade de componentes químicos dos extratos de e secreções da pele e glândulas de sapos possuem atividade antineoplásica e esses compostos podem ser utilizados no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (CLARKE, 1997; QI et al., 2014).

A marinobufagenina, um bufadienolídeo cardiotônico endógeno presente em mamíferos (SCHONER, 2002), inibe a bomba de membrana ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )-ATPase (BAGROV; FEDOROVA, 1998; FEDOROVA et al., 2001) e parece ter propriedades vasoconstrictoras *in vitro* (PAMNANI et al., 1994). A secreção de marinobufagenina ocorre em resposta a um aumento do volume plasmático, e níveis circulantes desta substância têm sido encontrados em pacientes com expansão de volume mediada por hipertensão e pré-eclâmpsia (LOPATIN et al., 1999).

Investigações químicas evidenciaram a presença do bufadienolídeo marinobufagenina em venenos de espécies como *Rhinella marina* e *Rhinella*

*guttatus*. Ferreira e colaboradores (2013) estudaram uma série de extratos provenientes destas espécies e relataram atividade citotóxica bastante relevante em células tumorais, baixa atividade em eritrócitos na maioria delas e um índice de seletividade de até 80 vezes comparando-se a atividade antitumoral com células humanas normais. Esses achados estimularam o nosso grupo a seguir estudando a atividade deste bufadienolídeo e explorar sua atividade biológica antitumoral e mecanismo de ação e justificam o presente trabalho.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Determinar o potencial citotóxico e os possíveis mecanismos de ação do bufadienolídeo marinobufagenina.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a atividade citotóxica e potencial antiproliferativo do bufadienolídeo em células tumorais humanas e células normais murinas;
- Avaliar as modificações causadas pelo bufadienolídeos sobre a morfologia de células tumorais;
- Avaliar os prováveis mecanismos de ação responsáveis pela citotoxicidade da marinobufagenina
- Avaliar a capacidade de reparo do DNA após incubação com a Marinobufagenina;
- Avaliar a influência da marinobufagenina sobre a morfologia celular e citoesqueleto;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material utilizado

##### 3.1.1 Material biológico

As linhagens celulares utilizadas estão listadas na tabela 3, no item de cultivo celular, localizado nos métodos.

##### 3.1.2 Reagentes e soluções

**Tabela 1.** Lista de reagentes e soluções

Reagente	Solução	Fabricante
Álcool Etílico	-	Vetec®
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma®
Alamar Blue	0,3 mg/mL	Sigma®
Dimetilsufóxido (DMSO)	-	Dinâmica®
Doxorrubicina 1mg/ml	1mg de Doxorrubicina 1mL DMSO	Sigma®
Edta		
Entellan		
Ficoll-Hypaque	-	Sigma®
Fitohemaglutinina	-	Sigma®
Heparina		
Iodeto de propídeo 50 µg/MI	1 mg de iodeto de propídeo PBS q.s.p. 50 mL Diluído em água deionizada e esterilizada, filtrado em filtro. Millipore (0,22 µm) e	Boehringer®
Meio de cultura de células RPMI 1640	complementado com SBF 10%, 1% de glutamina, 1% de antibiócos, 1% de bicarbonato de sódio (0,75%) e 25 mM e HEPES	Cultilab®
MTT	20 mg de MTT PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma®

Ouabaína	-	Sigma®
Penicilina-	Penicilina 10.000 U.I./mL	Cultilab®
Estreptomicina	Estreptomicina 10 mg/mL	
	8,766 g de Cloreto de sódio	
	2,14 g de NaHPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	
Tampão fosfato (PBS)	0,276 g de NaHPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Labsynth®
	H <sub>2</sub> O q.s.p. 1L de solução (ph=7,2)	
	50 mL de Tripsina 2,5%	Cultilab®
Tripsina 0,25%	0,125 g de EDTA	Proquímios®
	450 mL de PBS	
TritonX-100	-	Isofar®
Xilol 10%	100 mL de formaldeído	Dinâmica®
	H <sub>2</sub> O q. s. p. 1 L	

### 3.1.3 Equipamentos

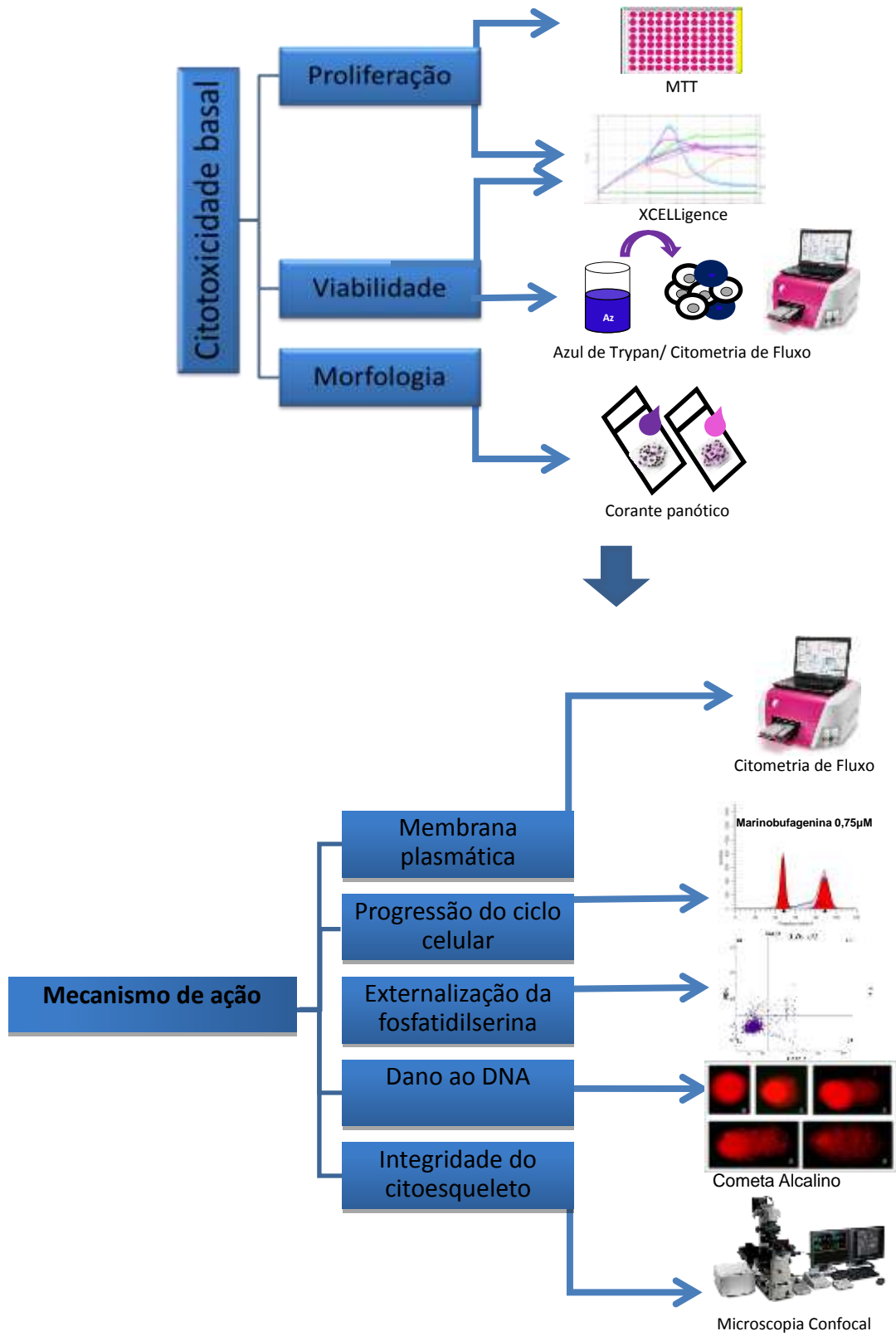
**Tabela 2.** Lista de equipamentos

---

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2
Banho-maria, DELTA Modelo 105Di
Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212
Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403
Citômetro de fluxo, BD FACSVers
Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter
Fluxo laminar, VECO
Incubadora de células, (CO <sub>2</sub> Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow
High Throughput Screening (HTS) /Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter
Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070
Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab
Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot
Microscópio de fluorescência, Olympus
pHmetro, Micronal B474
Pipetas automáticas, Gilson
Sistema de Fotodocumentação, Kodak

---

### 3.2 Desenho Experimental

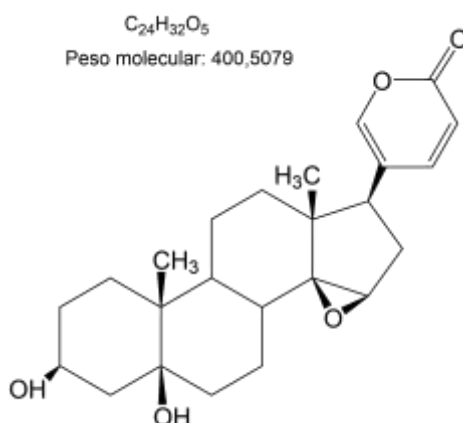


### 3.3 Métodos experimentais

#### 3.3.1 Coleta, isolamento e identificação do composto

A coleta da secreção do veneno de sapo de *Rhinella marina* foi realizada no estado de Mato Grosso. Os animais foram identificados pelo professor Dr. Geraldino Andrade Cunha-Filho (D.J.R. – IBAMA, SISBIO: número 30034-1). Modelos das espécies (*R. marina* - ABAM-H 1262) foram depositadas no Acervo Biológico da Amazônia Meridional (Sinop, Mato Grosso, Brasil). A identificação e extração da molécula marinobufagina (**Figura 8**) foram realizadas conforme Cunha-Filho e colaboradores (2005) e Ferreira e colaboradores (2013). A amostra estudada (marinobufagenina) recebeu o código de RM20.

**Figura 8.** Estrutura molecular da marinobufagenina.



#### 3.3.2 Citotoxicidade Basal

##### 3.3.2.1 Cultivo Celular

As linhagens celulares utilizadas para avaliação da atividade antiproliferativa foram obtidas a partir da doação pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI) e suas respectivas concentrações de plaqueamento para o teste do MTT estão discriminadas na **tabela 3**.

As células mononucleadas de sangue periférico (CMSP) obtidas de voluntários sadios foram utilizadas como modelo para avaliação da citotoxicidade sobre células normais não transformadas.

**Tabela 3.** Linhagens utilizadas no ensaio de citotoxicidade MTT.

Linhagem Celular	Tipo Histológico	Origem	Concentração de Plaqueamento
MDAMB- 435	Pele	Humana	$0,1 \times 10^6$ céls/mL
MCF7	Mama	Humana	$0,1 \times 10^6$ céls/mL
HCT-8	Cólon	Humana	$0,7 \times 10^5$ céls/mL
HEPG2	Fígado	Humana	$0,7 \times 10^5$ céls/mL
K562	Leucemia eritrócítica crônica	Humana	$0,3 \times 10^6$ céls/mL
PC3	Próstata	Humana	$0,1 \times 10^6$ céls/ mL
CMSP	Monócitos e Linfócitos	Humana	$1,0 \times 10^6$ céls/mL
B16F10	Melanoma murinho	Murina	$0,7 \times 10^5$ céls/ mL
L929	Fibroblasto murinho	Murina	$0,1 \times 10^6$ céls/ mL

As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical e mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL ou 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL, Corning), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementando com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina). As culturas tiveram seu crescimento acompanhado sob microscópio óptico de inversão a cada 24 horas. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo, numa concentração de  $0,5-1,0 \times 10^6$  células/mL. Para o desprendimento das células aderidas foi utilizado solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída em PBS.

### 3.3.2.2 Teste do MTT

#### Princípio do Teste

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (MOSMANN, 1983), permitindo, dessa forma, quantificar a porcentagem de células vivas.

#### Procedimento Experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 poços em densidade entre  $0,7 \times 10^5$  e  $0,3 \times 10^6$  células/mL (ajustado para cada linhagem, como mostrado na tabela 2). As células foram incubadas durante 24 e 72 horas juntamente com a amostra testada. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada poço recebeu 150  $\mu$ L da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas em estufa a 37°C e a 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensionado em 150  $\mu$ L de DMSO para a quantificação do sal reduzido (formazan) nas células vivas. As absorbâncias foram mensuradas através do espectrofotômetro de placa utilizando o programa Mutimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.) no comprimento de onda de 595 nm.

#### Análise dos Dados

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. O gráfico absorbância x concentração foi registrado e determinado a sua concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI50) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism Software versão 5.0.

### **3.3.2.3 Avaliação da atividade antiproliferativa pelo método de exclusão por azul de Trypan**

#### **Princípio do método**

A exclusão por azul de Trypan é um método quantitativo de avaliação da viabilidade celular, que permite quantificar separadamente células viáveis e células não viáveis. O corante penetra em todas as células, no entanto, apenas as células metabolicamente ativas (viáveis) conseguem expulsar o Trypan para fora, enquanto que nas não viáveis é observada uma coloração azulada (PERES; CURI, 2005).

#### **Procedimento experimental**

Para a realização do teste, as células PC3 em suspensão foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL e incubadas por 24h com a Marinobufagenina nas concentrações de 0,375, 0,75 E 1,5  $\mu$ M. A Doxorrubicina e Ouabaína foram utilizadas como controle positivos. Após os períodos de incubação as células foram transferidas para tubos eppendorf, que em seguida foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm. O pellet foi ressuspenso em 1 mL de PBS. Em uma alíquota de 90  $\mu$ L de suspensão de células, foram adicionados 10  $\mu$ L de azul de Trypan 0,4%. As células viáveis e não viáveis foram contadas em câmara de Neubauer.

#### **Análise dos dados**

Os dados foram analisados com base na média  $\pm$  erro padrão da média da triplicata de quatro experimentos. Para verificação da ocorrência de diferença estatística significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste Student Newman-Keuls para comparação entre grupos, com significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### **Citometria de Fluxo**

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para se determinar diferentes características das partículas biológicas. Os citômetros analisam as células ou partículas em meio líquido que passam através de uma fonte de luz. O desvio da luz,

que está relacionado diretamente com a estrutura e morfologia das células, e a fluorescência são determinados para cada partícula que passa pela fonte de excitação. Após a aquisição do desvio da luz e fluorescência de cada partícula, a informação resultante pode ser analisada utilizando-se um computador com programa específico acoplado ao citômetro (SHAPIRO, 1995). Para todos os compostos testados, cinco mil eventos foram avaliados por experimento e os debris celulares foram omitidos da análise. A fluorescência de células de PC3 foram então determinadas por citômetro de fluxo BD FACSVerse. Cinco mil eventos foram analisados para cada replicata em pelo menos três experimentos independentes.

#### **3.3.2.4 Determinação da integridade da membrana, densidade e morfologia celular por citometria de fluxo**

##### **Princípio do Teste**

O teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo (PI) penetrar nas células cuja membrana esteja rompida e após ligação ao DNA emitir alta fluorescência quando excitado pelo laser. As células com membrana íntegra emitem baixa fluorescência (SHAPIRO, 1995). Procedimento Experimental Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 µL de uma solução de PI a 50 µg/mL (diluído em tampão fosfato). Após 5 minutos as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

#### **3.3.2.5 Análise da proliferação e viabilidade celular- xCELLigence**

##### **Princípio do teste**

O uso de ensaios *in vitro* com células é crucial para o entendimento da eficácia, especificidade, permeabilidade, solubilidade, estabilidade e mecanismo de ação da interação entre uma substância e seus alvos celulares, porém, a maioria desses ensaios apresentam várias limitações. Entre elas estão passos que envolvam a lise ou fixação celular, levando a uma possível diminuição do controle da viabilidade celular antes e depois do tratamento. Outro fator importante é que alguns

desses ensaios podem prover uma informação limitada sobre o mecanismo de interação da droga com seus alvos celulares.

O xCELLigence System RTCA DP (Dual Plate) permite uma monitoração dinâmica e livre da proliferação e viabilidade celular em tempo real. Esse equipamento é capaz de quantificar a proliferação e viabilidade de células aderidas em tempo real utilizando um sistema eletrônico de leitura, denominado, Impedância. As células são plaqueadas em placas de 16 poços que contêm sensores microeletrônicos. A interação das células com esses biosensores eletrônicos geram uma resposta de impedância que não apenas indica o status de viabilidade celular como também correlaciona com o número de células no poço.

A medição da impedância não é um processo invasivo, fazendo com que as células permaneçam em seu mais normal estado fisiológico durante o ensaio de proliferação e citotoxicidade. Resumidamente, esse software permite a avaliação da proliferação, viabilidade, morte e mudanças morfológicas nas células.

### **Procedimento experimental**

Seguindo as sugestões do fabricante, a fim de padronizar o método, realizou-se uma curva de concentração de células para a escolha do número de células ideal para o experimento. Para tal, as células PC3 foram plaqueadas nas E-plates de 16 poços em concentrações que variaram de  $4 \times 10^5$  a  $0,625 \times 10^5$  células/mL. A aderência, a disposição e proliferação das células foi monitorada a cada 30 minutos utilizando o RT-DP system. A proliferação celular foi monitorada por 48-72 horas. Após o final dessa etapa, o número de células por poço foi escolhido baseado no Index celular máximo encontrado, chegando a concentração ótima de 5000 células/ poço.

### **Tratamento com a substância e ensaio de citotoxicidade**

O indicado número de células/ poço foi plaqueado em 190  $\mu$ L de meio na placa. A aderência, disposição e proliferação das células foram monitoradas a cada 30 minutos pelo sistema RT-DP. Aproximadamente 24 horas depois do plaqueamento, quando as células estavam em sua fase de crescimento logaritmica, as células foram tratadas com 10  $\mu$ L dos compostos dissolvidos em meio de cultura. As células do controle foram tratadas com DMSO, o qual serviu de veículo para a substância. A concentração final de DMSO não excedeu 0,2% em nenhum

tratamento. O taxol (0,1  $\mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo e a ouabaína como padrão de comparação de ação em (Na/K)-ATPase.

### **Análise de dados**

O sensor celular de impedância foi expresso como uma unidade arbitrária chamada de Índice Celular (do inglês, *Cell Index*). O índice celular de cada ponto foi definido como  $(R_n - R_b) / 15$ , onde  $R_n$  é a impedância do poço com célula e  $R_b$  é a impedância do poço apenas com o meio. As curvas de crescimento foram comparadas para uma possível elucidação do mecanismo de citotoxicidade.

### **Análise morfológica**

#### **3.3.2.6 Coloração diferencial com corante panótico rápido**

##### **Princípio do teste**

A coloração com kit panótico rápido (Laborclin®) permite a visualização das características morfológicas das células por meio da coloração diferenciada da membrana celular, do citoplasma e do núcleo, sendo utilizado para sugerir o possível mecanismo de morte celular, seja por apoptose, necrose ou autofagia.

##### **Procedimento experimental**

As células PC3 foram plaqueadas em placas de 24 poços sobre lamínulas circulares na concentração de  $0,4 \times 10^5$  células/mL e incubadas por 24h com Marinobufagenina nas concentrações de 0,375, 0,75 e 1,5  $\mu\text{M}$ , de acordo com a  $\text{IC}_{50}$  determinada pelo ensaio do MTT. A ouabaína foi utilizada como modelo de comparação na concentração de 0,027  $\mu\text{M}$ , sua  $\text{IC}_{50}$ , e o controle negativo foi tratado apenas com o veículo DMSO. Em seguida, as lamínulas foram fixadas com solução de triarilmetano a 0,1%, coradas com solução a 0,1% de xantenos e com solução de 0,1% de tiazinas (Laborclin®). O tempo de imersão em cada solução foi de aproximadamente 5 segundos. As lâminas foram lavadas com água destilada para remover o excesso de corante. Depois de secas foram montadas com lamínulas fixadas com Entellan® e visualizadas em microscópio óptico. O efeito da Marinobufagenina nas células PC3 foi observado por análise morfológica do núcleo

e do citoplasma usando microscopia óptica com aumento de 200x (Olympus, Tokyo, Japan), comparando com o controle negativo e positivo.

### **3.3.3 Mecanismo de ação**

#### **3.3.3.1 Microscopia confocal**

##### **Princípio do teste**

O microscópio confocal de fluorescência por varredura a laser utiliza fluorescência para a aquisição das imagens. A fluorescência é um tipo de luminescência (emissão de luz) em que um corpo absorve luz e após um curto intervalo de tempo reemite essa luz. Esse é o princípio da microscopia de fluorescência, na qual compostos químicos chamados fluoróforos ou fluorocromos são usados para produzir a fluorescência do material em estudo.

A grande vantagem da microscopia confocal é a possibilidade de se obter luz exclusivamente a partir de um único plano, onde um orifício, chamado de “pinhole”, consegue separar apenas a luz proveniente do ponto focado, impedindo assim que a luz refletida/emitida por outros pontos fora de foco chegue até o detector.

O microscópio de varredura a laser varre a amostra sequencialmente ponto a ponto e linha a linha em diferentes planos focais da amostra, gerando imagens com alto contraste e alta resolução nos eixos X, Y e Z. Todas essas informações são então processadas por um computador e assim imagens tridimensionais podem ser geradas e manipuladas digitalmente.

##### **Procedimento experimental**

Células da linhagem PC3 (adenocarcinoma de próstata) foram plaqueadas sobre em placas individuais na densidade de  $0,25 \times 10^5$  células/mL. A Marinobufagenina foi incubada junto com as células durante 24 h, nas concentrações de 0,375, 0,75 e 1,5  $\mu\text{M}$ , em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade. O taxol (100 nM) foi utilizado como controle positivo e a ouabaína (27 nM) como padrão de comparação.

Após o período de incubação o meio foi retirado e as células lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído (3,7 % em PBS) e em seguida permeabilizadas

com Triton X-100 (0,25 % em PBS). Uma solução de RNase foi utilizada, a fim de eliminar possíveis interferências de fragmentos de RNA e ribossomos. Em seguida as células foram incubadas com anticorpo específico para actina (phalloidin / Alexa Fluor® 488) conjugado a corante da Alexa-Fluor (Molecular Probes). O núcleo foi corado com DAPI ou IP (Iodeto de Propídeo) e as lâminas foram analisadas em microscópio confocal LSM 710 (Carl Zeiss).

### **3.3.3.2 Análise do Ciclo Celular por citometria de fluxo**

#### **Princípio do Teste**

Esse teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo (PI) ligar-se ao DNA. O PI consegue intercalar proporcionalmente a quantidade de DNA da célula, podendo então mensurar as fases do ciclo celular, através da quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo celular.

#### **Procedimento Experimental**

Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 µL de uma solução de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e 50 µg/mL de iodeto de propídeo em PBS). Após um período de 30 minutos, onde os tubos permaneceram no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (NICOLETTI et al., 1991).

### **3.3.3.3 Determinação da Externalização da Fosfatidilserina – Anexina V por citometria de fluxo**

#### **Princípio do Teste**

Um dos principais processos que ocorrem na apoptose é a perda da assimetria da membrana fosfolipídica com a translocação da fosfatidilserina da membrana interna da bicamada lipídica para superfície celular. A externalização da PS ainda continua como um processo não totalmente conhecido, mas sabe-se que a externalização da fosfatidilserina funciona como um sinal da célula para que os macrófagos as fagocitem, antes da perda da integridade de membrana celular

(VERMES et al., 1995).

### **Procedimento Experimental**

A externalização da fosfatidilserina foi analisada por citometria de fluxo após coloração da fosfatidilserina com a anexina V (VERMES et al., 1995). Foi utilizado o kit Guava Nexin para determinar apoptose inicial e tardia. As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspendidas em 135  $\mu$ L de PBS com 5  $\mu$ L de 7-amino-actinomicina (7AAD) e 10  $\mu$ L de anexina V conjugada com ficoeritrina (PE). As células foram gentilmente agitadas e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente (20-25°C) no escuro. Posteriormente, as células foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACSVerser). Anexina V é uma proteína ligada a um fosfolípido que tem alta afinidade por PS. 7AAD, é um corante hidrofílico impermeável em células intactas, e é utilizado como um indicador da integridade da membrana celular. A fluorescência da anexina V conjugada com a ficoeritrina foi mensurada por fluorescência amarela-583nm e o 7AAD na fluorescência vermelha a 680 nm. A percentagem de células viáveis e de células apoptóticas inicial e tardia foi calculada. Análise dos Dados Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 2 experimentos realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças 41 significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Newman Keuls, com nível de significância de 5%. ( $p < 0,05$ ).

#### **3.3.3.4 Estudo da ação da marinobufagenina sobre o dano ao DNA em células PC3 através do ensaio do cometa alcalino**

##### **Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP)**

As células mononucleadas foram obtidas do sangue periférico de voluntários sadios coletado em tubos tipo Vacutainer contendo solução de EDTA K2 (BD Vacutainer®) como anticoagulante. Após a coleta, 8 mL de sangue total foram vagarosamente depositados sobre 2 mL de Ficoll-Hypaque (Sigma) e centrifugados para separação das fases da solução por velocidade de sedimentação. As células mononucleadas concentram-se na camada localizada na interface entre o plasma

(fase clara) e os eritrócitos (fase escura). As CMSP foram retiradas, lavadas duas vezes com PBS e ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino e antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina). Para estimular a proliferação dos linfócitos, foi adicionado ao meio 3% do agente mitogênico fito-hemaglutinina. Todos os estudos foram realizados em conformidade com as diretrizes de pesquisa brasileiras (Lei 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde) e com a Declaração de Helsinki.

## **Teste do Cometa**

### **Princípio do Teste**

O teste do cometa, também conhecido como *single-cell gel electrophoresis (SCGE)*, é um ensaio utilizado para detecção de dano genotóxico que também encontrou ampla aplicação no monitoramento de efeitos induzidos por radiação ou substâncias químicas (HARTMANN et al., 2003). Existem dois protocolos principais para a execução deste teste (OLIVE, 1989; OSTLING; JOHANSON, 1984; SINGH et al., 1988). A versão alcalina, mais empregada por ser mais abrangente, utiliza pH maior que 13 a fim de induzir a desnaturação da molécula de DNA e detectar lesões de diversas naturezas, como quebras de fita simples e duplas, sítios álcali-lábeis, sítios de reparo por excisão e ligações cruzadas. A versão neutra, por sua vez, vale-se de eletroforese em tampão de pH entre 7,0 e 8,5 para detectar apenas quebras de fita dupla em DNA ou ligações cruzadas entre DNA e DNA, DNA e proteína ou DNA e xenobiótico.

### **Procedimento Experimental**

O presente estudo utilizou-se do teste de cometa alcalino para avaliar a indução de danos ao DNA de CMSP expostas a 0,375, 0,75 e 1,5 µM de Marinobufagenina por 24 horas de tratamento.

### **Preparo das laminas**

As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (Gibco) diluída a 0,5% em solução de PBS livre de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  à temperatura de 60°C e mantida em temperatura ambiente até completa solidificação. As CMSP controle ou tratadas com Marinobufagenina foram embebidas em uma

solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%; Gibco) a 37°C e adicionadas às lâminas pré-cobertas com agarose, sobrepostas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação da agarose.

### **Lise celular**

Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram delicadamente removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise a 4°C e mantidas por, no mínimo 1 hora, abrigadas da luz.

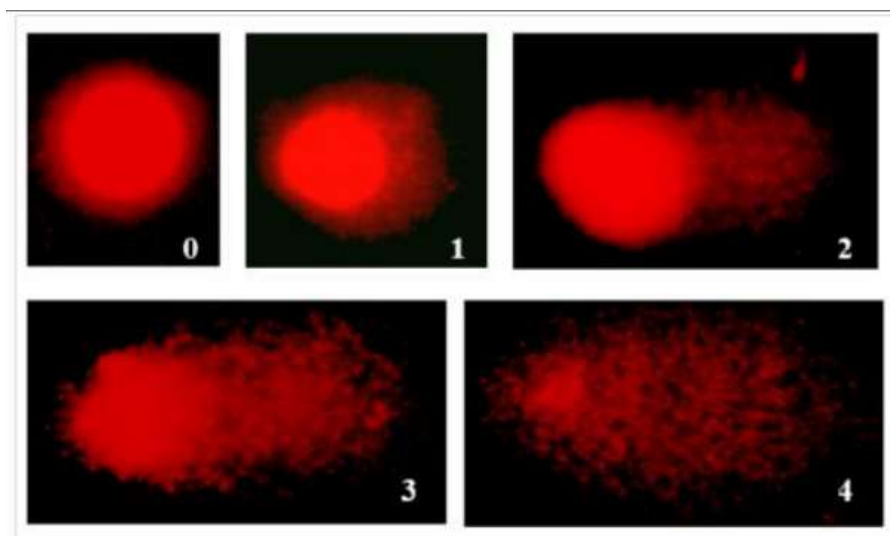
### **Neutralização e eletroforese**

Ainda ao abrigo da luz, as lâminas foram imersas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese que, por sua vez, foi preenchida com o tampão de corrida alcalino a 4°C. A eletroforese (cuba Bio Rad, modelo DNA Sub Cell Gel) foi conduzida a 14 V e 12 mA ou 0,5 V/cm (fonte Life Technologies, modelo 250) por 60 minutos a 4°C. Após a eletroforese, as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 minutos e fixadas em etanol a 100%.

### **Coloração e análise das lâminas**

A coloração das lâminas foi realizada com solução de brometo de etídio (Sigma) a 20 µg/mL. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus, modelo BX41) e classificadas de acordo com os escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (figura 10). Foram contados 100 cometas por lâmina e atribuídos, por análise visual, a uma das cinco categorias – sem dano, baixo nível de dano, médio nível, nível alto de dano e dano máximo – que relacionam a percentagem de DNA na cauda do cometa ao grau de lesão sofrida pela célula (LOVELL; THOMAS; DUBOW, 1999).

**Figura 9.** Tipos de cometa e classificação por categoria de dano



0 – sem dano (cauda < 5%); 1 – baixo nível de dano (5 – 20%); 2 – médio nível de dano (20 – 40%); 3 – alto nível de dano (40 – 95%) e 4 – dano máximo (>95%).

O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula:

$$ID = \sum_{i=0}^4 ni \times i$$

onde  $n_i$  é o número de células com nível de dano  $i$  (0, 1, 2, 3 ou 4). A frequência de dano (FD) representa a porcentagem de células que sofreram danos no DNA.

### **Análise dos dados**

Os dados foram analisados a partir da média e erro padrão da média de 2 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Newman Keuls, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), usando o programa GraphPad Prism 5.0.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da atividade citotóxica da Marinobufagenina- MTT

Usando o método do MTT, estabeleceu-se o perfil citotóxico da Marinobufagenina em sete linhagens tumorais, sendo seis humanas e uma de origem murina. A **tabela 4** apresenta dados obtidos após um período de incubação de 72 horas. A amostra extraída do veneno de anfíbio, RM20, demonstrou potencial citotóxico elevado frente todas as linhagens testadas, apresentando  $CI_{50}$  variando entre 0,10 (K562) e 0,38 (HEPG2)  $\mu M$ . Apesar de as linhagens de cólon (HCT-8), leucemia (K562) (**tabela 4**) e próstata (PC3) (**tabela 5**) terem alcançado os menores valores de  $CI_{50}$  dentre as células testadas, a Marinobufagenina não demonstrou seletividade por nenhuma das linhagens tumorais em questão, tendo um perfil citotóxico similar para todas elas. A Ouabaína foi escolhida como controle positivo e apresentou valores em nanomolar em suas concentrações inibitórias ( $CI_{50}$ ), exceto em B16F10, semelhantemente a Marinobufagenina (**tabela 4**).

**Tabela 4.** Avaliação da atividade citotóxica da Marinobufagenina frente a linhagens de células tumorais e normais (L929) avaliados pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação.

Linhagens Celulares Tumorais	Origem histológica	$CI_{50}$ 72h MTT	
		RM20 $\mu M$	Ouabaína $\mu M$
<b>B16F10</b>	Melanoma murino	>12	>1
<b>MDAMB-435</b>	Melanoma humano	0,21 (0,16- 0,27)	0,08 (0,066- 0,098)
<b>HCT-8</b>	Cólon humano	0,16 (0,13- 0,22)	0,06 (0,048- 0,099)
<b>K562</b>	Leucemia humana	0,10 (0,08- 0,12)	0,038 (0,014- 0,080)
<b>MCF7</b>	Mama humana	0,38 (0,27- 0,55)	0,042 (0,031- 0,057)
<b>HEPG2</b>	Carcinoma hepatocelular	0,32 (0,23- 0,43)	ND
<b>PC3</b>	Adenocarcinoma de próstata	0,12 (0,07- 0,17)	0,023
<b>L929</b>	Fibroblasto murino	>12	>1

Valores de  $CI_{50}$  apresentados em  $\mu M$ . Foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa GraphPad Software versão 6.0. Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos através de três experimentos independentes realizados em triplicata, sendo representados entre parênteses.

\*ND- não determinado

Ainda na **tabela 4**, observamos valores de  $CI_{50}$  estabelecidos na linhagem L929, de fibroblastos murinos (células normais) em um período de incubação de 24 horas. Tanto a amostra teste quanto a Ouabaína apresentaram concentrações inibitórias consideravelmente elevadas neste teste.

Diante dos resultados anteriores, e observando-se o fato de a amostra teste ter demonstrado perfil citotóxico semelhante em praticamente todas as linhagens tumorais testadas, a linhagem de adenocarcinoma de próstata (PC3)– o câncer de maior incidência em indivíduos do sexo masculino- foi escolhida para a realização de estudos mais aprofundados relacionados à Marinobufagenina.

Foram também estabelecidos valores de  $IC_{50}$  no período de incubação de 24 horas na linhagem PC3, a fim de verificar a relação de tempo e concentração em outros períodos de incubação da amostra em estudo. Como previsto, a amostra extraída das glândulas de anfíbios, RM20, apresentou um comportamento tempo dependente em relação aos períodos de incubação, sendo seus valores de  $CI_{50}$  0,12  $\mu$ M em 72 horas e 0,75  $\mu$ M em um período de incubação de 24 horas. A Ouabaína apresentou citotoxicidade diferente da amostra em estudo, pois sua  $CI_{50}$  se manteve constante nos diferentes tempos de incubação.

**Tabela 5.** Avaliação da atividade citotóxica da Marinobufagenina, frente à linhagem PC3, avaliados pelo ensaio do MTT após 24 horas de incubação com o composto.

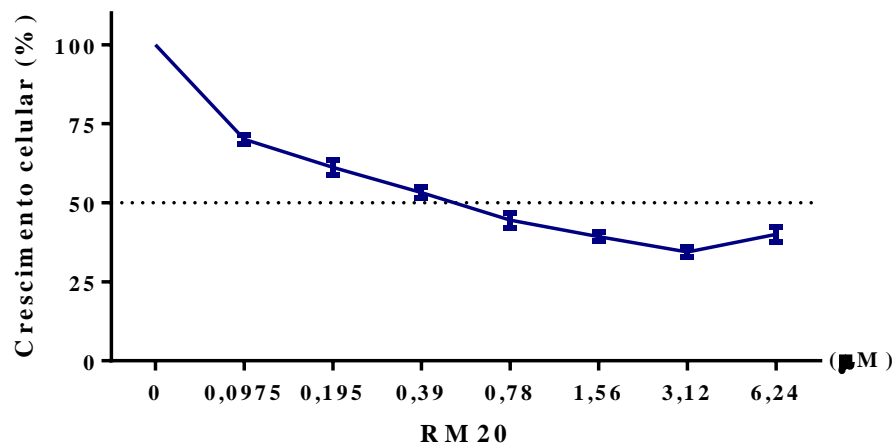
Concentração inibitória média ( $CI_{50}$ )		
Amostras:	RM20 $\mu$ M 24h	Ouabaína $\mu$ M
	0,75 (0,247- 0,459)	0,027 (0,024- 0,030)

Valores de  $CI_{50}$  apresentados em  $\mu$ M. Foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa GraphPad Software versão 6.0. Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos através de três experimentos independentes realizados em triplicata, sendo representados entre parênteses.

A partir dos resultados obtidos através do método do MTT, optamos por realizar os demais experimentos no período de 24 horas de incubação com a

marinobufagenina, uma vez que sua  $CI_{50}$  manteve valor baixo. De acordo com a variação do metabolismo mitocondrial, elaborou-se um gráfico (**Figura 10**) para que fossem estabelecidas as concentrações a serem utilizadas nos experimentos posteriores. O gráfico demonstra discreta oscilação mediante o aumento da concentração da Marinobufagenina, o que nos leva a inferir que a amostra não apresenta comportamento concentração dependente. Logo, as concentrações selecionadas foram a  $CI_{50}$  ( $0,75 \mu M$ ), a metade da  $CI_{50}$  ( $0,375 \mu M$ ) e o dobro da mesma, ( $1,5 \mu M$ ) para todos os ensaios posteriores ao MTT.

**Figura 10.** Perfil antiproliferativo da Marinobufagenina frente à linhagem PC3 após 24 horas de tratamento determinado pelo método MTT.



#### 4.2 Avaliação do efeito da Marinobufagenina sobre a viabilidade celular frente à linhagem PC3- Exclusão do corante azul de Trypan e Citometria de fluxo

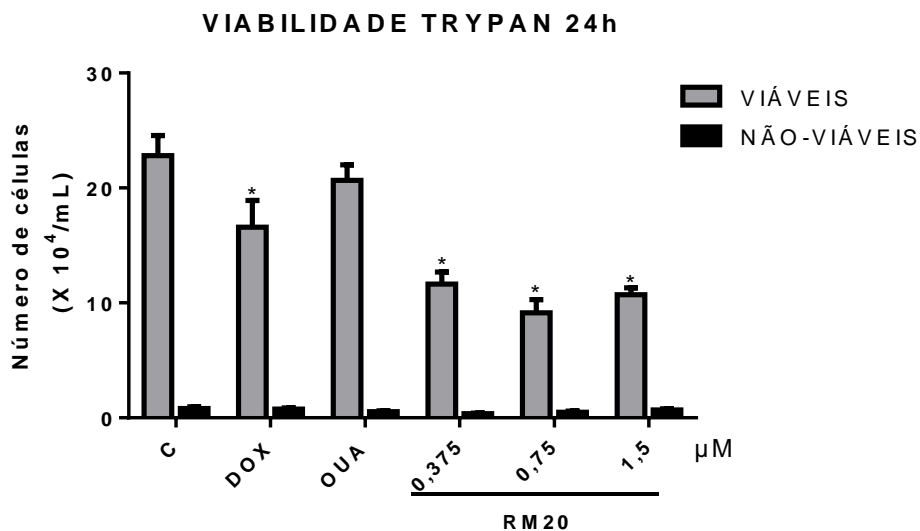
O ensaio da exclusão do azul de Trypan foi realizado no intuito de observar a ação da Marinobufagenina sobre as células de adenocarcinoma de próstata (PC3) após 24 horas de incubação.

A **Figura 11** mostra o efeito da Marinobufagenina sobre a inibição do crescimento e morte celular. Nas três concentrações utilizadas, observou-se uma diminuição estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ) do número de células em relação ao controle negativo (cerca de 50%, já desde a menor concentração), o que evidencia o potencial antiproliferativo da amostra teste e reforça os achados sobre

citotoxicidade observados no método do MTT. Mediante os três tratamentos, o número de células foi inibido semelhantemente, o que reforça o dado exposto no experimento anterior.

Em relação ao controle positivo, foi utilizada a doxorrubicina, um antineoplásico já comumente utilizado na prática clínica, inclusive no tratamento de câncer de próstata. A doxorrubicina, na concentração de 0,22  $\mu\text{M}$ , demonstrou potencial citotóxico significativo em relação ao controle negativo, dado observado na **Figura 11**.

**Figura 11.** Efeito da Marinobufagenina na viabilidade de PC3 determinado pelo ensaio por exclusão de azul de Trypan após 24 horas de tratamento.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas.

A doxorrubicina 0,22  $\mu\text{M}$  (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Ouabaína 0,27 Mm (OUA) foi utilizada como padrão de comparação de inibidor de (Na/K)-ATPase.

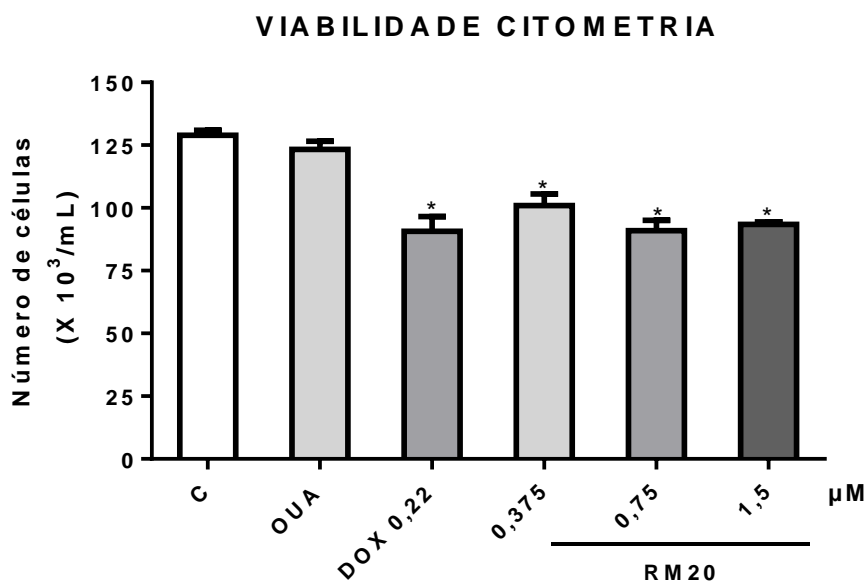
A marinobufegenina (RM20) foi utilizada na concentrações 0,37, 0,75 e 1,5  $\mu\text{M}$ .

Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M de três experimentos independentes. \* $p < 0,001$ ; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman Keulls

A viabilidade também foi estipulada por citometria de fluxo, através da quantificação da densidade celular. Observando-se a **Figura 12**, o controle positivo, Ouabaína mais uma vez não demonstrou diminuição considerável do número de células, o que corrobora com os achados no ensaio do azul de Trypan **Figura 11**. A Doxorrubicina foi utilizada como um segundo controle positivo na concentração de 0,22  $\mu\text{M}$  e inibição da viabilidade celular significativa em relação ao controle

negativo. Novamente observou-se uma diminuição significativa do número de células de todos os tratamentos estabelecidos para a Marinobufagenina em relação ao controle negativo. Comparando-se a Doxorubicina, a Marinobufagenina obteve percentuais de inibição tão significantes quanto o controle positivo.

**Figura 12.** Efeito da Marinobufagenina sobre a proliferação celular das células PC3, avaliado por densidade celular, determinada por citometria de fluxo.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas.

A doxorubicina 0,22  $\mu\text{M}$  (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Ouabaína 0,27 Mm (OUA) foi utilizada como padrão de comparação de inibidor de (Na/K)-ATPase.

A marinobufagenina (RM20) foi utilizada na concentrações 0,37, 0,75 e 1,5  $\mu\text{M}$ .

Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M de três experimentos independentes. \*p < 0,001; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman Keulls

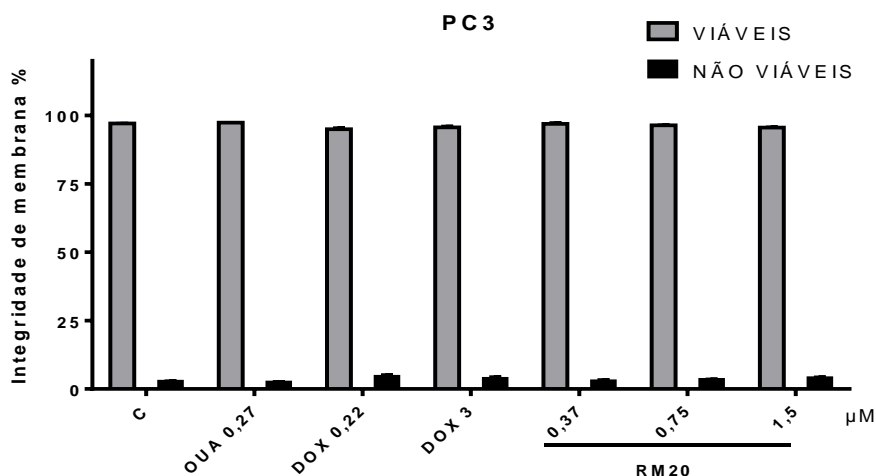
#### **4.3 Avaliação da integridade da membrana e do ciclo celular de células PC3 tratadas com Marinobufagenina por citometria de fluxo**

Para dar início aos estudos do mecanismo de ação da Marinobufagenina, utilizou-se a técnica de citometria de fluxo e através dela observamos os índices de integridade de membrana, o ciclo celular e a ligação a anexina + 7 AAD.

A integridade de membrana é verificada a partir do contato das amostras com o iodeto de propídeo, um corante hidrossolúvel. Através deste contato, se houverem células com membrana não íntegra, o reagente ingressa na célula e associa-se ao núcleo, fluorescendo e tornando a célula de membrana não íntegra detectável ao citômetro, este princípio as diferencia das células de membrana íntegra.

Analisando-se o gráfico presente na **Figura 13**, vê-se que, em um período de incubação de 24 horas, nenhum dos controles positivos (Ouabaína 0,27 $\mu$ M, doxorrubicina 2 e 3  $\mu$ M) apresentou significativa redução do número de células com membrana íntegra em relação ao controle negativo. A Marinobufagenina seguiu o mesmo padrão em todas as concentrações testadas, mantendo uma média de 96,3% do índice de células com membrana íntegra, enquanto no controle negativo, o valor foi de 97,1%.

**Figura 13.** Efeito da Marinobufagenina sobre a proliferação das células PC3, avaliado pela integridade de membrana, determinada por citometria de fluxo.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas.

A doxorrubicina 0,22 e 3,0  $\mu$ M (DOX) foram utilizadas como controle positivo.

Ouabaína 0,27 Mm (OUA) foi utilizada como padrão de comparação de inibidor de (Na/K)-ATPase.

A marinobufegenina (RM20) foi utilizada na concentrações 0,37, 0,75 e 1,5  $\mu$ M.

Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M de três experimentos independentes.

Comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman Keulls

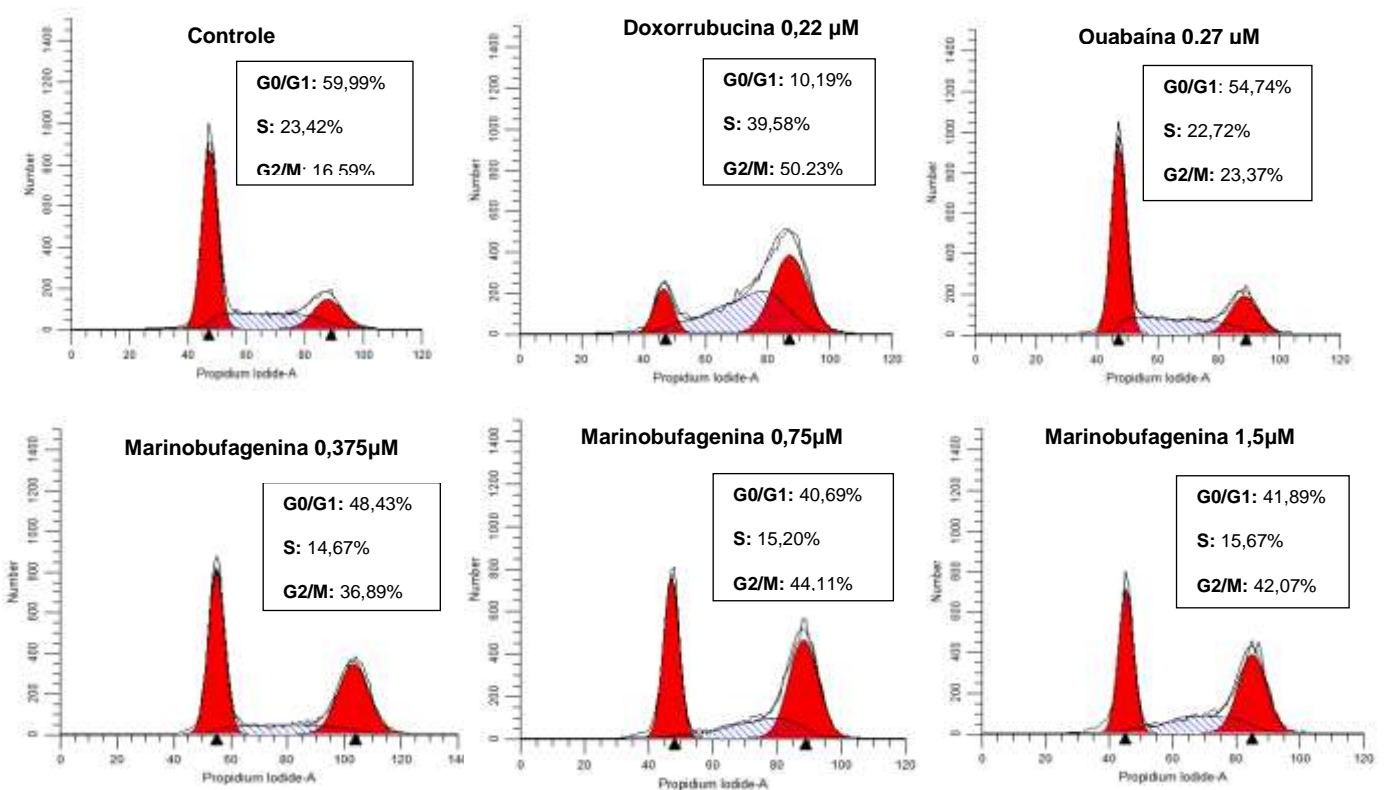
#### 4.4 Análise do efeito da marinobufagenina sobre o ciclo celular de células PC3

Ainda através da citometria de fluxo, foi analisado o ciclo celular de células de adenocarcinoma prostático (PC3), após a incubação com os controles negativo (tratado com DMSO), positivo (Ouabaína 0,27  $\mu\text{M}$  e doxorubicina 0,22  $\mu\text{M}$ ) e as concentrações de 0,375, 0,75 e 1,5  $\mu\text{M}$  da Marinobufagenina.

De acordo com o gráfico gerado (**Figura 14**), observamos que a maior parte das células do controle negativo se encontram em  $G_0/G_1$ . Comparando-as aos controles positivos, observa-se uma modificação em relação à doxorubicina 0,22  $\mu\text{M}$ , que demonstrou significativa diminuição de  $G_0/G_1$ , e relevante aumento do número de células nas fases S e  $G_2/M$ . A Ouabaína, ainda que sutilmente, demonstrou diferenças significativas em relação ao controle negativo, tendo diminuição do número de células em  $G_0/G_1$  e aumento nas fases S e  $G_2/M$ .

Os gráficos relativos à Marinobufagenina mostram, desde a menor concentração, uma tendência ao acúmulo de células paradas em  $G_2/M$  em relação ao controle negativo. Nesta concentração, o número de células nesta fase do ciclo praticamente dobra quando comparadas aos achados no controle negativo. Na C150 e na maior concentração, a quantidade de células em  $G_2/M$  continua aumentando.

**Figura 17.** Efeito da Marinobufegenina sobre as fases do ciclo celular.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas.

A doxorubicina 0,22 µM (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Ouabaína 0,27 Mm (OUA) foi utilizada como padrão de comparação de inibidor de (Na/K)-ATPase.

A marinobufegenina (RM20) foi utilizada na concentrações 0,37, 0,75 e 1,5 µM.

Os gráficos apresentados foram obtidos utilizando o programa ModFit LT. \*,  $p < 0.05$ , comparado com o controle por ANOVA seguido de teste Newman Keuls.

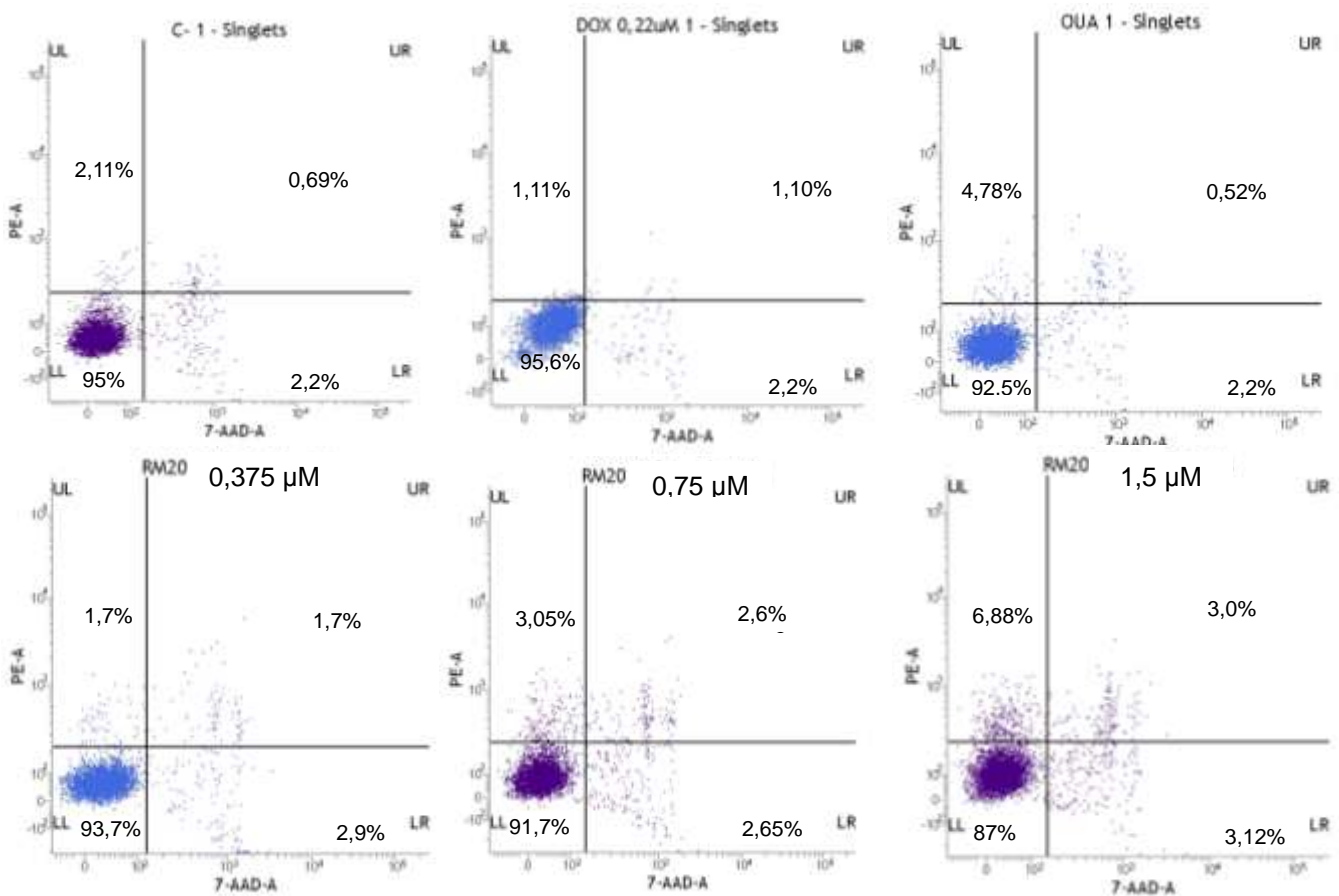
\*Ilustração de uma replicata representativa de cada experimento.

#### 4.5 Avaliação de morte celular por externalização da fosfatidilserina

Um método utilizado para a avaliação de morte celular é a indentificação da externalização da fosfatidilserina. Este evento é uma das primeiras alterações que ocorrem na via de morte celular apoptótica. A fim de analisar um possível envolvimento do mecanismo de morte celular por apoptose no mecanismo de ação da marinobufagenina, a externalização da fosfatidilserina foi avaliada por citometria de fluxo após 24 horas de tratamento nas concentrações de 0,375, 0,75 e 1,5  $\mu\text{M}$  (**Figura 15**). A doxorubicina 0,22  $\mu\text{M}$  foi utilizada como controle positivo e a ouabaína 0,27  $\mu\text{M}$  como padrão de comparação para inibidores da (Na/K)-ATPase.

Os resultados foram analisados e, como observado na **figura 16**, comparando-se ao controle, graficamente está demonstrado que houve uma diminuição do número de células viáveis no tratamento com a marinobufagenina 0,6  $\mu\text{M}$  e um aumento discreto, porém significativo ( $p < 0,05$ ) nos índices de apoptose tardia na  $\text{Cl}_{50}$  e no dobro da mesma, em relação ao controle negativo. Nestas duas concentrações, também foi observada uma elevação de debris celular. No controle positivo, doxorubicina 0,22  $\mu\text{M}$ , registrou-se um aumento significativo de células em apoptose inicial. A ouabaína não demonstrou significativas diferenças em relação ao controle negativo na concentração e período de incubação utilizados.

**Figura 19.** Representação gráfica do efeito do composto marinobufagenina sobre a externalização da fosfatidilserina em células de adenocarcinoma prostático (PC3) determinado por citometria de fluxo



Utilizou-se Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação.

O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas.

A doxorubicina 0,22 μM (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Ouabaína 0,27 Mm (OUA) foi utilizada como padrão de comparação de inibidor de (Na/K)-ATPase.

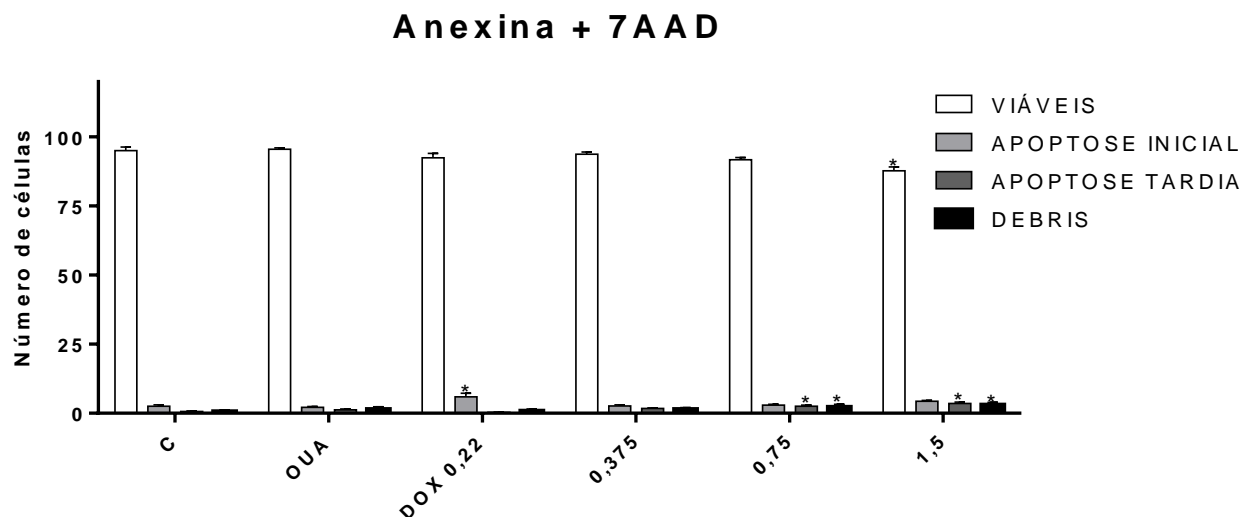
A marinobufagenina (RM20) foi utilizada na concentrações 0,37, 0,75 e 1,5 μM.

Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes.

Cinco mil eventos foram contados em cada experimento.

\*p<0,05; A análise dos dados foi realizada comparando com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman Keulls.

**Figura 20.** Efeito do composto marinobufagenina sobre a externalização da fosfatidilserina em células de adenocarcinoma de próstata (PC3), determinado por citometria de fluxo.



Utilizou-se Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação.

O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas.

Ouabaína (0,27  $\mu$ M) e doxorubicina (0,22  $\mu$ M) foram utilizadas como controles positivos.

Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes.

Cinco mil eventos foram contados em cada experimento.

\*  $p < 0,05$ ; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman Keulls.

#### 4.6 Avaliação da ação da Marinobufagenina sobre a proliferação, viabilidade e alterações morfológicas em células PC3 por xCELLigence

A fim de avaliar o comportamento cinético das células submetidas ao tratamento com o bufadienolídeo marinobufagenina, utilizou-se a metodologia do xCELLigence, cujo princípio consiste em avaliar o padrão de crescimento da linhagem e como o contato prolongado entre a amostra e a célula afeta esse padrão.

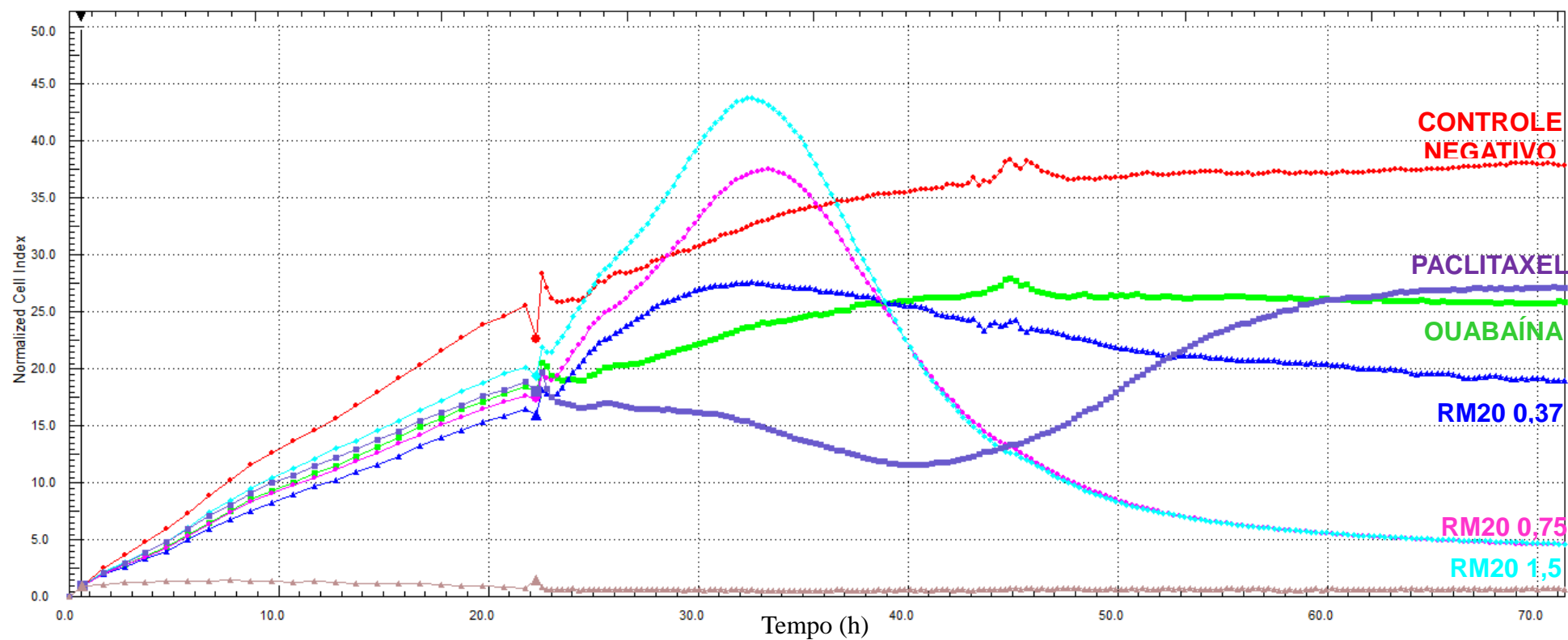
Para este ensaio foram utilizados 16 poços, 15 deles com células da linhagem PC3, enquanto um deles possuía apenas meio completo utilizado normalmente para o plaqueamento das células. Ao controle negativo foi acrescentado DMSO, o veículo utilizado para solubilizar as amostras. As amostras selecionadas para o teste foram diluídas em RPMI, para evitar uma concentração elevada de DMSO no poço.

Foram utilizados como controles positivos a Ouabaína 0,27  $\mu\text{M}$ , e taxol 0,10  $\mu\text{M}$ , um fármaco citostático já utilizado na prática clínica. As células foram tratadas com Marinobufagenina (RM20) nas concentrações de 0,375, 0,75 e 1,5  $\mu\text{M}$ .

De acordo com o gráfico representado na **Figura 17**, em relação ao controle negativo, percebe-se que nas células tratadas com Ouabaína houve um declínio do número de células. Já as células submetidas ao tratamento com taxol apresentaram parada na proliferação celular, já a partir das primeiras horas de incubação, quando comparadas ao controle negativo.

A Marinobufagenina apresentou um comportamento diferenciado das células do controle negativo e positivo, percebido a partir do desenho gráfico. Em todas as concentrações testadas, as células tratadas com o bufadienolídeo apresentaram pico no gráfico no período de incubação de 6 a 10 horas, o que foi associado a um provável aumento em seu volume ou severas modificações no seu padrão morfológico. Logo após esse período, as células sofreram um brusco declínio em seu índice.

Figura 17. Avaliação da ação da Marinobufagenina sobre a proliferação, viabilidade e alterações morfológicas em células PC3 por xCELLigence



Controle Negativo- meio + veículo de dissolução das substâncias (DMSO)

Paclitaxel 0,1 µM

Ouabaína 0,27 µM

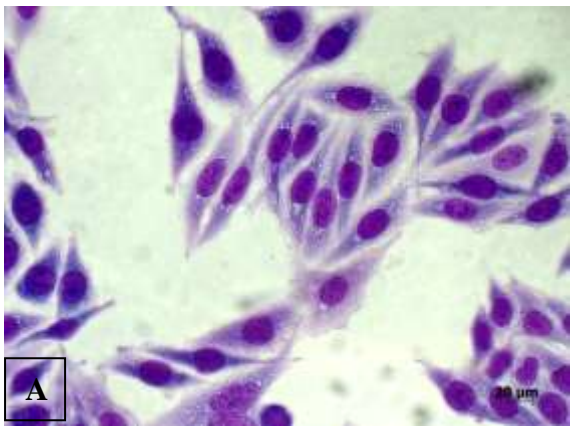
Marinobufagenina (RM20) 0,37, 0,75 E 1,5 µM

#### **4.7 Avaliação do efeito da Marinobufagenina em células PC3 sobre a morfologia e citoesqueleto celular por corante panótico e microscopia confocal**

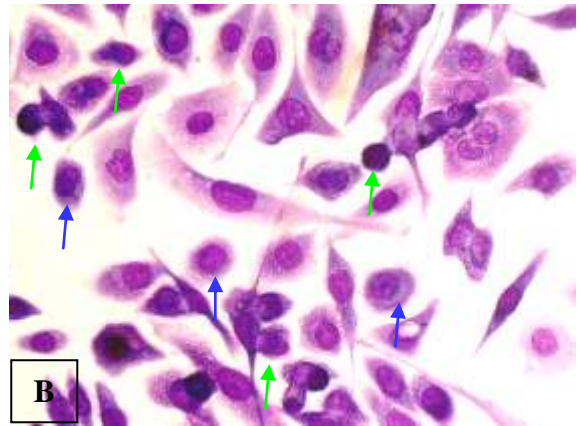
A linhagem PC3 apresenta forma de fuso, ou seja, as células têm morfologia alongada e citoplasma ligeiramente granuloso, segundo o que foi observado nas lâminas do controle negativo (**Figura 18-A**). Em células tratadas com ouabaína (**Figura 18-B**), utilizada na concentração de 0,27  $\mu\text{M}$ , observou-se poucas variações em relação ao controle negativo. As células que diferiam do controle apresentaram morfologia arredondada, algumas coradas apenas no núcleo, o que indica visualmente uma grande diminuição do citoplasma.

Nas células submetidas ao tratamento com a Marinobufagenina, na concentração 0,375  $\mu\text{M}$  (**Figura 18-C**), observou-se que uma quantidade significativa de células apresentava halos de coloração mais clara que o citoplasma ao redor do núcleo (halos perinucleares). Já nesta concentração pode-se observar a diferença da morfologia em relação ao controle negativo. As células já não mais apresentam o típico formato fusiforme e o volume citoplasmático já demonstra certa diminuição. Algumas células binucleadas também foram percebidas nestas lâminas, mas não se observou indícios de células em mitose. Já as células expostas às concentrações de 0,75 e 1,5  $\mu\text{M}$  (**Figura 18-D e E**). Percebeu-se evidente retração citoplasmática, em sua maioria, em praticamente todos os campos, característica que torna o núcleo bastante evidente. Também não foi observada presença de figuras mitóticas nas células visualizadas nos tratamentos com a  $\text{Cl}_{50}$  e o dobro. Ausência de fragmentação nuclear e de formação de corpos apoptóticos também deve ser ressaltada.

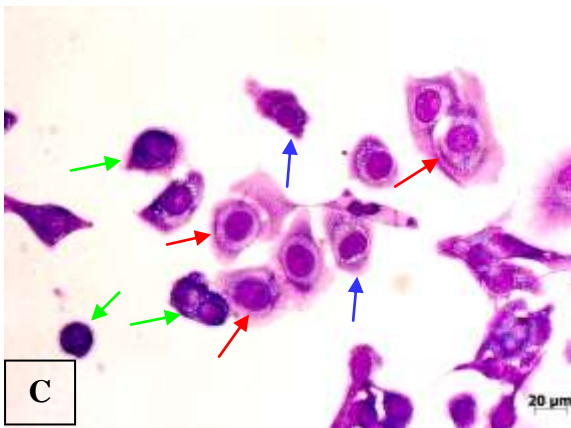
**Figura 18.** Efeito da marinobufagenina sobre a morfologia celular de células PC3.



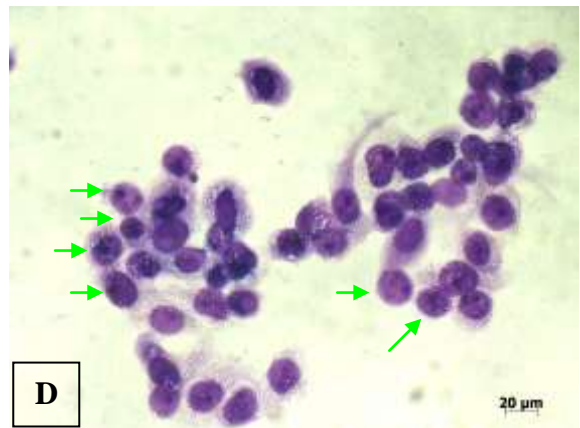
**A**  
Controle Negativo (DMSO)



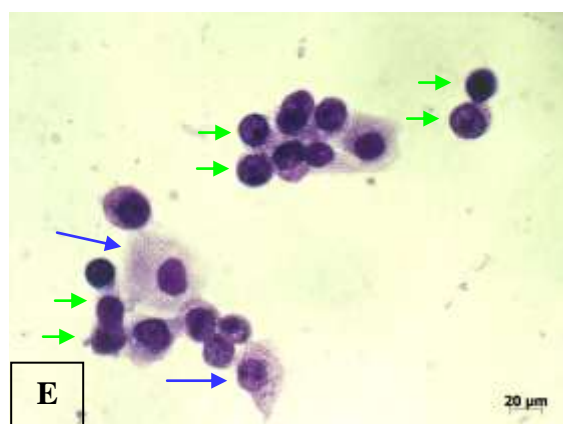
**B**  
Ouabáína 0,27 µM



**C**  
RM20 0,375 µM



**D**  
RM20 0,75 µM



**E**  
RM20 1,5 µM

Células com estrutura morfológica modificada/ Amorfos ( →);

Células com extensa retração citoplasmática ( →);

Células apresentando halo perinuclear ( →);

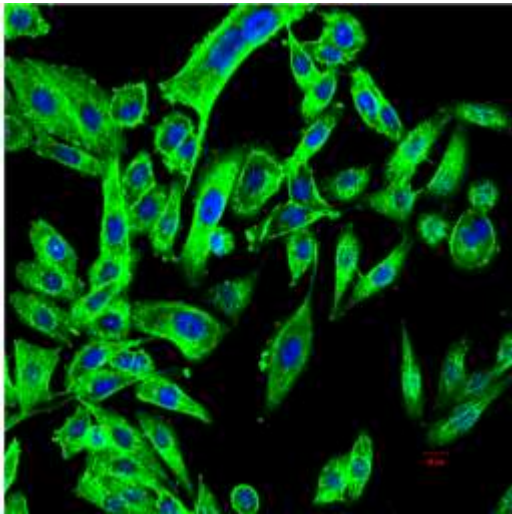
Posteriormente, ainda no intuito de realizar observações acerca da morfologia celular realizou-se a avaliação do citoesqueleto por microscopia confocal. Após um período de 24 horas as células foram incubadas com anticorpos específicos para marcação da actina e núcleo.

As células do controle negativo apresentaram-se alongadas, sua cromatina nuclear bem espalhada, e a actina homogeneamente distribuída ao longo do seu comprimento. Observaram-se algumas células em divisão. Nas células tratadas com controle positivo, taxol, observou-se a presença de células arredondadas, que provavelmente estavam iniciando o processo de divisão, porém sem êxito, uma vez que a amostra possui comportamento antiproliferativo e citostático, tendo em seu ciclo um acúmulo de células em G2/M. Percebeu-se uma modificação na distribuição da cromatina nuclear, que se encontrava bastante heterogênea (**Figura 19**).

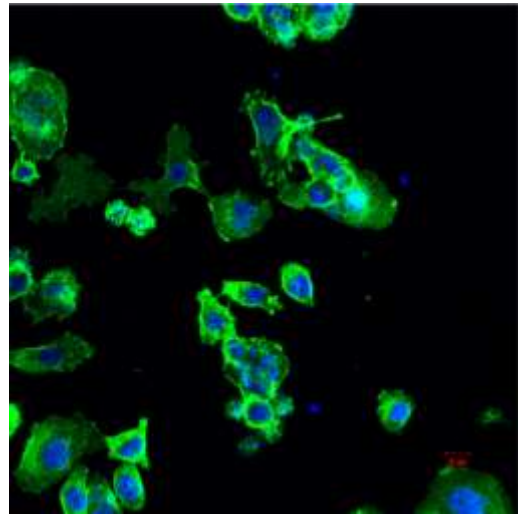
No também controle positivo, ouabaína, observou-se figuras homogeneamente divididas entre células semelhantes às encontradas no controle negativo, e células de morfologia circular e de citoplasma bastante escasso.

Das células tratadas com a Marinobufagina (ou RM20), a maior parte manifestou características morfológicas arredondadas com elevada retração citoplasmática e algumas evidenciaram pontos concentrados de actina em ambas as concentrações (0,375, 0,75 e 1,5  $\mu\text{m}$ ) as quais as células foram expostas. Nenhuma célula em mitose foi vista.

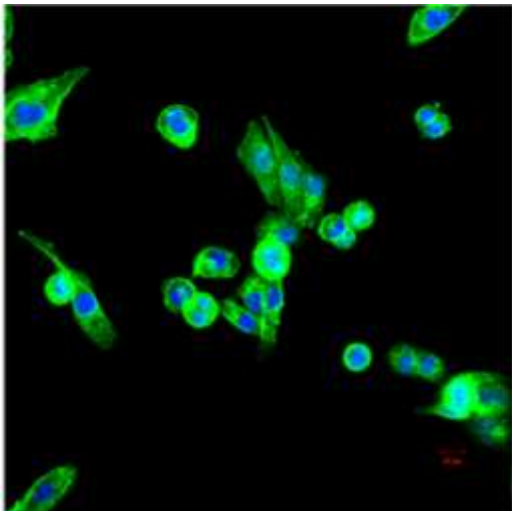
**Figura 19.** Efeito da marinobufagenina sobre o citoesqueleto celular de PC3 em cultura; evidenciados pela marcação de actina e núcleo.



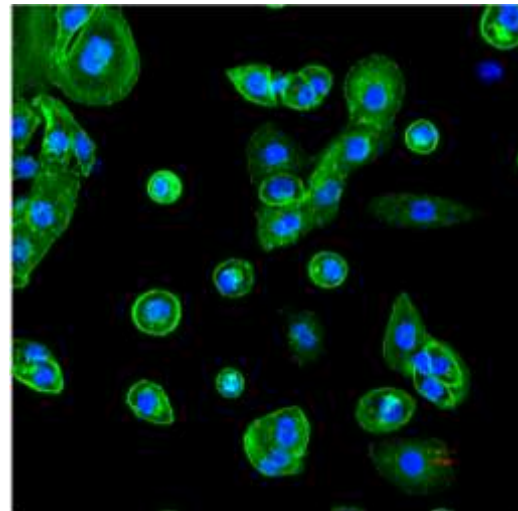
**Controle Negativo (DMSO)**



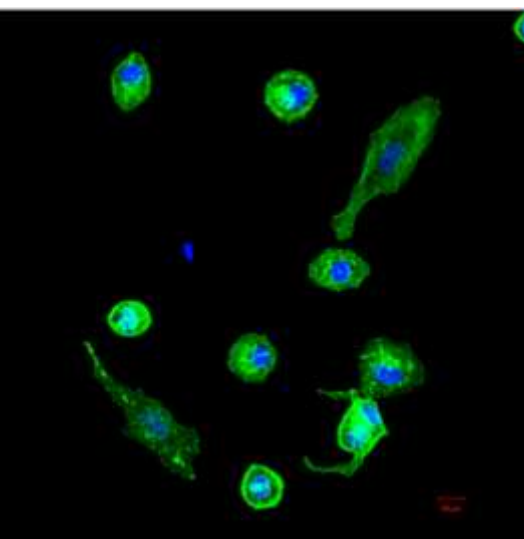
**Taxol 100 nM**



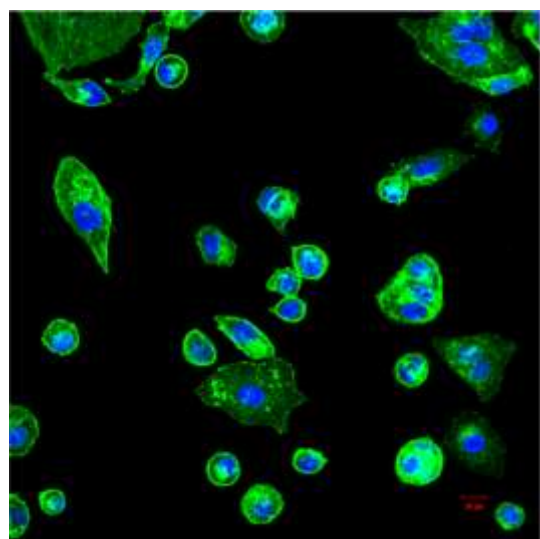
**Ouabaína 0,27 µM**



**RM20 0,375 µM**



**RM20 0,75 µM**



**RM20 1,5 µM**

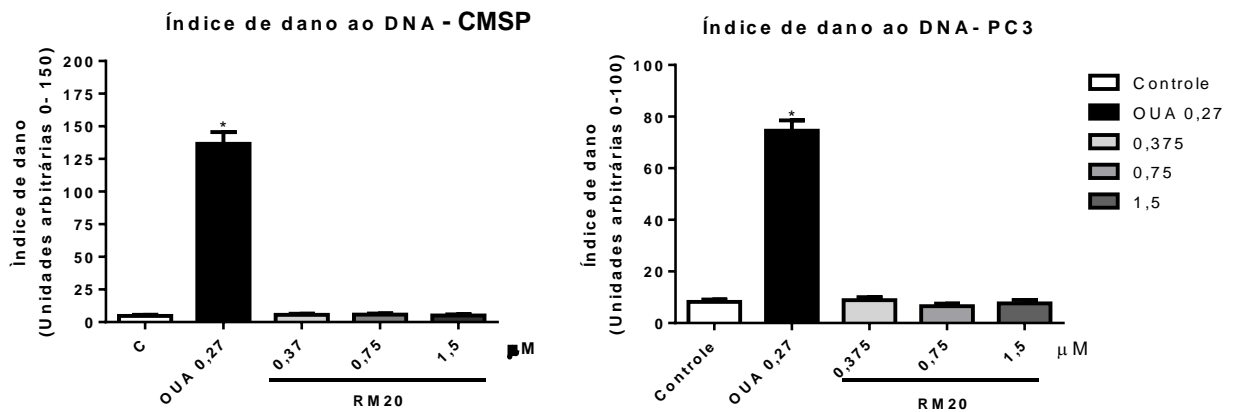
Corantes utilizados: actina (Phalloidin/ Alexa 488); núcleo (DAPI).

#### 4.8 Avaliação do potencial genotóxico da marinobufagenina sobre o DNA de células PC3 através do ensaio alcalino do cometa

A avaliação do potencial genotóxico em CMSP, tratadas com o composto marinobufagenina, foi realizada pelo ensaio do cometa em condições alcalinas.

A **figura 20** mostra que o composto testado não foi capaz de induzir dano à fita de DNA, portanto não foi genotóxico em CMSP. Já a ouabaína 0,27  $\mu\text{M}$  induziu danos significativos ( $p < 0,001$ ) à molécula de DNA representados pela média do índice de dano: 136,58 (CMSP).

**Figura 20.** Efeito da amostra marinobufagenina sobre a indução de dano ao DNA em CMSP e PC3, após 24 horas de incubação.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas.

Ouabaína (0,27  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo.

A marinobufagenina (RM20) foi utilizada nas concentrações 0,37, 0,75 e 1,5  $\mu\text{M}$ .

Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M de três experimentos independentes. \* $p < 0,001$ ; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman Keulls.

## 5. DISCUSSÃO

Os glicosídeos cardíacos constituem uma classe de compostos isolados de plantas e animais. Estudadas há alguns anos, estas moléculas vem ocupando importante papel no tratamento da insuficiência cardíaca. Embora venham sendo utilizadas apenas para este fim, tem-se observado outras propriedades inerentes a estes compostos, como seus efeitos citotóxicos. Seu mecanismo de ação tem-se mostrado bastante complexo, mas sabe-se que existe uma participação importante da bomba ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase neste efeito. Além disso, alguns glicosídeos cardíacos endógenos como a Marinobufagenina, Ouabaína e Digoxina são encontrados naturalmente no organismo humano, em alguns casos, em estados patológicos (BABULA et al., 2013).

Contudo, Xie e colaboradores (2013) afirmam que as propriedades anticâncer dos glicosídeos cardíacos com leves ou mesmo nenhum efeito colateral, podem estar associadas ao alto número de bombas de sódio e potássio ATPase expressas em linhagens tumorais.

Na década de 80, Goldin e colaboradores realizaram um estudo no qual foram acompanhados 127 pacientes oncológicos. Destes, alguns recebiam digitálicos devido à condições cardíacas e outros não. Após quatro anos sendo acompanhados pelos pesquisadores, observou-se que os pacientes tratados com digitálicos apresentaram menores índices de mortalidade por câncer que os não tratados. Além disso, outro grupo de pesquisa analisou os mesmos pacientes vinte anos após o acompanhamento de Goldin e o mesmo concluiu que, a longo prazo, os pacientes tratados com digitálicos continuaram apresentando menor índice de mortalidade comparando-se aos não tratados, o que nos leva a inferir que estes compostos possuem uma atividade anticancerígena (A ELBAZ et al., 2012).

A bomba de Na/K-ATPase faz parte da família ATPase do tipo-P e foi identificada como uma bomba de íons transdutora de energia. Ela mantém a homeostase iônica em células animais através do transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana celular (SKOU, 1965; LINGREL et al., 1990). Esta bomba exibe também outras importantes funções fisiológicas. Duran e colaboradores (2007), por exemplo, afirmam que a (Na/K)-ATPase é uma enzima essencial à próstata, devido a seu papel essencial na produção do citrato, um importante constituinte do fluido seminal.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial citotóxico do bufodienolídeo Marinobufagenina em um painel de linhagens tumorais, bem como determinar o possível mecanismo de ação desta toxicidade, particularmente em células de adenocarcinoma prostático humano (PC3).

Os esteroides cardiotônicos compreendem duas classes químicas: cardenolídeos (ex: ouabaína) e os bufadienolídeos (ex: marinobufagenina) (SCHONER, 2008; TIAN et al., 2009).

Bufonidae é uma família de sapos composta por aproximadamente 471 espécies em 33 gêneros (PRAMUK, 2006). Extratos extraídos de venenos de sapos das espécies *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* testados anteriormente por Ferreira et al. (2013) predisseram a interessante atividade antiproliferativa de compostos isolados dos mesmos venenos. Nove extratos foram testados em quatro tipos celulares tumorais diferentes (HL-60, HCT-116, OVCAR-8 e SF-295) e pelo menos cinco deles demonstraram atividade anticâncer bastante promissora, incluindo elevados índices de seletividade quando comparada sua atividade em células normais (FERREIRA et al.; 2013).

Outros estudos de avaliação do padrão citotóxico mostraram que todos os bufadienolídeos naturais e seus derivados exibiram moderada a forte atividade contra as linhagens tumorais humanas HL-60, SF-295, MDA-MB-435, HCT-8 sem demonstrar capacidade hemolítica (PUSCHETT; AQUANNE; UDDIN, 2010).

Por pertencer a uma classe de semelhante ação ao bufadienolídeo, a ouabaína foi selecionada como controle positivo para efeitos de comparação em todos os experimentos realizados. Esta molécula é extensamente estudada e sabe-se que ela age através da inibição específica da atividade catalítica e transporte iônico da bomba de (Na, K)-ATPase, por meio da interação com uma fenda na superfície celular, que envolve uma variedade de grupos funcionais que se localizam na subunidade  $\alpha$  e em menor intensidade na subunidade  $\beta$  (CROYLE; WOO; LINGREL, 1997; CRAMBERT et al., 2004). Além disso, Tian e colaboradores (2009) observaram que a ouabaína aumenta a endocitose e a degradação da bomba de Na/K-ATPase em células de câncer de próstata DU145.

Outros estudos apresentam evidências de que a ouabaína induz dois tipos de ação anticâncer em células de adenocarcinoma independente de hormônios (PC3): baixas concentrações de ouabaína induzem o aumento da expressão de Par-4 (prostate apoptosis response 4) e sensibilizam as células aos efeitos

antiproliferativo/ citotóxico; enquanto altas concentrações de ouabaína induzem a modificações do potencial de membrana mitocondrial, a manutenção da produção de EROS e altos índices apoptose em células PC3 (HUANG et al, 2004).

Os dados relacionados à citotoxicidade corroboram os nossos achados sobre a Marinobufagenina, no MTT. A amostra, testada em seis linhagens tumorais humanas (MDAMB-435, HCT-8, K562, MCF7, HEPG2 e PC3) em um período de incubação de 72 horas, manteve um padrão de citotoxicidade similar aos resultados observados no estudo anteriormente realizado com os extratos.

A marinobufagenina (RM20) e ouabaína também foram submetidas ao ensaio do MTT em células da linhagem B16F10 (melanoma murino) e L929 (fibroblasto murino) para que fossem observadas as diferenças de seus comportamentos em comparação às células humanas. As bombas de (Na, K)-ATPase, presentes em células de roedores, demonstram afinidade drasticamente menor por glicosídeos cardíacos do que as presentes em células humanas (KATZ et al., 2010; BANULS et al., 2013), o que foi observado também em nossos estudos. Isso se dá devido ao fato de que existem duas mutações na subunidade  $\alpha$  das bombas de células murinas em comparação com as humanas (MIJATOVIC et al., 2007; BANULS et al., 2013).

Além disso, Yang et al. demonstraram que a ausência relativa da unidade  $\alpha 3$  na (Na, K)-ATPase em roedores também pode ser uma fator que colabora com a não responsividade destas células aos glicosídeos cardíacos. Por outro lado, Lin e colaboradores (2010) ressaltam a relevância da subunidade  $\alpha 1$  para o crescimento do tumor e sobrevivência da célula neoplásica. Esses dados corroboram com os resultados encontrados no experimento do MTT, nas linhagens murinas: ambas resistiram ao tratamento com o glicosídeo e com o bufadienolídeo.

Um equilíbrio entre os efeitos terapêutico e toxicológico de uma substância é um parâmetro importante para verificar a aplicabilidade farmacológica de um composto específico (MARQUES, 2012). A característica essencial de um candidato a fármaco anticâncer eficaz é a sua capacidade de matar (ou inibir a proliferação de células de câncer humano) em concentrações que não afetam significativamente as células não malignas humanas. Se a droga candidata não apresenta esse recurso, não é relevante se ela pode ou não matar células cancerosas em baixas concentrações. O motivo seria que a concentração de droga necessária para matar as células tumorais de pacientes com câncer também

destruiria as células normais e, portanto, seria letal para estes pacientes (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2014).

Soares (2013) realizou testes em uma série de bufadienolídeos, incluindo a marinobufagenina, em células mononucleadas do sangue periférico de indivíduos saudáveis, encontrando como  $CI_{50}$  em 72 horas de incubação 0,57 mM. Confrontando este resultado com nossos achados no MTT, no mesmo período de incubação, em células de adenocarcinoma de próstata (0,12  $\mu$ M), observamos que a amostra testada alcançou um índice de seletividade de cerca de 4,75 vezes.

Além disso, a amostra testada não causou dano à integridade da membrana celular, o que confirma os achados de Machado (2014), quando submeteu eritrócitos de camundongos a incubação com o bufadienolídeo e observou que o mesmo não causava hemólise, o que sugere que seu mecanismo de ação está relacionado à outra atividade que não a lise da membrana plasmática, o que é bastante favorável, uma vez que todas as células possuem membrana plasmática e este mecanismo implicaria em uma falta de seletividade em relação às células não tumorais.

Ainda explorando os efeitos do bufadienolídeo sobre células PC3, foi verificada sua influência sobre o padrão proliferativo, viabilidade e alterações morfológicas através do XCELLigence. A ouabaína 0,27  $\mu$ M apresentou comportamento antiproliferativo em relação ao controle negativo. O taxol apresentou o comportamento citostático esperado na concentração de 100 nM. Já a marinobufagenina apresentou, nas três concentrações testadas, uma elevação do índice celular, que alcança um pico em um período de incubação de 6 horas e após esse pico, inicia-se um declínio brusco (nas duas maiores concentrações), originando curvas íngremes, o que pode implicar em uma alteração do padrão de impedância das células, como por exemplo, aumento do volume celular ou outras alterações em sua morfologia.

A partir dos dados observados nos ensaios do MTT, exclusão do azul de Trypan e densidade celular podemos afirmar que os picos gerados no gráfico do XCELLigence não são indicativo de um comportamento proliferativo, mas sim de uma modificação na estrutura celular, uma vez que o gráfico formado é gerado também através dos dados relacionados ao padrão de adesão e movimentação celular. Logo, inferimos que as células exibem um comportamento em que seu volume é aumentado ou sua morfologia é profundamente alterada.

Corroborando os resultados acima descritos, alterações morfológicas foram observadas por Chen e colaboradores (2014) em células LN229, uma linhagem de glioblastoma, após a incubação com a ouabaína 1  $\mu\text{M}$ . Após um período de 3 a 6 horas, as células sofreram um aumento do volume e sua aparência tornou-se granulosa, o que, segundo o autor, indica um sinal de deterioração da membrana celular. Após 24 horas, esse tamanho regrediu, mesmo com as células ainda em contato com a amostra. Este mecanismo de diminuição do volume foi associado ao efluxo de  $\text{K}^+$  e confirmado a partir de outros testes realizados (CHEN, 2014).

Apesar de o transporte funcional da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  ter sido investigado extensivamente, evidências recentes sugerem que a bomba de sódio pode estar envolvida na indução da junção de células epiteliais e polaridade (RAJASEKARAN et al., 2001; RAJASEKARAN et al., 2003), motilidade celular (RAJASEKARAN et al., 2001), sinalização celular (XIE, 2003), dinâmica da actina (RAJASEKARAN et al., 2001; RAJASEKARAN et al., 2003) e câncer (RAJASEKARAN, 1999; RAJASEKARAN, 2003; ESPINEDA et al., 2003; ESPINEDA et al., 2004).

Em células renais e cardíacas de roedores, uma cascata de eventos ocorre seguida da interação com a ouabaína com uma pequena fração da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ . Após a inibição da bomba de  $\text{Na}^+$  pela ouabaína, a concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular aumenta, o que é seguido de um gradual aumento ou oscilação na concentração de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular. Esse aumento pode ser parte ou resultado desta cascata (HANSEN, 2003; ARNAIZ, 2014), esses fatos corroborariam os achados no experimento do XCELLigence, uma vez que foram observadas alterações na morfologia celular.

A nível celular, o aumento dos níveis de  $\text{Ca}^+$  desencadeia uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo a proliferação, morte e migração (Clapham, 2007). Portanto, não surpreende que a sinalização aberrante de cálcio induza a um amplo espectro de doenças metabólicas (MASUYAMA, 2014), degenerações neuronais (CHEN et al., 2011), imunidade (SHAW & FESKE, 2012) e malignidade (LAFERLA, 2002).

A importância da sinalização intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  em células em migração tem sido estudada. O uso de pequenas moléculas inibitórias e ativadores de canais de  $\text{Ca}^{++}$  sugerem que o  $\text{Ca}^{++}$  intracelular está por trás da migração de células, regulando tanto a sua adesão quanto retração (MANDEVILLE; GHOSH &

MAXFIELD, 1995).

O mecanismo inotrópico positivo dos glicosídeos cardíacos é interpretado como um aumento intracelular da concentração de  $\text{Na}^+$  em miócitos cardíacos devido à inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ . Este aumento da concentração de  $\text{Na}^+$  reduz a extrusão de  $\text{Ca}^{++}$  pelo permutador de  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{++}$ , levando a um aumento na concentração de cálcio citoplasmático. Através do sistema de actina/miosina, o  $\text{Ca}^{++}$  citoplasmático elevado provoca um aumento da força de contração do músculo cardíaco (HAVIV; KARLISH, 2013).

Logo, diante do exposto, e com base nos dados da literatura, distúrbios na bomba de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  podem causar modificações nas atividades de outras bombas presentes nas células, como a bomba de troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ . Dessa forma, um aumento de sódio intracelular provocaria um acréscimo na atividade desta bomba, fazendo com que ela expulsasse o sódio excedente e retivesse maior quantidade de  $\text{Ca}^{++}$  proveniente das trocas com o meio extracelular no interior da célula. Como consequência, a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular aumentaria e desencadearia vários eventos celulares, inclusive efeitos relacionados à migração e desorganização da actina, como observado nas células tratadas com o bufadienolídeo, nos experimentos relacionados à morfologia celular (XCELLigence, diferenciação núcleo/citoplasma por corante panótico e microscopia confocal).

O  $\text{Ca}^{++}$  também demonstra estar intimamente relacionado a vias de ação de alguns glicosídeos cardíacos. Experiências com roedores geneticamente modificados reforçam um papel central da isoforma  $\alpha_2$  na mediação do efeito inotrópico dos glicosídeos cardíacos e modulação preferencial de transientes de  $\text{Ca}^{++}$  e do  $\text{Ca}^{++}$  liberado pelo retículo sarcoplasmático em miócitos cardíacos, em comparação com  $\alpha_1$ . A digoxina, o principal glicosídeo cardíaco utilizado na clínica atualmente, apresenta uma estreita janela terapêutica devido à toxicidade causada pela sobrecarga de  $\text{Ca}^{++}$ . Essa sobrecarga, produzida pela inibição excessiva da  $(\text{Na}, \text{K})\text{-ATPase}$  em miócitos, leva à arritmia e é potencialmente letal. Assim, um glicosídeo cardíaco  $\alpha$ -específico poderia exercer o efeito inotrópico positivo, sem o efeito secundário indesejável da sobrecarga de  $\text{Ca}^{++}$  devido à alta inibição cardíaca de  $(\text{Na}, \text{K})\text{-ATPase}$ . Em adição a isso, pesquisas recentes mostram que a digoxina é um glicosídeo moderadamente  $\alpha_2$  seletivo (BAUMAN; DIDOMENICO; GALANTER, 2006).

A marinobufagenina é um glicosídeo cardíaco ligante de  $\alpha_1$  (FEDOROVA et al., 2001), o que o torna um bom candidato a futuros testes em relação a provável incidência reduzida dos efeitos cardiotoxícos. Ao contrário de alguns fármacos já bem estabelecidos na prática clínica como a doxorubicina, ciclofosfamida e trastuzumab, que apresentam elevado potencial cardiotoxíco (ADÃO et al., 2013).

Todas as células enfrentam uma grande quantidade de agressões ao DNA a partir de fontes endógenas, por exemplo, desaminação espontânea da citosina, erros de replicação e dano por radicais livres de oxigênio gerado como um produto do metabolismo normal e também a partir de fontes exógenas: UV, toxinas alimentares, hidrocarbonetos aromáticos, entre outros, isto soma um valor significativo que tem sido estimado em 10 000-40 000 rupturas dos filamentos de fita simples e até 50 rupturas dos filamentos de fita dupla por célula, por dia (VILENCHIK & KNUDSON, 2003).

Para evitar que esses danos se acumulem como mutações para a próxima geração, os organismos vivos desenvolveram uma rede complexa e cuidadosamente orquestrada de proteínas conhecidas como resposta ao dano ao DNA, que inclui sensores que detectam e sinalizam danos no DNA às proteínas à jusante que irão paralisar o ciclo celular dando tempo para o reparo ou iniciar as vias de morte celular (POEHLMANN & ROESSNER, 2010; CHEN et al., 2012).

Os checkpoints de dano ao DNA ocorrem ao longo do ciclo celular. O ponto de controle G1 é ativado pela sinalização de ATM a Chk2 e P53 entre outros alvos, previne a replicação do DNA danificado através do bloqueio da entrada na fase S (SHILOH, 2006). Se ocorrerem danos na fase durante a fase S ou o checkpoint em G1 for evadido, o checkpoint da fase S é ativado, bloqueando futura replicação. Danos remanescentes são detectados no checkpoint de G<sub>2</sub>, o qual previne a entrada das células na mitose (SMITH et al., 2010).

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos (CCS). Os produtos naturais ciclo-celular específicos são um importante grupo de agentes antineoplásicos que se referem a muitos fármacos utilizados na terapia clínica oncológica e que não são de origem sintética (ALMEIDA et al., 2005).

Dentre estes produtos, podemos citar os alcalóides vegetais, como os alcalóides da vinca (vimblastina e vincristina) que desempenham sua ação através da inibição do fuso mitótico ligando-se às proteínas microtubulares e,

conseqüentemente, interrompendo a divisão celular na metáfase; o taxol, que é um éster alcaloide que também exerce atividade sobre o fuso mitótico, dimerização da tubulina e estabilização dos microtúbulos protegendo-os da despolimerização, resultando no bloqueio da multiplicação celular, o que acarreta na perda da viabilidade celular (OLIVEIRA; ALVES, 2002) e as podofilotoxinas como o etoposídeo e tenoposídeo (derivados semissintéticos), que agem através do bloqueio das células em S e G<sub>2</sub> e inibição da enzima topoisomerase II, promovendo lesão do DNA (CHABNER; CALABRESI, 1995; SALMONM, 1998; ALMEIDA et al., 2005).

Bufadienólídeos tem demonstrado potencial para atuar sobre o ciclo celular (DENG et al., 2015). Dentre eles, podemos citar moléculas como a Cinobufacini, que causa parada de células MDA-MB-231 na fase S (MA et al., 2012), a bufalina, que interrompe o ciclo em células tumorais de ovário na transição G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (TAKAI et al., 2008), e a bufotalina, que causa interferência no ciclo em G<sub>2</sub>/M, em células HepG2/ADM (ZHANG et al., 1992).

No presente trabalho, a influência da marinobufagenina no ciclo celular de células PC3 também foi avaliada. Observou-se que a molécula possui características ciclo-específicas, uma vez que apresentou um significativo deslocamento de células para a fase G<sub>2</sub>/M em todas as concentrações testadas, em relação ao controle negativo.

Estudos semelhantes realizados em outros bufadienólídeos comprovam a ação de muitos deles na parada do ciclo celular na fase G<sub>2</sub> ou G<sub>2</sub>/M. Por exemplo, a arenobufagina, um agente intercalante do DNA em células de hepatocarcinoma (DENG et al., 2015); a bufalina, que desencadeia apoptose em células tumorais pancreáticas PANC-1 (LI et al., 2013) e a hellebrigenina, que também provoca morte por apoptose em células leucêmicas HL-60 (SOARES, 2013).

A transição de G<sub>2</sub> para M no ciclo celular pode ser bloqueada se o DNA se encontra danificado, assim prevenindo a mitose com cromossomos deteriorados após a replicação (TAYLOR; STARK, 2001). Baseado nesta informação e somando-se a ausência de figuras mitóticas em lâminas coradas por corante panótico como também nas imagens reproduzidas por microscopia confocal, inferimos que a parada no ciclo celular poderia estar ocorrendo apenas em G<sub>2</sub>, e não na mitose.

Segundo KUMMAR (2004), o ciclo celular para em um ponto onde a função de algum gene essencial está deficiente. Estudos realizados por Deng e

colaboradores (2015) com a arenobufagina demonstram que sua parada em G<sub>2</sub> está intimamente relacionada aos danos que ela causa ao DNA, o que foi confirmado através da realização do ensaio do cometa, utilizado geralmente para detectar quebra de fitas de DNA (única e dupla) (KING *et al.*, 1993; CAVALCANTI *et al.*, 2006; SOARES, 2013). A partir destes dados, podemos inferir que a substância causa inativação de algum gene essencial nas células tumorais testadas. Ensaio posteriores levaram os autores a concluir que a via acessada foi ATM/ATR-Chk1/Chk2-Cdc25C.

Para alcançar uma maior compreensão em relação à parada em G<sub>2</sub>/M e para efeito de comparação com os estudos desenvolvidos com outros bufadienólídeos, a marinobufagenina foi submetida ao ensaio alcalino do cometa em células mononucleadas do sangue periférico e na linhagem PC3. Observou-se que na sua Cl<sub>50</sub> (0,75 µM), a marinobufagenina não foi capaz de causar lesão direta ao DNA em nenhum dos tipos celulares testados, ou seja, a amostra não induz a quebra de fitas do DNA, demonstrando índices semelhantes ao controle negativo; ao contrário da ouabaína, que demonstrou ser uma amostra genotóxica na concentração de 0,27 µM tanto em CMSP quanto na linhagem tumoral.

Apesar de a marinobufagenina ocasionar parada no ciclo em G<sub>2</sub>/M, ainda não é claro o mecanismo que resulta nesta parada. Outros estudos têm demonstrado que o bufadienólídeo bufalina (DOMINGUEZ *et al.*, 2001; PASTOR *et al.*, 2002; 2003; SOARES 2013) e hellebrigenina (SOARES, 2013) também não causam dano direto ao DNA.

Outras possibilidades de interação com o DNA seriam através da interação com as topoisomerasas, enzimas responsáveis pelo reparo ao DNA danificado (RAO, 2013). Estudos realizados com a hellebrigenina (SOARES, 2013) e com a bufalina (PASTOR *et al.*, 2002) sugerem sua atuação sobre a enzima catalítica topoisomerase II, o que poderia ser um alvo a ser estudado em relação a atividade da marinobufagenina.

A perda de controle do ciclo celular após a inativação do p53 contribui para a instabilidade genômica, que leva ao aparecimento e progressão de tumores (VOGELSTEIN, LANE & LEVINE, 2000). Quando superexpresso, p53 bloqueia o ciclo celular em G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (TAYLOR & STARK, 2001). As respostas do ciclo celular a danos no DNA são mais complexas quando ativadas por vias independentes do p53. Por exemplo, a perda de p53 elimina a parada em G<sub>1</sub> em resposta a danos no DNA,

mas as células sem p53 ainda param o ciclo rapidamente em G<sub>2</sub>, o que mostra que, mesmo que a p53 contribua com a parada em G<sub>2</sub>, em resposta a danos ao DNA, as vias independentes de p53 também desempenham um papel importante (KASTAN, 1991; PASSALARIS, 1999).

As células PC3 são hemizigóticas para o cromossomo 17p e sua única cópia do gene p53 tem uma deleção de pb no códon 138, que causa um defeito no códon de posição 169 (CARROLL et al., 1993). Como resultado, as células PC3 não expressam a proteína p53 (RUBIN et al., 1991).

Uma importante via independente de p53 em parada em G<sub>2</sub> é controlada pelas proteínas quinases ATM e ATR (RUDOLPH & LATT, 1989; CLIBY et al., 1998). ATM é mutada na síndrome da susceptibilidade tumoral de ataxia telangiectasia (SPACEY; GATTI; BEBB, 2000) e, juntamente com a ATR, fosforila e ativa as serina-quinases CHK1 e CHK2 (CHATURVEDI et al., 1999; LIU et al., 2000; MATSUOKA et al., 2000), que fosforilam a fosfatase CDC25, fazendo com que ela seja sequestrada no citoplasma ao se ligar a uma proteína da família 14-3-3 (FURNARI; RHIND; RUSSELL, 1997; KUMAGAI & DUNPHY, 1999; LOPEZ-GIRONA, et al., 1999; SANCHEZ et al., 1997). No citoplasma, CDC25 não pode desfosforilar CDK1, a CDK, que conduz as células de G<sub>2</sub> à mitose. A desfosforilação de CDK1 por CDC25 é normalmente necessária para a ativação de CDK1 na fronteira de G<sub>2</sub> para M (NURSE, 1990; PINES, 1995). Esta via também seria um ponto bastante interessante a ser estudado em relação a atuação da marinobufagenina no ciclo celular.

Quimioterápicos que interagem com o DNA são extensamente utilizados na prática clínica para as diversas neoplasias, o que comprova a enorme importância desta classe de fármacos e corrobora o grande interesse acadêmico e tecnológico no desenvolvimento de novos análogos mais eficientes e menos tóxicos. Adicionalmente, em vários casos, a seletividade e eficiência destes agentes antineoplásicos têm sido aumentadas por uso de mecanismos de liberação controlada ou de citoproteção (GABIZON; SHMEEDA; BARENHOLZ, 2003).

Evidências crescentes sugerem que os canais de iônicos e bombas estão envolvidos na regulação da proliferação e migração celular, e proteínas de canal têm demonstrado formar complexos macromoleculares com moléculas de adesão celular e outras proteínas de sinalização. Com a elucidação dos papéis dos canais iônicos e bombas sugere-se cada vez mais que sua regulação poderia contribuir para a

progressão do câncer. Sabendo que estas proteínas estão envolvidas em múltiplas características malignas de neoplasias malignas, vários canais iônicos e bombas seriam potenciais alvos para aplicação de novas terapias (LITAN; LANGHANS, 2015).

A externalização da fosfatidilserina (PS), presente na região interna da bicamada lipídica, é uma característica bioquímica relevante na detecção da apoptose (BRATON *et al.*, 1997). A utilização de anexina V, uma proteína recombinante que interage forte e especificamente com os resíduos de fosfatidilserina, pode ser usada na identificação deste tipo de morte celular (ARUR *et al.*, 2003).

A fim de avaliar o padrão de morte celular exercido pelo efeito da marinobufagenina, foi realizada, através de citometria de fluxo, a análise do padrão de morte celular com incubação de anexina + 7AAD. A doxorrubicina 0,22 foi utilizada como controle positivo. Essa metodologia é utilizada com o objetivo de caracterizar bioquimicamente a indução da apoptose. Percebeu-se que NAS concentrações testadas bem como neste período de incubação, apesar de haver um discreto aumento de células em apoptose tardia e debris, a apoptose não é a principal via de morte celular envolvida no efeito citotóxico da marinobufagenina, ao contrário dos estudos realizados com a hellebrigenina em HL-60 (SOARES, 2013), bufalina e cinobufagina em carcinoma hepatocelular (QI *et al.*, 2011).

Diante dos resultados apresentados e discutidos, observou-se o potencial antineoplásico importante da marinobufagenina. Esta molécula demonstrou um relevante potencial citotóxico e relativa seletividade para células tumorais, em comparação com células normais. Além disso, sua ação sobre o ciclo celular e características morfológicas são informações importantes para o início da elucidação do seu mecanismo de ação.

Investigações de relação com a topoisomerase, ação na via ATM/ATR, quantificação de cálcio, estudo da influência de sua ação sobre a expressão de canais ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase e perfil de morte celular seriam as nossas próximas diretrizes a serem exploradas futuramente. Além disso, estudos de proteômica seriam importantes no esclarecimento sobre os alvos moleculares envolvidos na ação da marinobufagenina, enquanto ensaios *in vivo* constituiriam importante ferramenta para demonstrar o efeito desta amostra em organismos complexos.

## 6. CONCLUSÃO

A marinobufagenina, um bufadienolídeo extraído de sapos da espécie *Rhinella marina*, possui potente atividade citotóxica em linhagens tumorais e demonstra ausência de atividade genotóxica em células normais e em adenocarcinoma de próstata (PC3). Esta molécula foi capaz de induzir parada na fase G<sub>2</sub> do ciclo celular e modificações no citoesqueleto de células da linhagem PC3, com ativação da via apoptótica da anexina a partir de 0,75 µM. Os achados do presente estudo nos fizeram compreender a importante citotoxicidade deste bufadienolídeo candidato a molécula anticâncer. Contudo, outros experimentos devem ser realizados no intuito de elucidar seu mecanismo de morte celular e potencial terapêutico.

## REFERÊNCIAS

ADÃO, Rui et al. Cardiotoxicidade associada à terapêutica oncológica: mecanismos fisiopatológicos e estratégias de prevenção. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.395-409, maio 2013.

A ELBAZ, Hosam et al. Digitoxin and its analogs as novel cancer therapeutics. **Exp Hematol Oncol**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-4, 2012. Springer Science + Business Media.

ALMEIDA, Vera Lúcia de et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, Belo Horizonte, v. 28, n. 1, p.118-129, 2005.

ANAZETTI, Maristella Conte et al. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, [s.l.], v. 188, n. 2-3, p.261-274, jun. 2003. Elsevier BV.

ARNAIZ, Georgina Rodríguez de Lores; ORDIERES, María Graciela López. Brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Activity In Aging and Disease. **Www.ijbs.org Int J Biomed Sci V OI . 10 N O . 2 June International Journal Of Biomedical Science**, Buenos Aires, v. 10, n. 2, p.85-102, jun. 2014.

ARUR, Swathi et al. Annexin I Is an Endogenous Ligand that Mediates Apoptotic Cell Engulfment. **Developmental Cell**, [s.l.], v. 4, n. 4, p.587-598, abr. 2003. Elsevier BV.

BABULA, Petr et al. From Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and Cardiac Glycosides to Cytotoxicity and Cancer Treatment. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 13, n. 7, p.1069-1087, 1 jul. 2013. Bentham Science Publishers Ltd..

BAGROV, A. Y. et al. Endogenous Cardiotonic Steroids and Differential Patterns of Sodium Pump Inhibition in NaCl-Loaded Salt-Sensitive and Normotensive Rats. **American Journal Of Hypertension**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.559-563, 1 maio 2009. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1038/ajh.2009.22.

BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I.; FEDOROVA, O. V.. Endogenous Cardiotonic Steroids: Physiology, Pharmacology, and Novel Therapeutic Targets. **Pharmacological Reviews**, [s.l.], v. 61, n. 1, p.9-38, 6 mar. 2009. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). OI: 10.1124/pr.108.000711.

BAGROV, Alexei y et al. Endogenous digitalis-like ligands of the sodium pump: possible involvement in mood control and ethanol addiction. **European Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.1-12, fev. 2002. Elsevier BV.

BANULS, Laetitia Moreno Y. et al. Structure–Activity Relationship Analysis of Bufadienolide-Induced in Vitro Growth Inhibitory Effects on Mouse and Human Cancer Cells. **J. Nat. Prod.**, [s.l.], v. 76, n. 6, p.1078-1084, 28 jun. 2013. American Chemical Society (ACS)

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Planejamento racional baseado no mecanismo de ação: fármacos inteligentes. In: **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 83-124.

BARTEK, Jiri; LUKAS, Jiri. **The DNA damage response in tumorigenesis and cancer treatment**. 2010. Disponível em: <[http://www.nature.com/nrc/posters/dnadamage/dna\\_poster.pdf](http://www.nature.com/nrc/posters/dnadamage/dna_poster.pdf)>.

BAUMAN, Jerry L; DIDOMENICO, Robert J; GALANTER, William L. Mechanisms, Manifestations, and Management of Digoxin Toxicity in the Modern Era. **American Journal Of Cardiovascular Drugs**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.77-86, 2006. Springer Science.

BRACKENBURY, William J.; DJAMGOZ, Mustafa B. A.. Activity-dependent regulation of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line. **The Journal Of Physiology**, [s.l.], v. 573, n. 2, p.343-356, 31 maio 2006. Wiley-Blackwell.

BRATTON, D. L. et al. Appearance of Phosphatidylserine on Apoptotic Cells Requires Calcium-mediated Nonspecific Flip-Flop and Is Enhanced by Loss of the Aminophospholipid Translocase. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 272, n. 42, p.26159-26165, 17 out. 1997. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).

BURTON, H. S.; ABRAHAM, E. P. Isolation of antibiotics from a species of cephalosporium. Cephalosporins P1, P2, P3, P4, and P5. *Biochemistry*, v. 50, p. 168-174, 1951.

CALDERÓN-MONTAÑO, José Manuel et al. Evaluating the Cancer Therapeutic Potential of Cardiac Glycosides. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2014, p.1-9, 2014. Hindawi Publishing Corporation.

CARROLL, A. G., VOELLER, H. J., SUGARS, L., AND GELMANN, E. P. p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate*, 23:123–134, 1993.

CAVALCANTI, B. C.; BEZERRA, D. P.; MAGALHÃES, H. I. F.; MORAES, M. O.; LIMA, A. S.; SILVEIRA, E. R.; CÂMARA, C. A. G.; V.S. RAO, PESSOA, C.; COSTALOTUFO, L. V. Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells, **J. Appl. Toxicol.** v. 29, p. 560-568, 2009.

CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. Em As Bases Farmacológicas da Terapêutica;

Goodman, L. S.; Gilman, A., eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, 1995, p. 903-949.

CHATURVEDI, Priya et al. Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. **Oncogene**, [s.l.], v. 18, n. 28, p.4047-4054, 30 jul. 1999. Nature Publishing Group.

CHEN, Dongdong et al. Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase induces hybrid cell death and enhanced sensitivity to chemotherapy in human glioblastoma cells. **Bmc Cancer**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.716-731, 2014. Springer Science + Business Media.

CHEN, Tao et al. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 17, n. 5-6, p.194-202, mar. 2012. Elsevier BV.

CHEN, Y.-f. et al. Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 108, n. 37, p.15225-15230, 29 ago. 2011. Proceedings of the National Academy of Sciences.

CHENG, Wei et al. Two new bufadienolides from the rhizomes of *Helleborus thibetanus* with inhibitory activities against prostate cancer cells. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 28, n. 12, p.901-908, 13 fev. 2014. Informa UK Limited. DOI: 10.1080/14786419.2014.891200.

CLAPHAM, David E.. Calcium Signaling. **Cell**, [s.l.], v. 131, n. 6, p.1047-1058, dez. 2007. Elsevier BV.

CLARKE, B. T.. THE NATURAL HISTORY OF AMPHIBIAN SKIN SECRETIONS, THEIR NORMAL FUNCTIONING AND POTENTIAL MEDICAL APPLICATIONS. **Biol. Rev.**, [s.l.], v. 72, n. 3, p.365-379, ago. 1997. Wiley-Blackwell.

CLIBY, W. A.. Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. **The Embo Journal**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.159-169, 1 jan. 1998. Wiley-Blackwell.

CLIFFORD, Brad et al. G2 Arrest in Response to Topoisomerase II Inhibitors: The Role of p53. **Cancer Research**, Cleveland, v. 63, p.4074-4081, 15 July 2003.

COSTA, Aline et al. Apoptotic effect of synthetic 2',4',5'-trimethoxychalcones in human K562 and Jurkat leukemia cells. **Medicinal Chemistry Research**, [s.l.], v. 23, n. 10, p.4301-4319, 1 abr. 2014. Springer Science + Business Media.

COSTA-LOTUFO, Leticia V. et al. The Contribution of Natural Products as Source of New Anticancer Drugs: Studies Carried Out at the National Experimental Oncology Laboratory from the Federal University of Ceará. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.47-58, 2010. GN1 Genesis Network.

COTRAN, Ramzi S.; KUMAR, Vinay; ROBBINS, Satanley L. 4. ed. Rio de Janeiro:

Guanabara Koogan S/A, 2005.

CRAMBERT, G. et al. Transport and Pharmacological Properties of Nine Different Human Na,K-ATPase Isozymes. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 275, n. 3, p.1976-1986, 21 jan. 2000. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).

CROYLE, Michelle L.; WOO, Alison L.; LINGREL, Jerry B.. Extensive Random Mutagenesis Analysis of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha Subunit Identifies Known and Previously Unidentified Amino Acid Residues that Alter Ouabain Sensitivity Implications for Ouabain Binding. **Eur J Biochem**, [s.l.], v. 248, n. 2, p.488-495, set. 1997. Wiley-Blackwell.

CUNHA-FILHO, Geraldino A. et al. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, [s.l.], v. 56, n. 3, p.339-348, set. 2010. Elsevier BV.

DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, n. 8, p. 795-808, 1992.

DENG, Li-juan et al. Arenobufagin intercalates with DNA leading to G2 cell cycle arrest via ATM/ATR pathway. **Oncotarget**,[s.l.], p.34258-34275, 26 out. 2015. Impact Journals, LLC.

DMITRIEVA, R. I. et al. Mammalian Bufadienolide Is Synthesized From Cholesterol in the Adrenal Cortex by a Pathway That Is Independent of Cholesterol Side-Chain Cleavage. **Hypertension**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.442-448, 1 set. 2000. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

Douglas R. Lowy. National Cancer Institute (Org.). **What is Cancer?** 2015. Disponível em: <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>

ESPINEDA, C. E.. Repression of Na,K-ATPase 1-Subunit by the Transcription Factor Snail in Carcinoma. **Molecular Biology Of The Cell**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.1364-1373, 29 dez. 2003. American Society for Cell Biology (ASCB).

ESPINEDA, Cromwell et al. Analysis of the Na,K-ATPase  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit expression profiles of bladder cancer using tissue microarrays. **Cancer**, [s.l.], v. 97, n. 8, p.1859-1868, 15 abr. 2003. Wiley-Blackwell.

FEDOROVA, O. V. et al. Marinobufagenin, an Endogenous  $\alpha$ -1 Sodium Pump Ligand, in Hypertensive Dahl Salt-Sensitive Rats. **Hypertension**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.462-466, 1 fev. 2001. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

FEDOROVA, Olga V et al. Interaction of Digibind with endogenous cardiotoxic steroids from preeclamptic placentae. **Journal Of Hypertension**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.361-366, 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

FENG, Jiaquan; ZHAO, Weimin. Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of four new oligosaccharides and two new glycosides from *Periploca forrestii*. **Magn. Reson. Chem.**, [s.l.], v. 47, n. 8, p.701-705, ago. 2009. Wiley-Blackwell.

FERREIRA, Paulo Michel Pinheiro et al. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon. **Toxicol**, [s.l.], v. 72, p.43-51, set. 2013. Elsevier BV.

FHEARRAIGH, Seán Mac; BRUCE, David. **The cell cycle is the coordinated division of a cell into two genetically identical daughter cells.**: Work over the past forty years has revealed the molecular components that control the eukaryotic cell cycle.

FOSTER, Irene. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.144-149, maio 2008. Elsevier BV.

FURNARI, B.. Cdc25 Mitotic Inducer Targeted by Chk1 DNA Damage Checkpoint Kinase. **Science**, [s.l.], v. 277, n. 5331, p.1495-1497, 5 set. 1997. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; BARENHOLZ, Y.; Clinic Pharmacokinetic **2003**, 42, 419; Koukourakis, M. I.; Anticancer Drugs **2002**, 13, 181

GAO, Huimin et al. Bufadienolides and their antitumor activity. **Nat. Prod. Rep.**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.953-969, 2011. Royal Society of Chemistry (RSC).

Hahn, W. C.; Weinberg, R. A.; Nat. Rev. Cancer **2002**, 2, 331.

HAHN, William C.. Cancer. **Cancer Cell**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.215-222, set. 2004. Elsevier BV.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert a.. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s.l.], v. 144, n. 5, p.646-674, mar. 2011. Elsevier BV.

HANSEN, Otto. No evidence for a role in signal-transduction of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase interaction with putative endogenous ouabain. **Eur J Biochem**, [s.l.], v. 270, n. 9, p.1916-1919, maio 2003. Wiley-Blackwell.

HAVIV, H.; KARLISH, S.j.d.. P-Type Pumps: Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. **Encyclopedia Of Biological Chemistry**, [s.l.], p.681-687, 2013. Elsevier BV.

HOCHEGGER, Helfrid; TAKEDA, Shunichi; HUNT, Tim. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?. **Nature Reviews Molecular Cell**

**Biology**, [s.l.], v. 9, n. 11, p.910-916, 24 set. 2008. Nature Publishing Group.

Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2012/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/)

HUANG, Yao-ting et al. Investigation of ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 67, n. 4, p.727-733, fev. 2004. Elsevier BV.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER(INCA) . **ESTIMATIVAS PARA 2016/2017: Incidência de Câncer no Brasil.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/sobre-as-estimativas.asp>. Acesso em: 12 dez.2015

JIAN-XIN, Cao et al. Two Novel Types of Cardiac Glycosides from *Parepigynum funingense* and the Possible Biogenesis. **Chinese Journal Of Chemistry**, [s.l.], v. 23, n. 7, p.905-912, jul. 2005. Wiley-Blackwell.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, José. *Biologia celular e molecular* 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S/A, 2000

KAELIN, William G. The Concept of Synthetic Lethality in the Context of Anticancer Therapy. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 5, n. 9, p.689-698, 19 ago. 2005. Nature Publishing Group.

KAELIN, William G. The Concept of Synthetic Lethality in the Context of Anticancer Therapy. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 5, n. 9, p.689-698, 19 ago. 2005. Nature Publishing Group.

KATZ, A. et al. Selectivity of Digitalis Glycosides for Isoforms of Human Na,K-ATPase. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 285, n. 25, p.19582-19592, 13 abr. 2010. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.74, p.151-170, 2002.

KING, Jeff S. et al. Noncomplementary DNA double-strand-break rejoining in bacterial and human cells. **Nucl. Acids Res.**, San Francisco, v. 21, n. 5, p.1055-1059, 1993.

KLOECKER, Goetz; KAYALI; JANJUA. Phase II trial of second-line erlotinib and digoxin for nonsmall cell lung cancer (NSCLC). **Open Access Journal Of Clinical Trials**, [s.l.], p.9-13, fev. 2011. Dove Medical Press Ltd..

KUMAGAI, Akiko; DUNPHY, William G.. Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. **Genes & Development**, California, v. 13, p.1067-1072, 1999.

KUMAR, Ashwani. **Natural drugs obtained from plants and animals are called drugs of biological origin and are produced in the living cells of plants or animals.** 2009. Disponível em: <[http://www.science20.com/humboldt\\_fellow\\_and\\_science/blog/natural\\_drugs\\_obtained\\_plants\\_and\\_animals\\_are\\_called\\_drugs\\_biological\\_origin\\_and\\_are\\_produced\\_l](http://www.science20.com/humboldt_fellow_and_science/blog/natural_drugs_obtained_plants_and_animals_are_called_drugs_biological_origin_and_are_produced_l)>.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; *ROBBINS & COTRAN – Pathology Basis of Disease*, 7a. ed., WB Saunders: China, **2004**

KUMMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C.: Robbins Patologia Básica. 9. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2013. 928 p.

LAFERLA, Frank M.. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 3, n. 11, p.862-872, nov. 2002. Nature Publishing Group.

LEE, In Hye; FINKEL, Toren. Metabolic regulation of the cell cycle. **Current Opinion In Cell Biology**, [s.l.], v. 25, n. 6, p.724-729, dez. 2013. Elsevier BV.

LI, Meiying et al. Bufalin exerts antitumor effects by inducing cell cycle arrest and triggering apoptosis in pancreatic cancer cells. **Tumor Biol.**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.2461-2471, 12 nov. 2013. Springer Science + Business Media

LIM, S.; KALDIS, P.. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, [s.l.], v. 140, n. 15, p.3079-3093, 16 jul. 2013. The Company of Biologists.

LINGREL, Jerry B. et al. Molecular Genetics of Na,K-ATPase. **Progress In Nucleic Acid Research And Molecular Biology**, [s.l.], p.37-89, 1990. Elsevier BV.

LITAN, Alisa; LANGHANS, Sigrid A.. Cancer as a channelopathy: ion channels and pumps in tumor development and progression. **Frontiers In Cellular Neuroscience**, [s.l.], v. 9, p.1-11, 17 mar. 2015. Frontiers Media SA.

LIU, Q., GUNTUKU, S., CUI, X. S., MATSUOKA, S., CORTEZ, D., TAMAI, K., LUO, G., CARATTINI-RIVERA, S., DEMAYO, F., BRADLEY, A., DONEHOWER, L. A., AND ELLEDGE, S. J. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2-M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.*, 14: 1448 –1459, 2000.

LOPATIN, Denis A. et al. Circulating bufodienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia. **Journal Of Hypertension**, [s.l.], v. 17, n. 8, p.1179-1187, 1999. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

LÓPEZ-LÁZARO, Miguel. Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. **Expert Opinion On Therapeutic Targets**, [s.l.], v. 11, n. 8, p.1043-1053, ago. 2007. Informa Healthcare. DOI: 10.1517/14728222.11.8.1043.

LÓPEZ-LÁZARO, Miguel. Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. **Expert Opinion On Therapeutic Targets**, [s.l.], v. 11, n. 8, p.1043-1053, ago. 2007. Informa Healthcare. DOI: 10.1517/14728222.11.8.1043.

LORD, Christopher J.; ASHWORTH, Alan. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, [s.l.], v. 481, n. 7381, p.287-294, 18 jan. 2012. Nature Publishing Group.

LUKAS, Daniel S.; MARTINO, Anthony G. de. Binding of digitoxin and some related cardenolides to human plasma proteins. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.1041-1053, 1 jun. 1969. American Society for Clinical Investigation.

LUKAS, Daniel S.; MARTINO, Anthony G. de. Binding of digitoxin and some related cardenolides to human plasma proteins. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.1041-1053, 1 jun. 1969. American Society for Clinical Investigation.

LUO, Ji; SOLIMINI, Nicole L.; ELLEDGE, Stephen J.. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, [s.l.], v. 136, n. 5, p.823-837, mar. 2009. Elsevier BV.

MA, Lina et al. Cinobufacini induced MDA-MB-231 cell apoptosis-associated cell cycle arrest and cytoskeleton function. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.1459-1463, fev. 2012. Elsevier BV.

MACHADO, Kátia da Conceição. **Potencial farmacêutico anticâncer de extratos e da molécula marinobufagina obtidos a partir de venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* da região Amazônica**. 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2014.

MAKAREVICH, I. F.; KOVALEV, S. V.. Cardiac glycosides from *Strophanthus kombe*. **Chemistry Of Natural Compounds**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.189-193, mar. 2006. Springer Science + Business Media.

MALUMBRES, Marcos; BARBACID, Mariano. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.153-166, mar. 2009. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/nrc2602.

MANDEVILLE, J.t.; GHOSH, R.n.; MAXFIELD, F.r.. Intracellular calcium levels correlate with speed and persistent forward motion in migrating

neutrophils. **Biophysical Journal**, [s.l.], v. 68, n. 4, p.1207-1217, abr. 1995. Elsevier BV.

MARQUES, Cybelle Teixeira et al . Sulfated fucans extracted from algae *Padina gymnospora* have anti-inflammatory effect. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba , v. 22, n. 1, p. 115-122, Fev. 2012 .

MASUYAMA, Ritsuko. Role of local vitamin D signaling and cellular calcium transport system in bone homeostasis. **J Bone Miner Metab**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.1-9, 9 nov. 2013. Springer Science + Business Media.

MATSUOKA, S. et al. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 97, n. 19, p.10389-10394, 5 set. 2000. Proceedings of the National Academy of Sciences.

MIJATOVIC, T.; DUFRASNE, F.; KISS, R.. Cardiotoxic Steroids-Mediated Targeting of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to Combat Chemoresistant Cancers. **Cmc**, [s.l.], v. 19, n. 5, p.627-646, 1 fev. 2012. Bentham Science Publishers Ltd..

MIJATOVIC, Tatjana et al. Cardiotoxic steroids on the road to anti-cancer therapy. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Reviews On Cancer**, [s.l.], v. 1776, n. 1, p.32-57, set. 2007. Elsevier BV.

MOIR, Robert D. et al. Review: The Dynamics of the Nuclear Lamins during the Cell Cycle— Relationship between Structure and Function. **Journal Of Structural Biology**, [s.l.], v. 129, n. 2-3, p.324-334, abr. 2000. Elsevier BV. DOI: 10.1006/jsbi.2000.4251.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI) 2015. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/researchandfunding/priorities/global-research-activities>>. Acesso em: 10/01/2016.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years **J. Nat. Prod.**, [s.l.], v. 70, n. 3, p.461-477, mar. 2007. American Chemical Society (ACS).

NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v.139, n.2, p.271-279, 1991.

NURSE, Paul. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. **Nature**, [s.l.], v. 344, n. 6266, p.503-508, 5 abr. 1990. Nature Publishing Group.

OLIVEIRA, Renata Barbosa de; ALVES, Ricardo José. AGENTES ANTINEOPLÁSICOS BIORREDUTÍVEIS: UMA NOVA ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DE TUMORES SÓLIDOS. **Química Nova**, Belo Horizonte, v. 25, n. 6, p.976-984, 2002. 25, No. 6, 976-984, 2002.

OLIVERA, B. M., CRUZ, L. J.; DE SANTOS, V.; LECHEMINANT, G. W.; GRIFFIN, D.; ZEIKUS, R.; MCINTOSH, J. M.; GALYEAN, R.; VARGA, J.; GRAY, W. R.; RIVIER, J. Neuronal calcium antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using toxin from *Conus magus* venom. **Biochemistry**, v. 26, p. 2086-2090, 1987.

PALMA, Carol Manzoli; PALMA, Mario Sergio. Bioprospecção no Brasil: análise crítica de alguns conceitos. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 64, n. 3, 2012 .

PASSALARIS, Tina M. et al. The G 2 Checkpoint Is Maintained by Redundant Pathways. **Molecular And Cellular Biology**,[s.l.], v. 19, n. 9, p.5872-5881, 1 set. 1999. American Society for Microbiology.

PASTOR N, CORTE´S F. Bufalin influences the repair of x-ray-induced DNA breaks in Chinese hamster cells. **DNA Repair (Amst)**. v. 2, p. 1353–1360, 2003.

PASTOR, Nuria et al. A comparative study of genotoxic effects of anti-topoisomerase II drugs ICRF-193 and bufalin in Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 515, n. 1-2, p.171-180, mar. 2002. Elsevier BV.

PATEL, Mrinali et al. Intra-arterial and Oral Digoxin Therapy for Retinoblastoma. **Ophthalmic Genetics**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.147-150, set. 2011. Informa UK Limited.

PATRICK, J. Shaw. Physiological and pathophysiological functions of SOCE in the immune system. **Frontiers In Bioscience**,[s.l.], v. 4, n. 6, p.2253-2268, 2012. Frontiers in Bioscience.

PENG, C. et al. Mitotic and G2 Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. **Science**, [s.l.], v. 277, n. 5331, p.1501-1505, 5 set. 1997. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

PERES, C. M.; CURI, R. **Como Cultivar Células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PINES, J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. **Biochem. J.**, [s.l.], v. 308, n. 3, p.697-711, 15 jun. 1995. Portland Press Ltd..

POEHLMANN, Angela; ROESSNER, Albert. Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. **Pathology - Research And Practice**, [s.l.], v. 206, n. 9, p.591-601, set. 2010. Elsevier BV.

PRAMUK, Jennifer B.. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. **Zool J Linn Soc**, [s.l.], v. 146, n. 3, p.407-452, mar. 2006. Wiley-Blackwell.

PRASSAS, Ioannis; DIAMANDIS, Eleftherios P.. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 7, n. 11, p.926-935, 24 out. 2008. Nature Publishing Group.

PRITHIVIRAJ, M. W. PASCHKE, AND J. M. VIVANCO, "Root communication, the role of root exudates," Encyclopedia of Plant and Crop Science, vol. 1, pp. 1–4, 2007

PULVERER, Bernd et al. Cancer. **Nature**, [s.l.], v. 411, n. 6835, p.335-335, 17 maio 2001. Nature Publishing Group.

PUSCHETT, Jules B.; AGUNANNE, Enoch; UDDIN, Mohammad N.. Emerging Role of the Bufadienolides in Cardiovascular and Kidney Diseases. **American Journal Of Kidney Diseases**, [s.l.], v. 56, n. 2, p.359-370, ago. 2010. Elsevier BV.

QI, Fanghua et al. Bufalin and cinobufagin induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via Fas- and mitochondria-mediated pathways. **Cancer Science**, [s.l.], v. 102, n. 5, p.951-958, 28 fev. 2011. Wiley-Blackwell.

QI, Ji et al. Toad Glandular Secretions and Skin Extractions as Anti-Inflammatory and Anticancer Agents. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2014, p.1-9, 2014. Hindawi Publishing Corporation.

RAJASEKARAN, Ayyappan K.; RAJASEKARAN, Sigrid A.. Role of Na-K-ATPase in the assembly of tight junctions. **American Journal Of Physiology - Renal Physiology**, [s.l.], v. 285, n. 3, p.388-396, 30 jul. 2003. American Physiological Society.

RAJASEKARAN, S. A. et al. Na,K-ATPase -Subunit Is Required for Epithelial Polarization, Suppression of Invasion, and Cell Motility. **Molecular Biology Of The Cell**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.279-295, 1 fev. 2001. American Society for Cell Biology (ASCB).

RAJASEKARAN, S. A. et al. Na,K-ATPase Activity Is Required for Formation of Tight Junctions, Desmosomes, and Induction of Polarity in Epithelial Cells. **Molecular**

**Biology Of The Cell**, [s.l.], v. 12, n. 12, p.3717-3732, 1 dez. 2001. American Society for Cell Biology (ASCB).

RAJASEKARAN, Sigrid A. et al. REDUCED EXPRESSION OF beta-SUBUNIT OF NA,K-ATPASE IN HUMAN CLEAR-CELL RENAL CELL CARCINOMA. **The Journal Of Urology**, [s.l.], v. 162, n. 2, p.574-580, ago. 1999. Elsevier BV.

RAJASEKARAN, Sigrid A.; BARWE, Sonali P.; RAJASEKARAN, Ayyappan K.. Multiple Functions of Na,K-ATPase in Epithelial Cells. **Seminars In Nephrology**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.328-334, set. 2005. Elsevier BV.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.. **R. J. Flower**: Farmacologia. 6. ed. Londres: Elsevier, 2007. 829 p.

RAO, V. Ashutosh. Iron Chelators with Topoisomerase-Inhibitory Activity and Their Anticancer Applications. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s.l.], v. 18, n. 8, p.930-955, 10 mar. 2013. Mary Ann Liebert Inc.

ROCHA, A da. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion In Pharmacology**, [s.l.], v. 1, n. 4, p.364-369, 1 ago. 2001. Elsevier BV.

ROCHA, Sayonarah C. et al. 21-Benzylidene Digoxin: A Proapoptotic Cardenolide of Cancer Cells That Up-Regulates Na,K-ATPase and Epithelial Tight Junctions. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 10, p.497-507, 7 out. 2014. Public Library of Science (PLoS).

RUBIN, Steven J. et al. Two prostate carcinoma cell lines demonstrate abnormalities in tumor suppressor genes. **Journal Of Surgical Oncology**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.31-36, jan. 1991. Wiley-Blackwell.

RUDOLPH, Natalie S.; LATT, Samuel A.. Flow cytometric analysis of X-ray sensitivity in ataxia telangiectasia. **Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, [s.l.], v. 211, n. 1, p.31-41, mar. 1989. Elsevier BV.

RUSSELL, Paul et al. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. **Nature**, [s.l.], v. 397, n. 6715, p.172-175, 14 jan. 1999. Nature Publishing Group.

Salmonm, S.E. Em Farmacología Básica & Clínica, Katzung, B.G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 1998, p. 629-655.

SANCHEZ, Y.. Conservation of the Chk1 Checkpoint Pathway in Mammals: Linkage of DNA Damage to Cdk Regulation Through Cdc25. **Science**, [s.l.], v. 277, n. 5331, p.1497-1501, 5 set. 1997. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

SANDHU, H. S.. **BIOPROSPECTING: PROS AND CONS**. 2011. Disponível em: <[http://www.hillagric.ac.in/edu/covas/vpharma/winter](http://www.hillagric.ac.in/edu/covas/vpharma/winter_school/lectures/21) school/lectures/21

Bioprospecting Pros and cons.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2015.

SCHONER, Wilhelm. Salt abuse: the path to hypertension. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.16-17, jan. 2008. Nature Publishing Group.

SCHONER, Wilhelm; SCHEINER-BOBIS, Georgios. Endogenous Cardiac Glycosides: Hormones Using the Sodium Pump as Signal Transducer. **Seminars In Nephrology**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.343-351, set. 2005. Elsevier BV.

SHAPIRO, H. M. **Practical Flow Cytometry**. New York : Ed Wiley-Liss, 1995.

SHILOH, Y. (2006) The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem. Sci.* 31, 402–410 (SHILOH, 2006) 10.1016/j.tibs.2006.05.00

SINGH, N. P.; MACCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. **Exp. Cell Res.** v. 175, p. 184–191, 1988.

SKOU, J. C.. Enzymatic Basis for Active Transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> Across Cell Membrane. **American Physiological Society**, [s.l.], v. 45, n. 3, p.596-618, 1 jul. 1965.

SMITH, Joanne et al. The ATM–Chk2 and ATR–Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. **Advances In Cancer Research**, [s.l.], p.73-112, 2010. Elsevier BV.

SOARES, Bruno Marques. **HELLEBRIGENINA, UM BUFODIENOLÍDEO COM POTENCIAL AÇÃO COMPATÍVEL DE INIBIDOR CATALÍTICO DA TOPOISOMERASE II**. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

STEWART BW, WILD CP, editors (2014). **World Cancer Report 2014**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

TAKAI, Noriyuki et al. Bufalin induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. **International Journal Of Molecular Medicine**, [s.l.], p.637-643, 1 maio 2008. Spandidos Publications.

Tânia da S. Agostini-Costa, Roberto F. Vieira, Humberto R. Bizzo, Dâmaris Silveira and Marcos A. Gimenes (2012). Secondary Metabolites, Chromatography and Its Applications, Dr. Sasikumar Dhanarasu (Ed.), ISBN: 978-953-51-0357-8, InTech

TAYLOR, William R; STARK, George R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, [s.l.], v. 20, n. 15, p.1803-1815, 5 abr. 2001. Nature Publishing Group.

TIAN, J. et al. Changes in Sodium Pump Expression Dictate the Effects of Ouabain on Cell Growth. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 284, n. 22, p.14921-14929, 27 mar. 2009. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F.; Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.** v. 35, p. 206–221, 2000.

TOLEDO, R.c.; JARED, C.. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Physiology**, [s.l.], v. 111, n. 1, p.1-29, maio 1995. Elsevier BV.

UDDIN, Mohammad N. et al. Marinobufagenin is an upstream modulator of Gadd45a stress signaling in preeclampsia. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, [s.l.], v. 1812, n. 1, p.49-58, jan. 2011. Elsevier BV.

UZUNOGLU, Selim et al. Augmentation of methylprednisolone-induced differentiation of myeloid leukemia cells by serine/threonine protein phosphatase inhibitors. **Leukemia Research**, [s.l.], v. 23, n. 5, p.507-512, maio 1999. Elsevier BV.

VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods.** v. 184, p. 39-51, 1995.

VERMEULEN, Katrien; VAN BOCKSTAELE, Dirk R.; BERNEMAN, Zwi N.. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.131-149, jun. 2003. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x.

VERMEULEN, Katrien; VAN BOCKSTAELE, Dirk R.; BERNEMAN, Zwi N.. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.131-149, jun. 2003. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x

VILENCHIK, M. M.; KNUDSON, A. G.. Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 100, n. 22, p.12871-12876, 17 out. 2003. Proceedings of the National Academy of Sciences.

VOGELSTEIN, Bert; LANE, David; LEVINE, Arnold J.. . Regulation of the G2-M transition by p53. **Nature**, [s.l.], v. 408, n. 6810, p.307-310, 16 nov. 2000. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/35042675.

Walsh, P. C. Re: A Novel Two-Stage, Transdisciplinary Study Identifies Digoxin as a Possible Drug for Prostate Cancer Treatment. *J. Urol.*, **2012**, 187(1), 143-143.

World Health Organization. Cancer (WHO). World health statistics 2015 [homepage on the internet]. Geneva: World Health Organization; Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/170250/1/9789240694439\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/170250/1/9789240694439_eng.pdf?ua=1)

World Health Organization. Cancer (WHO). Fact sheet n° 297. April 2009. [homepage on the internet]. Geneva: World Health Organization; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>

XIE, C.-m. et al. Cardiac glycosides block cancer growth through HIF-1 - and NF- B-mediated Plk1. **Carcinogenesis**, [s.l.], v. 34, n. 8, p.1870-1880, 24 abr. 2013. Oxford University Press (OUP).

XIE, Z.. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Mediated Signal Transduction: From Protein Interaction to Cellular Function. **Molecular Interventions**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.157-168, 1 maio 2003. CrossRef Test Account.

XU-TAO, C., DONG, W., NA, W., ZHENG, C., 2009. Water-soluble constitutions from the skin of *Bufo bufo gargarizans* Cantor. *Chin. J. Nat. Med.* 7, 181– 183.

YANG, P. et al. Oleandrin-mediated inhibition of human tumor cell proliferation: Importance of Na,K-ATPase subunits as drug targets. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s.l.], v. 8, n. 8, p.2319-2328, 1 ago. 2009. American Association for Cancer Research (AACR).

ZHANG L, NAKAYA K, YOSHIDA T, KUROIWA Y. Induction by bufalin of differentiation of human leukemia cells HL60, U937, and ML1 toward macrophage/monocyte-like cells and its potent synergistic effect on the differentiation of human leukemia cells in combination with other inducers. *Cancer Res.* 1992; 52:4634–4641.

ZITOUNI, Sihem et al. Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 15, n. 7, p.433-452, 23 jun. 2014. Nature Publishing Group.

ZUCO, Valentina et al. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 175, n. 1, p.17-25, jan. 2002. Elsevier BV.