



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

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMETASTÁTICA DA BIFLORINA, UMA
O-NAFTOQUINONA ISOLADA DAS RAÍZES DA *Capraria biflora*.**

ADRIANA ANDRADE CARVALHO

FORTALEZA – CE

2009

Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMETASTÁTICA DA BIFLORINA, UMA O-
NAFTOQUINONA ISOLADA DAS RAÍZES DA *Capraria biflora*.**

Adriana Andrade Carvalho

Dissertação submetida à Coordenação do programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador:

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes

Fortaleza - CE

2009

C321a Carvalho, Adriana Andrade

Estudo da atividade antimetastática da biflorina, uma o-naftoquinona isolada das raízes da *Capraria biflora*. / Adriana Andrade Carvalho – Fortaleza, 2009.

105 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia.

1. Metástase. 2. Biflorina. 3. Adesão celular. 4. Migração celular. 5. Melanoma. I. Moraes Filho, Manoel Odorico de (orient.). II. Título.

CDD 615.321

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMETASTÁTICA DA BIFLORINA, UMA O-
NAFTOQUINONA ISOLADA DAS RAÍZES DA *Capraria biflora*.**

Adriana Andrade Carvalho

Dissertação submetida à coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

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

Aprovada com louvor em 14 de julho de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes

Universidade Federal do Ceará

- Orientador –

Prof^a Dr^a. Leticia Veras Costa Lotufo

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Roger Chammas

Universidade Federal de São Paulo

*Ao meu bebê,
com todo o meu amor.*

Agradecimentos

Terminar esta dissertação para mim foi uma grande conquista. E esta vitória foi realizada graças à contribuição de várias pessoas. E são a essas pessoas que agradeço com todo o meu carinho...

À minha mãe, **Leda Maria de Andrade Carvalho** (a quem dedico essa dissertação) e ao meu pai, **José Rocha de Carvalho**, pelo carinho, dedicação, e por me ajudarem a ser a pessoa que eu sou. E também aos meus irmãos, **Andrea Andrade Carvalho de Menezes e Adriano Andrade Carvalho (Feio)** por acreditarem em mim e por tornarem meus dias mais alegre e divertido... Além do carinho!

Ao meu orientador **prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes** não somente por ter me aceitado como orientanda, mas, principalmente, por me receber com os braços abertos. Obrigada por ter acreditado sempre em mim (talvez mais que eu mesma!);

À prof^a. **Dr^a. Leticia Veras Costa Lotufo** pela presença e constante ajuda, além de tirar minhas dúvidas e pelas dicas valiosas;

À prof^a. **Dr^a. Cláudia Ó Pessoa**, pelas inúmeras contribuições ao laboratório e por confiar no meu trabalho. Muito obrigada;

À **Dr^a. Raquel Carvalho Montenegro** por estar sempre presente e pela preocupação por todos nós;

À **Luciana Gregório de Souza Silva** pela extração da biflorina e pela paciência quando eu pedia mais e mais substância... Valeu!

A prof^a **Dr^a Telma Leda Gomes de Lemos** por ter me dado a oportunidade em trabalhar com a biflorina;

Ao prof. **Dr. Roger Chammas (USP)** por ter aceitado participar da minha banca;

A prof^a **Dr^a Ana Paula** pelas análises histopatológicas e pelas dúvidas esclarecidas;

Ao prof. **Dr. Márcio Viana Ramos** por ter aberto as portas do seu laboratório e ter me dado a possibilidade de realizar os ensaios de zimograma;

Aos pós-graduandos **Jefferson e Diego** pelos ensaios com as proteases. Valeu pelo carinho! E ao **Fernando** pelas risadas!

Ao amigo **José Roberto Ferreira (negrinho)** pela ajuda nos primeiros momentos aqui em Fortaleza! Uma pena que não esteja mais aqui, e sei que em breve poderá voltar a fazer parte desse grupo de pesquisa. Sentimos saudades!

Ao amigo **Daniel Pereira Bezerra (Chatinho)** pela enorme ajuda no meu início neste laboratório e pelas dúvidas esclarecidas mesmo estando distante (e por ouvir todos os meus estresses). Obrigada por ter me ajudado a nunca desistir!

À amiga **Kris Mousinho (ow baixaria!)** pela imensurável ajuda nos “quarenta e cinco minutos do segundo tempo” desta dissertação. Muito obrigada mesmo! Além das risadas, palhaçadas e horas de distração, claro!

À amiga **Arinice Costa** pela paz que sua presença sempre me trouxe e pela ajuda! Muito obrigada!

Ao amigo **Elthon Goés Ferreira** pelas conversas construtivas, não-construtivas e principalmente as “**destrutivas**”. E pelas baladas, claro! Sem esses momentos acho que eu surtaria (ok, ok, sei que já surtei várias vezes...);

Aos colegas do **Laboratório de Oncologia Experimental – LOE: Ivana Dantas** (doidinha!), **Carla Sombra**, **Cecília Oliveira** (feinha), **Michel Ferreira** (Lemon-man), **Bruno Cavalcanti** (Nunim), **Kézia Lacerda**, **Danilo Rocha**, **Diego Wilke**, **Venúcia** (por ter transmitido **TODOS** os vírus mutantes da gripe para mim! Acho que foi ela quem inventou a tal da gripe suína), **Patrícia Marçal** (Ronaldo!), **Gardênia Militão**, **Felipe Rocha**, **Paula Jimenez**, **Hindemburgo**, **Washington Araújo** (pela paciência), **Delano Marinho**, **Ana Jérсия**, **Paula IC**, **Socorro Vanesca**, **Evelyne**, **Aline do *protein micro-array*** (Candidata), **Deyse** (Dalith), **Bruno Soares** (Outro Dalith) e **Igor** (boy do LOE).

Aos “meus” ICs: **Rafael Sucupira** e **Vanessa Canamary** pela ajuda e por me aperrear bastante (rsrsr)! Muito obrigada!

À técnica **Silvana França**, cujo trabalho não apenas é essencial como imprescindível para todos nós no laboratório. Sem sua ajuda não haveria trabalho! E por aturar meus aperreios! – será que atura mesmo? (“Sil, preciso de placas! Sil, e as lamínulas? Sil, a encubadora “tá” apitando! Acabou o PBS! Sumiu meu ácido acético! Acabou o meio! Siiiiiii!);

À **Rogéria** e **Erivanda** pelo apoio técnico e à **Maria de Fátima** pelos conselhos, alegria e paz;

Às secretárias **Áura**, **Adelânia** (minha amiga) e **Sheyla** por conseguirem dar “um jeito” em tudo (e mais um pouco)! E pelas conversas nas horas vagas e pelos conselhos sempre dados de coração. Obrigada **Adelânia** pela força e pelo carinho em todos os momentos que precisei!

Aos professores da Pós-graduação por tudo que me ensinaram. Em especial ao prof. **Dr. Manassés** pelo rigor de suas aulas. Valeu mesmo!

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: **Chiquinho**, **Fernando**, **Íris**, **Alana**, “seu” **Carlos**, **Haroldo**, **seu Bento**, **Armando** e **etc.** cujo trabalho é essencial para todo o departamento.

Às grandes amigas de **Aracaju-SE** que, mesmo estando tão longe fizeram questão de não perder contato: **Tarciana (patinha)**, **Joselma Luiza (Tchutchuca)**, **Taciana Luiza (chocolate)**, **Meiriela (mulher, fiquei com vergonha de colocar seu apelido aqui!)**, **Clístenes** e **Marília (minha “irmã gêmea”)**. Um pedacinho de Aracaju em Fortaleza!

Em especial aos meus orientadores da **Iniciação Científica**: o **prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos (UFS)**, por ter me guiado durante minha graduação me preparando para “encarar” uma pós longe de casa (obrigada pela bela preparação)! Grande parte do que eu sei agradeço a você! Ao **prof. Dr. Angelo Roberto Antonioli (UFS)** por ter aberto as primeiras portas da Farmacologia e ter me feito enxergar o quanto amava essa ciência. Espero ter “herdado” seu raciocínio lógico! Obrigada pela força quando prestava a seleção! E ao **prof. Dr. Péricles Barreto (UFS)** pelos grandes ensinamentos na química orgânica!

A todos os colegas da pós-graduação, em especial **Natália Bitu, Nayrton, Emiliano (Mimi), Helvira, Edith, Tatiana Bachur, Rodrigo, Rodrigo Siqueira, Karine, Felipe e Charliane** pelas trocas de informações e também pelas baladas;

Aos novos colegas que fiz em Fortaleza: **Luisinha, Grazi, Natália, as irmãs Sombras (Carlota, Mariza e Paula)** e o pessoal do **Della Rosa (Carol, Dona Sandra, Osélio, Valdir e Dona América)** com seus agregados **Tânia, Luiza e Jamili** por me fazerem ver que existe vida fora do Laboratório. Valeu pelo apoio! Obrigada **Carol** pela ajuda nos últimos segundos para a entrega dessa dissertação! Você salvou milhões de almas!

Em especial, aos poucos, mas existentes, “**não-amigos**” por me fazer forte e madura. E por me mostrar que, após uma tempestade, os jardins ficam mais floridos!

Aos meus pequenos **animais de laboratório** (pretinhos) por me fazer enxergar o quanto temos que respeitar esses pequenos seres-vivos e por tornar possível esse trabalho. Obrigada!

Ao **CNPq** pelo financiamento da pesquisa, sem essa ajuda não seria possível a construção desse trabalho;

A **todos** que contribuíram diretamente ou indiretamente pelo meu trabalho.

Meu mais sincero,

OBRIGADA!

*“Que as palavras que eu falo
Não sejam ouvidas como prece e nem repetidas com fervor
Apenas respeitadas...”*

(Oswaldo Montenegro)

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Símbolos e Abreviaturas

RESUMO

ABSTRACT

1. <i>Introdução</i>	20
1. Metástase	20
1.1. Cascata metastática.....	21
1.1.1. Inibição da adesão celular.....	23
1.1.2. Invasão Celular.....	24
1.2. Produtos Naturais.....	34
1.2.1. Planta de estudo – <i>Capraria biflora</i>	39
1.2.3. Biflorina	42
2. <i>OBJETIVOS</i>	48
2.1. Geral	48
2.2. Específicos	48
3. <i>Materiais e Métodos</i>	50
3.1. Materiais utilizados	50
3.1.1. Equipamentos	50
3.1.2. Reagentes e Substâncias	51
3.1.3. Fármacos.....	52
3.1.4. Comitê de Ética.....	52
3.1.5. Manutenção das células	52
3.1.6. Animais	53
3.2. Obtenção da biflorina das raízes da <i>Capraria biflora</i>	53
3.3.1. Princípio do Teste.....	54
3.3.2. Procedimento Experimental.....	54
3.3.3. Análise dos Dados.....	55
3.4. Análise histopatológica	55
3.5. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	55

3.5.1. Princípio do teste	56
3.5.2. Procedimento experimental	56
3.5.3. Análise dos dados	56
3.6. Ensaio de Crescimento Tumoral – MTT	57
3.6.1. Princípio do Teste.....	57
3.6.2. Procedimento experimental	57
3.6.3. Análise dos dados	57
3.7. Ensaio de Inibição da Adesão Celular - MTT	57
3.7.1. Princípio do Teste.....	57
3.7.2. Procedimento Experimental.....	58
3.7.3. Análise dos Dados.....	58
3.8. Ensaio de Migração Celular por Cicatrização (<i>Wound Healing</i>).....	59
3.8.1. Princípio do Teste	59
3.8.2. Procedimento Experimental.....	59
3.8.3. Análise dos Dados.....	60
3.9. Zimografia em gel de poliacrilamida em SDS co-polimerizado com gelatina ..	60
3.9.1. Princípio do teste	60
3.9.2. Protocolo Experimental	60
3.9.3. Análise estatística.....	61
4. RESULTADOS	63
4.1. Ensaio <i>in vivo</i> de metástase experimental e sobrevida.....	63
4.2. Análise histopatológica dos pulmões	63
4.3. Citotoxicidade pelo MTT	66
4.4. Adesão Celular	68
4.5. Migração Celular	68
4.6. Ensaio de Zimograma	68
5. DISCUSSÃO.....	74
6. CONCLUSÃO.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
Anexo.....	105

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química de alguns quimioterápicos.	22
Figura 2. Adesão mediada pela E-caderina (A) e integrinas (B).....	25
Figura 3. Invasão celular.	26
Figura 4. Diagrama tri-dimensional do complexo pro MMP-2 e TIMP-2 humano.	30
Figura 5. Migração da célula sobre substrato.....	32
Figura 6. Cascata Metastática.	33
Figura 7. Estrutura química da vimblastina (7), vincristina (8), vindesina (9) e vinorelbina (10).	36
Figura 8. Estrutura química de algumas substâncias com potencial antimetastático.	37
Figura 9. Estrutura química de algumas substâncias com potencial antimetastático.	38
Figura 10. Foto da espécie <i>Capraria biflora</i>	40
Figura 13. Estrutura química da biflorina (25).....	43
Figura 14. Pulmão com nódulos metastáticos.....	64
Figura 15. Efeito da biflorina sobre a metástase experimental.....	64
Figura 16. Efeito da biflorina sobre a taxa de sobrevivência.....	65
Figura 17. Análise histopatológica dos pulmões.....	65
Figura 18. Efeito da biflorina sobre o crescimento celular.....	67
Figura 19. Efeito da biflorina sobre a adesão celular.....	69
Figura 20. Ensaio de migração celular.....	70
Figura 21. Ensaio de migração celular.....	71
Figura 22. Zimogramafia.....	72

Lista de Tabelas

Tabela 1. Nomenclatura de alguns substratos específicos dos principais grupos das metaloproteinases da matriz (PEREIRA <i>et al.</i> , 2006).	28
Tabela 2. Triagem fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos de raízes, caule e folhas de <i>Capraria biflora</i> (Aquino <i>et al.</i> , 2003) (+) presença; (-) ausência.	41
Tabela 3. Concentrações mínimas inibitórias (CMI) da biflorina e de seus produtos de degradação pela luz natural (Gonçalves de Lima <i>et al.</i> , 1961)	45
Tabela 4. Citotoxicidade da biflorina frente a linhagens tumorais (VASCONCELLOS <i>et al.</i> , 2004)	46
Tabela 5. Efeito inibitório da biflorina e da doxorrubicina (controle positivo) das células B16-F10 e MDAMB-435. Os valores apresentados referem-se a CI_{50} (μM) e o intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear.	66

Lista de Símbolos e Abreviaturas

ANOVA	<i>Analisis of Variance</i> (Análise de variância)
BSA	Soro Albumina Bovina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, Brasil
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CMI	Concentrações mínimas inibitórias
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P.M.	Erro padrão da média
H/E	Hematoxilina/Eosina
IC	Intervalo de Confiança
MB	Membrana basal
LEF/Tcf	<i>Lymphoid Enhancer Binding Factor/ T Cell-Specific Factor</i>
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase
MT-MMP	Metaloproteinase ligada a membrana

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
O-	Orto
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TIMP	Inibidor tecidual das metaloproteinases
Wnt	<i>Wingless</i>

RESUMO

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMETASTÁTICA DA BIFLORINA, UMA O-NAFTOQUINONA ISOLADA DAS RAÍZES DA *Capraria biflora*. Dissertação de Mestrado. Autora: Adriana Andrade Carvalho. Orientador: Manoel Odorico de Moraes. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, UFC, 2009.

A principal causa de mortalidade em pacientes com câncer está relacionada com a presença de tumores secundários pelo organismo. Devido a falta de tratamento das metástases, muitos esforços estão sendo lançados para o desenvolvimento de novas drogas com potencial antimetastático. Em estudos realizados em nosso laboratório observamos que a biflorina, uma o-naftoquinona isolada das raízes da *Capraria biflora*, aumentava a sobrevida dos animais transplantados com o melanoma B16 sem expressiva toxicidade. Diante desse dado resolvemos avaliar a atividade antimetastática desta naftoquinona, em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, utilizando as linhagens celulares B16-F10 (melanoma murino) e MDAMB-435 (melanoma humano). A indução da metástase experimental foi realizada pela inoculação da linhagem celular B16-F10 via veia caudal de animais C57BL/6. Neste ensaio, a biflorina (25 e 50 mg/kg/dia) inibiu a formação dos nódulos metastático em 57 e 71 %, respectivamente. Entretanto, em análise histopatológica dos pulmões dos animais tratados, foi observada a presença de hemácias e hemossiderina, o que indica a presença de hemorragia recente e tardia. Com objetivo de avaliar como a biflorina tem seu efeito sobre a metástase, foram realizados alguns ensaios *in vitro* utilizando duas linhagens de melanoma metastático: B16-F10 e MDAMB-435. Em ensaio de adesão celular, a biflorina foi capaz de inibir a adesão de ambas as células sobre o colágeno tipo I, um dos constituintes da matriz extracelular. Além disso, em ensaio de migração celular, utilizando o método *Wound healing* (cicatrização), a biflorina também foi capaz de inibir a motilidade destas células. Vale ressaltar que nesses ensaios foram utilizadas concentrações não-citotóxicas, o que exclui um efeito falso positivo. Por fim, em ensaio de zimograma com gelatina, foi observado que a biflorina não alterava a liberação das metaloproteinases -2 e -9 para o meio de crescimento, excluindo esse mecanismo de ação. Esses resultados sugerem que a biflorina apresenta um potencial antimetastático bastante promissor através da sua ação sobre a adesão e migração celular, eventos cruciais para que ocorra a formação de metástase. Entretanto, futuros estudos são necessários para elucidar seu mecanismo de ação.

Palavras-chave: Metástase, Biflorina, Adesão celular, Migração Celular, Melanoma.

ABSTRACT

STUDY OF ANTI-METASTATIC ACTIVITY OF BIFLORIN, AN O-NAPHTHOQUINONE ISOLATED FROM THE ROOTS OF *Capraria biflora*. Adriana Andrade Carvalho. Advisor: Manoel Odorico de Moraes. Master's dissertation. Postgraduate Program of Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, UFC, 2009.

The main cause of mortality in cancer patients is related to the incidence of secondary tumors in the body. Owing up to the deficiency of therapeutic schemes direct to the treatment of metastasis, many efforts are being launched to develop drugs with anti-metastatic potential. In previous studies performed in our laboratory, biflorin, an o-naphthoquinone isolated from the roots of *Capraria biflora*, was found to increase the survival rates of B16-bearing mice without significant toxicity. In spite of these findings we decided to evaluate the anti-metastatic activity of biflorin using B16-F10 (murine melanoma) and MDAMB-435 (human melanoma) cells line. The experimental metastasis model was achieved by injecting B16-F10 cells in the tail vein of C57BL/6 mice. In this assay, biflorin (25 and 50 mg/kg/day) inhibited the formation of metastatic nodules in 57 and 71 %, respectively. Nevertheless, histopathological analyses of biflorin-treated lungs showed the presence of erythrocytes and hemosiderin, indicating the occurrence of recent and late hemorrhage. In order to evaluate how biflorin inhibits metastasis, we carried out *in vitro* tests using two cell lines of metastatic melanoma, B16-F10 and MDAMB-435. In the cell adhesion assay, biflorin inhibited adhesion of both cells lines on type I collagen, a substrate of the extracellular matrix. Moreover, biflorin was able to inhibit cell motility in the wound healing assay. The concentrations used in these assays did not show any cytotoxicity after 24 h of incubation, excluding a false-positive. Even so, in the zymogram assay we observed that biflorin did not alter the release of metalloproteinases -2 and -9 into growth medium, thus excluding this as the means by which biflorin exerts the anti-metastatic effect. These data suggest that biflorin has a promising anti-metastatic potential, as shown by its anti-adhesion and anti-migration properties on metastatic melanoma cell lines, however further studies are indispensable to elucidate its action mechanism.

Keywords: Metastasis, Biflorin, Cell adhesion, Cell migration, Melanoma.

Introdução

1. Introdução

1. Metástase

Metástase é o processo pelo qual as células do câncer se espalham pelo organismo, a partir das células de um tumor primário, promovendo o desenvolvimento de tumores secundários (RIETHDORF *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2008). O termo foi inicialmente utilizado pelo cirurgião francês Jean-Claude Recamier, em 1829, aplicando-o para designar uma lesão cerebral em uma paciente portadora de câncer de mama (RECAMIER, 1829).

A presença ou não de metástases está diretamente relacionada com o prognóstico dos pacientes (RIETHDORF *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2008), sendo sua presença responsável por cerca de 90% das mortes pelo câncer (ZHAO *et al.*, 2008; MEHLEN & PUISIEUX, 2006). Felizmente a formação de metástase é um processo bastante ineficaz (CHIN *et al.*, 2005). Estudos realizados por FIDLER e colaboradores (1970), utilizando a linhagem celular de melanoma murino B16 radiomarcada, mostraram que, após 24h na circulação, menos de 1% das células eram viáveis e menos de 0,1% eventualmente sobreviveram para formar metástase. De fato, diferentes estudos relatam que a maioria das células cancerosas, presente na circulação sanguínea, morre durante as primeiras horas, devido ao trauma mecânico produzido pelo fluxo sanguíneo, pela sua incapacidade de resistir à deformação e sua suscetibilidade à ação lítica imunocompetentes de linfócitos e macrófagos intra-sinusoidal (ORTEGA *et al.*, 2008).

Mesmo sendo um evento bastante ineficaz, a presença de tumores secundários ainda é um dos maiores desafios para o desenvolvimento de terapias efetivas para o tratamento do câncer (ZHAO *et al.*, 2008). Diante disso, outras drogas têm sido estudadas, como algumas nitrosuréias (carmustina, lomustina e semustina) **(2, 3 e 4)**, a cisplatina **(5)** e o taxol **(6)**, porém nenhuma demonstrou taxas consistentes na sobrevida dos pacientes (KOH, 1991;

BUZAID & MURREN, 1992; GUERRY & SCHUCHTER, 1992; EVANS & MANSON, 1994; WAGNER et al., 2000).

Devido a sua grande relevância clínica, os mecanismos fisiopatológicos das metástases têm sido extensamente estudados, com ênfase nas características genéticas e bioquímicas dessas células (MEHLEN. & PUISIEUX, 2006). A habilidade dos tumores malignos em formar metástase está relacionada com várias características que modulam sua capacidade em invadir os tecidos adjacentes, acessar a corrente sanguínea ou linfática e sobreviver ao trânsito sanguíneo, para então extravasar, residir e, finalmente, colonizar órgãos e tecidos (ALBERTS et al., 2004). Um vasto número de fatores também está relacionado com o processo de formação de metástase, como algumas citocinas, quimiocinas, hormônios, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular e as metalopeptidase de matriz extracelular e hipóxia no microambiente (QIAN et al., 2006).

1.1. Cascata metastática

As bases genéticas da carcinogênese variam entre os tipos diversos de câncer, entretanto, os mecanismos necessários para a invasão e metástase são bastante similares na maior parte dos tumores sólidos (ECCLES & WELCH, 2007).

De uma forma resumida, a formação de metástase é realizada através de diversos passos que incluem: dissociação das células cancerosas do tumor primário, adesão à matriz extracelular (MEC), migração e invasão das células ao longo na MEC, circulação ao longo da corrente sanguínea ou linfática, chegada a um sítio distante, adesão à membrana basal vascular, depósito metastático, angiogênese e proliferação celular (ZHAO *et al.*, 2008; SHU-CHEN CHU *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2006).

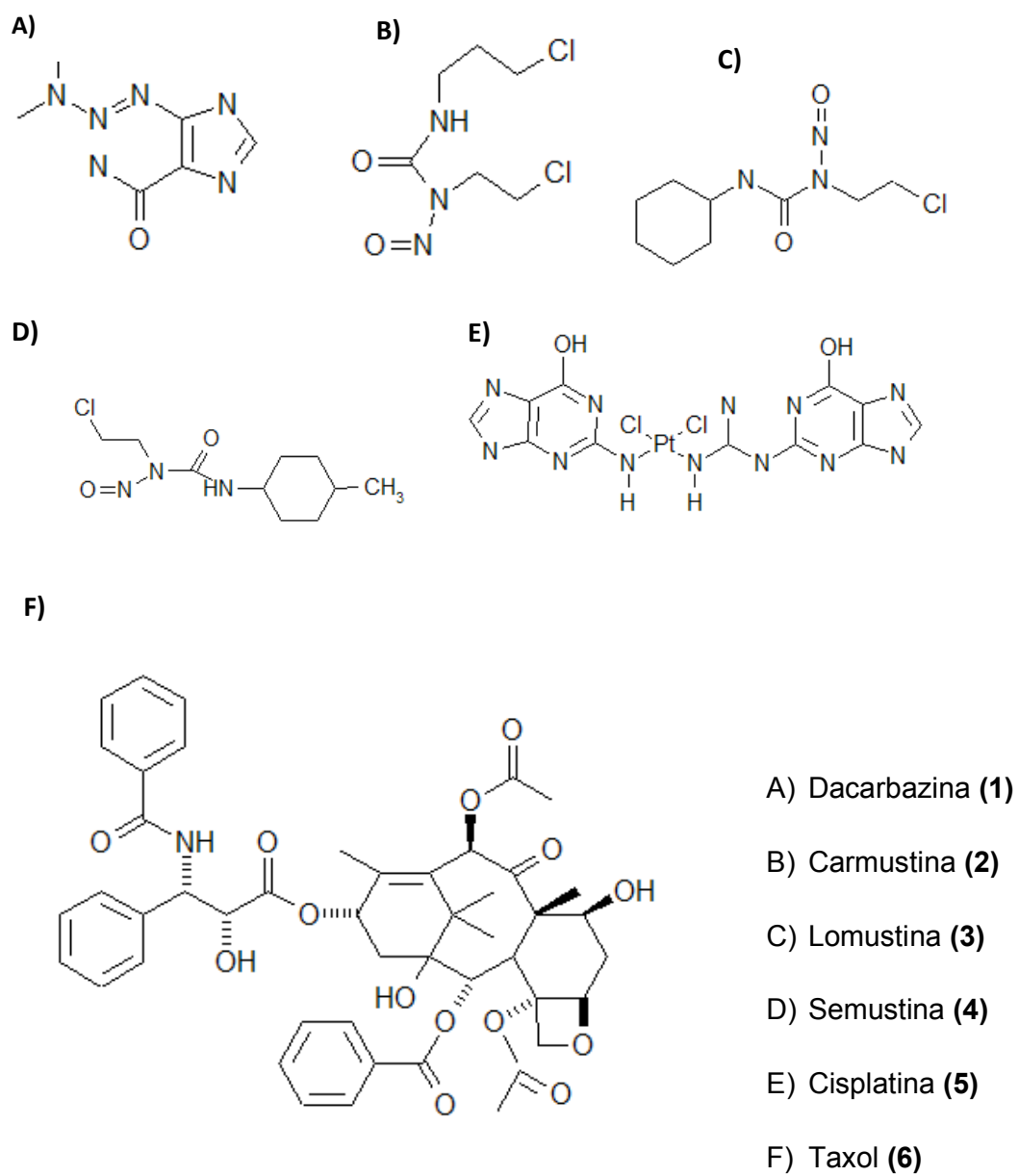


Figura 1. Estructura química de alguns quimioterápicos.

1.1.1. Inibição da adesão celular

A primeira etapa da invasão tumoral é a alteração na interação célula-célula (NEAL & BERRY, 2006). A adesão célula-célula é mediada principalmente por uma superfamília de moléculas de adesão chamadas caderinas. As caderinas (figura 2a) são glicoproteínas transmembranares, homodiméricas, formadas por 700-750 aminoácidos. A maior parte da cadeia polipeptídica é extracelular e composta de 5 domínios, cada qual com 100 aminoácidos, onde 4 destes domínios são homólogos e contêm sítios de ligação com o cálcio (KOCH *et al.*, 1999).

Existe tanto caderinas clássicas quanto as não-clássicas. As caderinas clássicas foram inicialmente nomeadas de acordo com o tecido as quais foram encontradas: caderina E (tecido epitelial), caderina N (tecido nervoso) e caderina P (placenta). As não-clássicas também incluem proteínas de adesão tais como as caderinas dos desmossomos e as várias protocaderinas encontradas no cérebro (ALBERT, 2004).

As caderinas formam ligações homofílicas (ligação entre duas moléculas de adesão iguais: caderina-caderina) cálcio-dependente (KURCHAT & MAUCH, 2000). A maioria das caderinas está ligada à actina do citoesqueleto através da interposição de um complexo de proteínas de ancoramento intracelular denominada cateninas (Figura 2a) (PASHOS *et al.*, 2009), o qual é essencial para a eficiência da adesão célula-célula (KOCH *et al.*, 1999; ALBERTS, 2004). Na ausência de cálcio, as caderinas sofrem alterações conformacionais estando na sua forma “inativa” e são degradadas por enzimas proteolíticas (KOCH *et al.*, 1999).

De um modo geral, a perda ou diminuição da expressão do sistema caderina-catenina causa perda da adesão célula-célula, resultando em aumento da agressividade de tumores epiteliais, invasão e metástase (PASHOS *et al.*, 2009). No melanoma, por exemplo, encontramos que a adesão célula-célula mediada pelas caderinas entre os melanócitos (mediada pelas E-caderinas) é trocada pela adesão das células aos queratinócitos através das N-caderinas, o qual é responsável pelo acoplamento dos fibroblastos e das células endoteliais no estroma tumoral (HSU *et al.*, 2000).

Além dessa perda da adesão célula-célula, a diminuição da expressão das caderinas aumenta o conteúdo citoplasmático da β -catenina livre (figura 2a), tendo papel essencial na via de sinalização Wntless (Wnt), glicoproteína que exerce papel na embriogênese, ativando os fatores de transcrição LEF/Tcf, que, por sua vez, controlam a transcrição de genes que codificam a ciclina D1, c-Myc (responsáveis pelo controle do ciclo celular) e metaloproteinasas, cujo papel é essencial na degradação dos componentes da matriz extracelular (NEAL & BERRY, 2006; PASHOS *et al.*, 2009). Isto é, além da diminuição da expressão das caderinas ter ação direta sobre a invasão celular, ela também ocasiona um aumento na expressão de proteínas relacionadas com a progressão tumoral, agravando ainda mais o quadro clínico.

1.1.2. Invasão Celular

Após a inibição da adesão das células do tumor primário, as células tumorais precisam ter a capacidade de migrar e invadir o estroma adjacente (ZHAO *et al.*, 2008). De acordo com LIOTTA e colaboradores (1988), o processo de invasão celular ocorre conforme a Teoria dos Três Passos: (1) adesão à matriz extracelular (MEC); (2) dissolução da MEC; (3) locomoção e migração (Figura 3).

1º Passo – Adesão Celular:

A adesão célula-MEC é mediada principalmente por moléculas de adesão denominadas integrinas (figura 2b). As integrinas consistem em heterodímeros transmembranares compostas por duas subunidades: α (120 a 180 kDa) e β (90 a 110 kDa), os quais interagem com a MEC e regula a comunicação intracelular via sinalização *outside-in* e *inside-out*. Atualmente, são conhecidos dezoito tipos de subunidades α e oito tipos de subunidades β que, combinadas, constituem pelo menos 24 integrinas já descritas (PASHOS *et al.*, 2009; NEAL & BERRY, 2006; ALBERTS, 2004; XIONG, 2002; KURSCHAT & MAUCH, 2000).

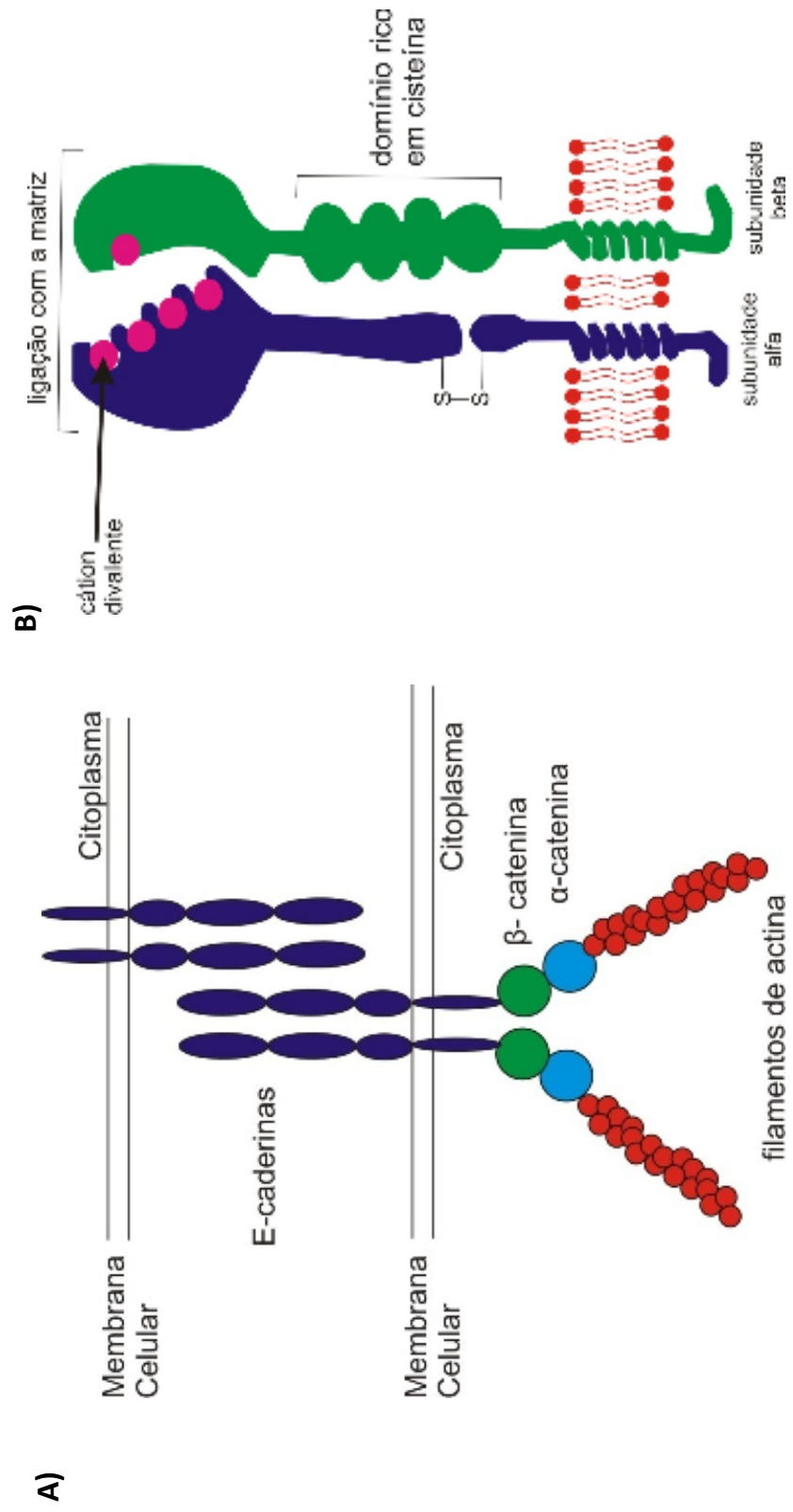


Figura 2. Adesão mediada pela E-caderina (A) e integrinas (B).

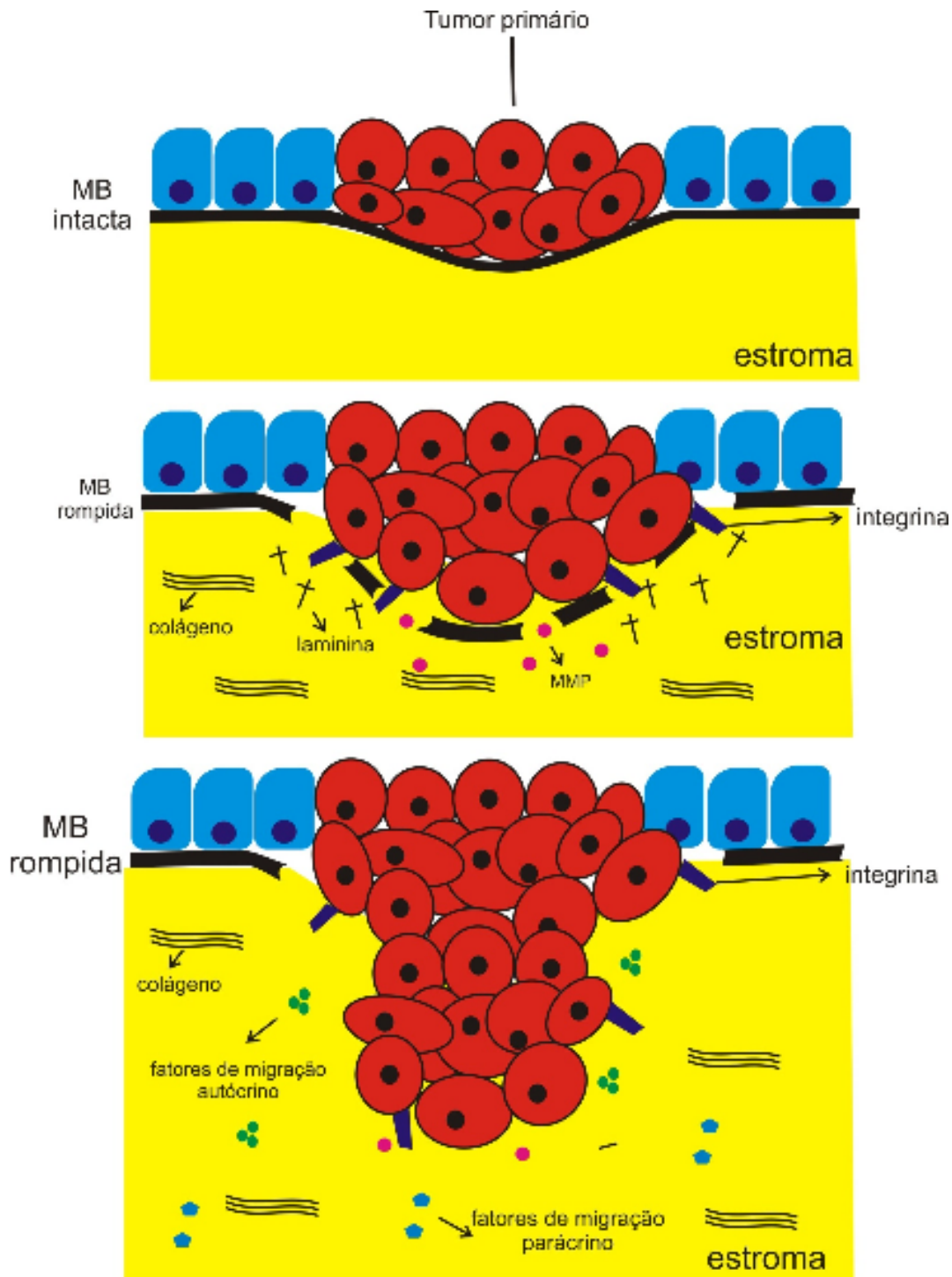


Figura 3. Invasão celular. As células tumorais aderem à membrana basal através de receptores de adesão do tipo integrina. Após a adesão, as células liberam proteases que irão degradar os componentes da MB e do estroma tumoral. Por fim, as células migram ao longo da matriz extracelular até alcançar a corrente sanguínea ou linfática. MB = Membrana Basal; MMP = Metaloproteinase.

As integrinas formam ligações heterofílicas, isto é, entre moléculas de adesão diferentes (integrina- fibronectina, por exemplo), ligando-se aos substratos da MEC. A interação entre a integrina e os componentes da MEC é alterada em cânceres metastáticos, como no melanoma, no qual a interação célula-matriz é deslocada do colágeno tipo IV e laminina (adesão mediada pelos melanócitos) para colágeno tipo I e vitronectina (adesão mediada pelo melanoma) (HAASS *et al.*, 2005), o que reflete na capacidade dessas células em invadir a derme (JOHNSON, 1999; NESBIT & HERLYN, 1994).

Além disso, as integrinas também participam de outras funções celulares que regulam a iniciação e progressão de malignidades: apoptose, motilidade celular, invasão e angiogênese. O aumento da expressão das integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_1$, por exemplo, é vital para a migração das células endoteliais durante a angiogênese. A integrina $\alpha_v\beta_3$ não é expressa nos melanócitos, mas é expressa no melanoma, o que permite a migração das células através de vários microambientes, promovendo metástase (PASHOS *et al.*, 2009; NEAL & BERRY, 2006).

2º Passo – Degradação enzimática:

Após a ligação aos elementos da MEC, o segundo passo percorrido pelas células é a degradação enzimática ativa dos componentes da membrana basal (MB) e do estroma tumoral, permitindo, assim, a migração celular (ZHAO *et al.*, 2008). As enzimas proteolíticas tanto são secretadas pelas células tumorais como também pelas células do hospedeiro (fibroblastos e macrófagos infiltrantes), os quais são induzidos, pelas células do câncer, a secretarem as enzimas proteolíticas. As principais enzimas que degradam os componentes da matriz extracelular são as designadas metaloproteinases da matriz (MMP) (TALLANT *et al.*, 2009).

As MMPs pertencem a uma família de enzimas com atividade zinco-dependente (WOESSNER *et al.*, 1998). São classificadas de acordo com seu domínio e organização estrutural, além do substrato específico para degradação. Apresentam diversas classes, dentre elas, as colagenases, as gelatinases, as estromelisinases, as matrilisinases e as MMPs ligadas à

membrana (MT-MMP), como demonstrado na tabela 1 (PEREIRA *et al.*, 2006).

Em condições fisiológicas normais, há uma rigorosa regulação da secreção das MMP, as quais são sintetizadas e secretadas como pró-enzimas, chamadas zimógenos, que posteriormente serão ativadas. Essa regulação ocorre apenas em momentos específicos, nos quais existem processos multifásicos de ativação dos zimógenos, além de haver vários inibidores sangüíneos e teciduais para monitorar a ação da proteinase (WOESSNER, 1991), como os inibidores teciduais das MMP (TIMP) (WOESSNER, 1991; DUFFY, 2000; MASKOS, 2003).

As MMPs mais estudadas são as gelatinases (MMP-2 e -9) devido ao seu papel crucial na progressão tumoral, atuando diretamente sobre os componentes da MB (figura 4). As gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9) possuem atividade proteolítica similar e degradam colágeno desnaturado, gelatina, colágeno tipo IV, V e XI e laminina (MURPHY & NAGASE, 2009). Durante o processo de invasão das células epiteliais neoplásicas, a MB representa a primeira estrutura a ser degradada. Por isso, as gelatinases têm merecido destaque em diversos estudos (PEREIRA *et al.*, 2006).

3º Passo – Migração Celular:

Após a atuação das enzimas proteolíticas sobre a MEC, as células precisam migrar ao longo da matriz extracelular até alcançar os vasos sanguíneos ou linfáticos e formar metástase. O mecanismo de migração celular é muito complexo (HOSOOKA *et al.*, 2001), dependente do córtex rico em actina existente abaixo da membrana citoplasmática (ALBERTS, 2004).

Três atividades distintas estão envolvidas nesse processo: a protrusão, na qual estruturas ricas em actinas são empurradas para fora da borda anterior da célula; ligação, em que o citoesqueleto de actina conecta-se através da membrana citoplasmática com o substrato; e tração, na qual uma massa citoplasmática é arrastada e puxada pra frente (Figura 5) (ALBERTS, 2004).

Tabela 1. Nomenclatura dos substratos degradados por alguns grupos das metaloproteinases de matriz (PEREIRA *et al.*, 2006).

Proteína	MMP	Alguns substratos específicos
Colagenases		Colágenos I, II e III
Colagenase 1	MMP-1	
Colagenase 2	MMP-8	
Colagenase 3	MMP-13	
Gelatinases		Gelatina e colágeno IV
Gelatinase A	MMP-2	
Gelatinase B	MMP-9	
Estromelisinases		Fibronectina e proteoglicanas
Estromelisinase 1	MMP-3	
Estromelisinase 2	MMP-10	
Matrilisinases		Fibronectina e colágeno IV
Matrilisinase 1	MMP-7	
Matrilisinase 2	MMP-26	
MMP ligadas à membrana		
MT1-MMP	MMP-14	Colágenos I, II, III, gelatina e fibronectina
MT2-MMP	MMP-15	Fibronectina e laminina
MT3-MMP	MMP-16	Colágeno III e fibronectina
MT4-MMP	MMP-17	Gelatina e fibronectina
MT5-MMP	MMP-24	Proteoglicanas
MT6-MMP	MMP-25	Gelatina

MMP: metaloproteinase da matriz, MT-MMP: MMP ligadas à membrana

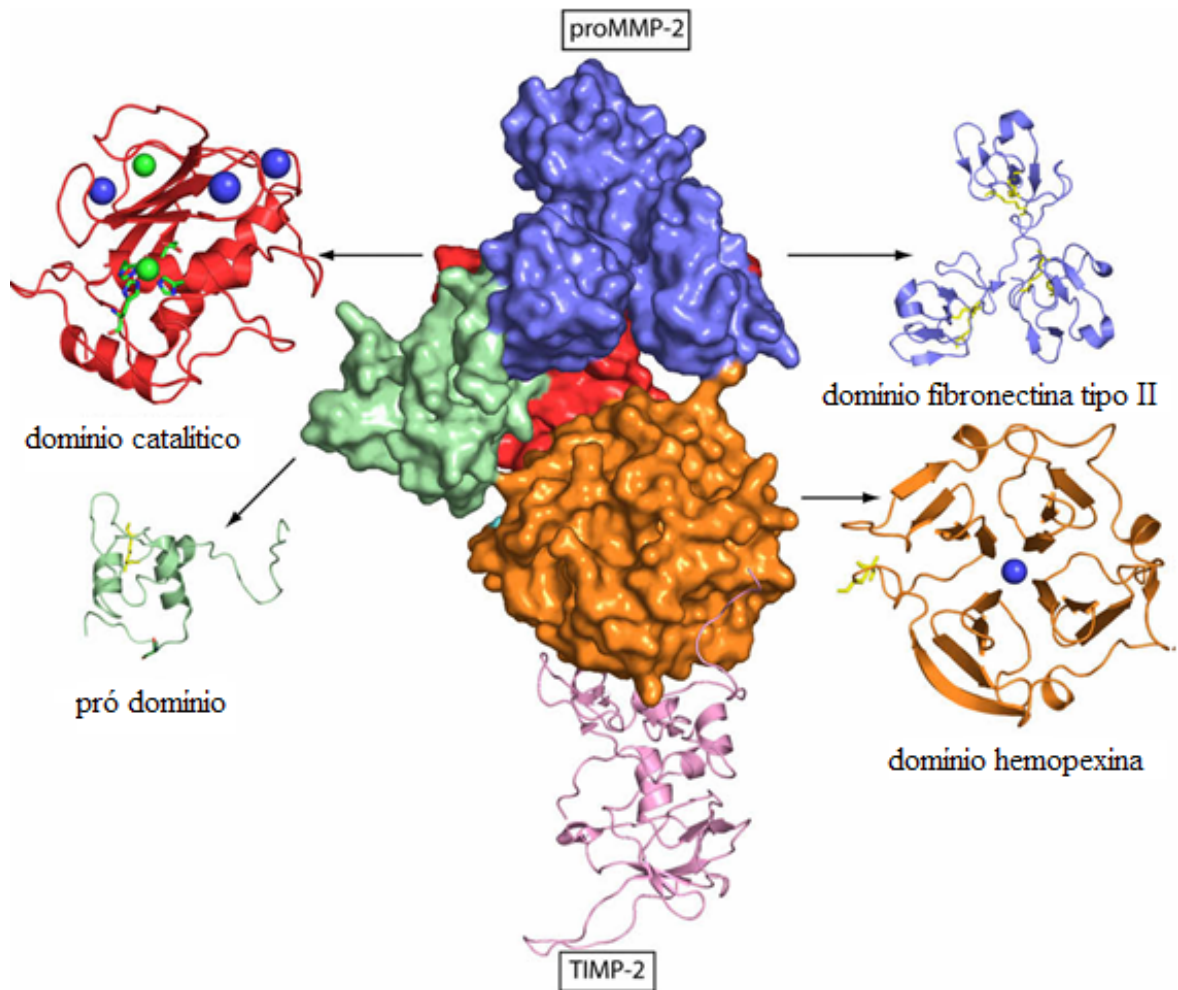


Figura 4. Diagrama tri-dimensional do complexo pro MMP-2 e TIMP-2 humano. O pró-domínio está representado em verde; domínio catalítico, em vermelho; domínio da fibronectina tipo II, em azul; domínio da hemopexina, em laranja; o TIMP-2 (inibidor), em rosa. Os íons de Zn^{2+} estão em esferas verdes, Ca^{2+} em esferas azuis e as ligações dissulfídicas em amarelos. FONTE: MURPHY & NAGASE, 2009.

Esse processo está relacionado com a produção de citocinas e alguns fatores de crescimento liberados pelas células neoplásicas (fatores de motilidade autócrinos) (COTRAN *et al.*, 1994), dependendo ainda da atividade quimiotática dos próprios produtos de degradação da matriz (fatores de motilidade parácrinos) (LIOTTA *et al.*, 1991; STRACKE *et al.*, 1987).

Após percorrerem os “Três Passos”, descrito por LIOTTA e colaboradores (1988), as células terão acesso à circulação sanguínea atravessando a membrana basal vascular (ROBBINS, 2004). Neste momento, é de suma importância a sobrevivência dessas células na corrente sanguínea, já que o ambiente é hostil para tal. Finalmente, este ciclo é repetido quando as células tumorais deixam a árvore vascular e se instalam na MEC do órgão distante, com a deposição de um nódulo metastático e a formação de novos vasos (angiogênese) que irão nutrir esse novo tumor (ROBBINS, 2004). Toda a cascata metastática está exemplificada na Figura 6.

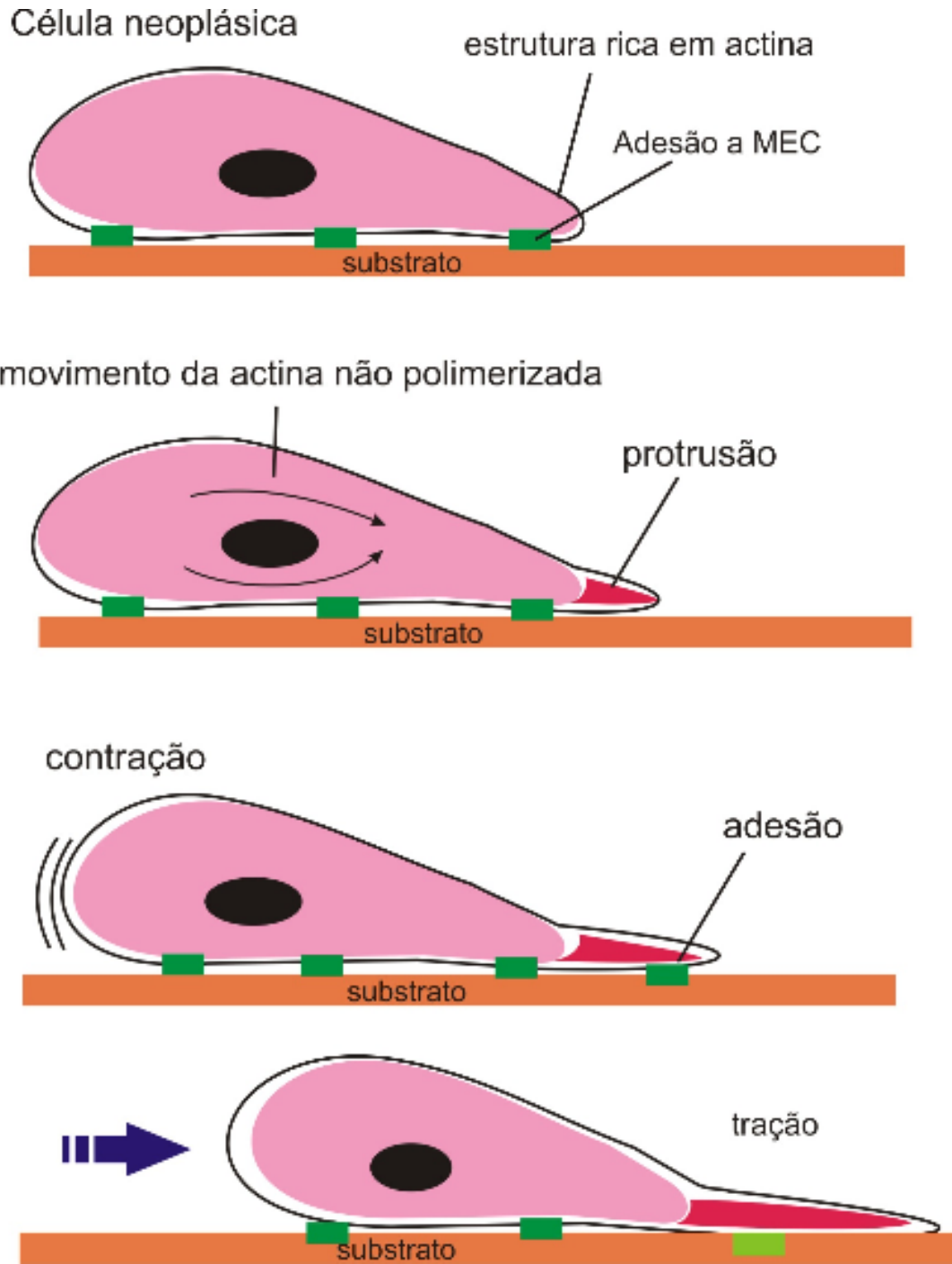


Figura 5. Migração da célula sobre substrato

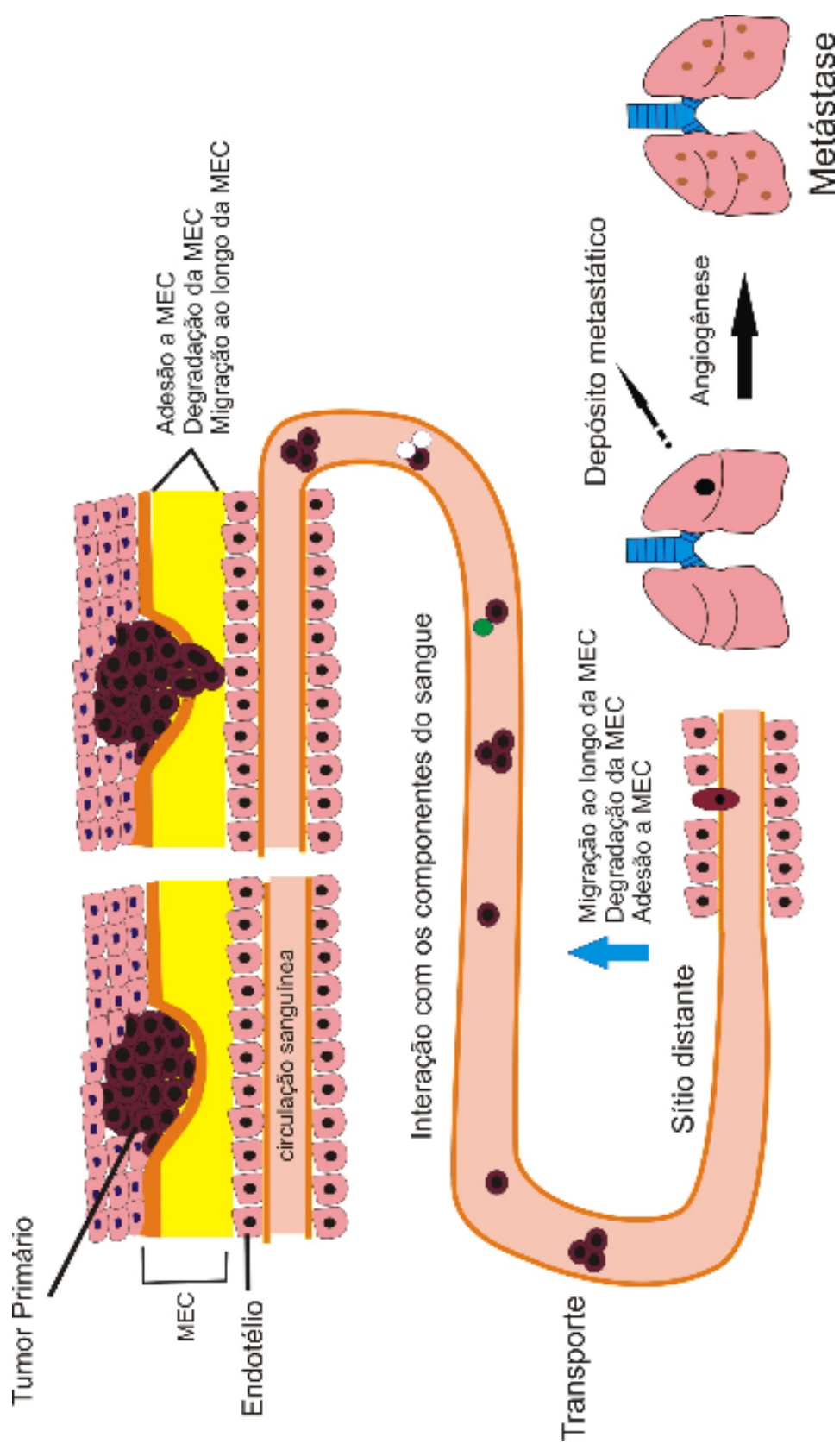


Figura 6. Cascata Metastática. MEC: Matriz extracelular; esferas brancas: plaquetas; esferas verdes: leucócitos.

1.2. Produtos Naturais

Desde os primórdios, os produtos naturais têm desempenhado um importante papel em todo o mundo para tratar e prevenir doenças humanas. No Brasil, 80% da população brasileira utilizam os produtos de origem natural como única fonte de recursos terapêuticos (FOGLIO *et al.*, 2006).

Os estudos dos produtos naturais têm sido ferramentas valiosas para a compreensão da biossíntese e como base para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças (CHIN *et al.*, 2005). Entre 1981 e 2002, por exemplo, das novas drogas lançadas no mercado farmacêutico, 28% são produtos naturais e 24% são derivados sintéticos destes, o que dá ênfase a importância dos estudos nessa área (GULLO *et al.*, 2006).

Dentre as diversas fontes encontradas na natureza, a maior contribuição para o desenvolvimento de substâncias terapêuticas deve-se às plantas, o que movimenta cerca de 30% do mercado farmacêutico mundial (KIRKPATRICK *et al.*, 2002). A pesquisa em plantas medicinais possibilitou a descoberta de vários fármacos para o tratamento do câncer, como os alcalóides bisindólicos vimblastina (**7**) e vincristina (**8**) isolados de *Catharanthus roseus* G., e seus derivados semi-sintéticos vindesina (**9**) e vinorelbina (**10**) (GUERITTE-FAHY, 2005; CRAGG & NEWMAN, 2005; NEWMAN & CRAGG, 2007).

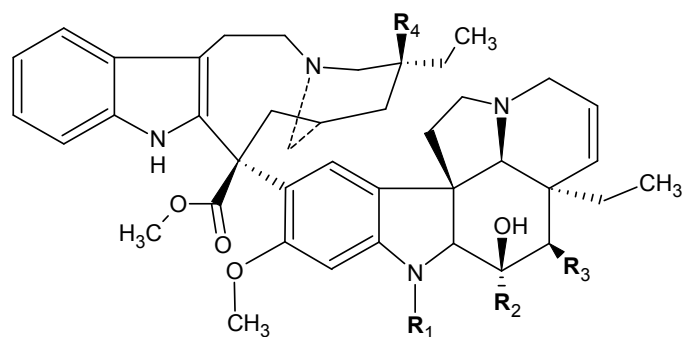
Em todo o mundo, entretanto, estima-se que apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos (FOGLIO *et al.*, 2006). Isso torna a elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como de seus mecanismos de ação, um dos maiores desafios para a química e a farmacologia atualmente (GEBHARDT, 2000; CRAGG & NEWMAN, 2005; CRAGG *et al.*, 2006; SUBRAMANIAN *et al.*, 2006; NEWMAN & CRAGG, 2007).

Apesar de existirem diversas drogas utilizadas para o controle do câncer em humanos, não existem drogas usadas na clínica que especificamente inibe

a formação de metástase (MENON *et al.*, 1999). A falta de tratamento das metástases torna necessária a inclusão de novos agentes eficazes que possam agir em uma das etapas da cascata metastática (invasão celular, sobrevivência na corrente sanguínea e angiogênese). Diante disso, a utilização dos recursos naturais pode fornecer uma solução para o desenvolvimento de fármacos com potenciais antimetastático.

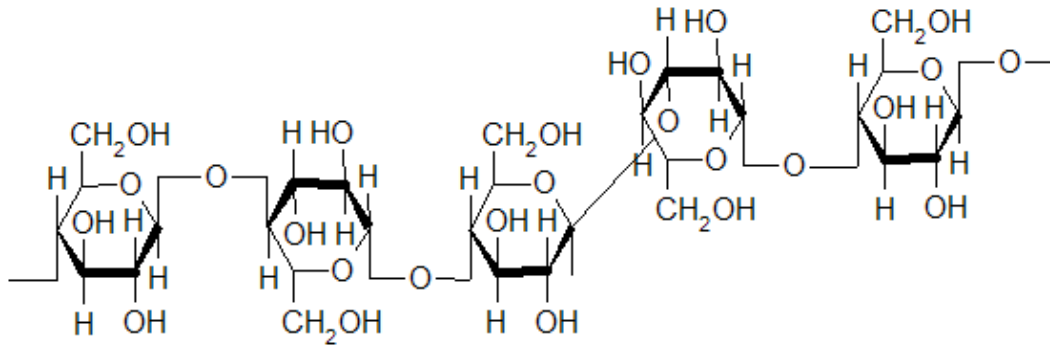
Neste aspecto, diversas substâncias têm sido bastante estudadas quanto ao seu potencial antimetastático, como o β -glucano (11), curcumina (diferuloilmetano) (12), piperina (13), limoneno (14), ácido perílico (15), carvona (16), withanólida (17) e amentoflavona (18). Entretanto, dentre essas substâncias nenhuma chegou ao estudo pré-clínico. Uma dos poucos produtos naturais em estudo clínico para o tratamento dos cânceres metastáticos é o Neovastat[®].

O medicamento Neovastat[®] (AE-941), desenvolvido pela companhia canadense AEterna Zentaris, não é uma substância isolada, mas um extrato líquido padronizado da fração <500 kDa da cartilagem de tubarão *Squalus acanthias*. Encontra-se em estudo clínico de fase 3 para o tratamento de carcinoma renal metastático e carcinoma pulmonar de células não-pequenas, em combinação com outros quimioterápicos ou com radioterapia. Seu mecanismo de ação se dá através da inibição das MMPs (MMP-2, -9 e -12) (FALARDEAU *et al.*, 2001), do bloqueio dos receptores do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (BELIVEAU *et al.*, 2002) e da indução seletiva de apoptose em células endoteliais. Entretanto, sua comercialização poderá, a longo prazo, vir a ser um problema ecológico, pois a produção do extrato depende diretamente do sacrifício de tubarões (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

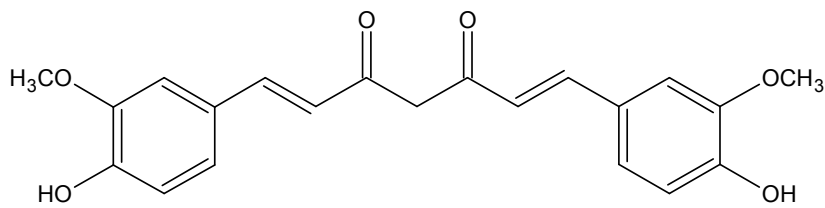


	R₁	R₂	R₃	R₄
Vimblastina (7)	CH ₃	CO ₂ CH ₃	OCH ₂ CH ₃	OH
Vincristina (8)	COH	CO ₂ CH ₃	OCH ₂ CH ₃	OH
Vindesina (9)	CH ₃	CONH ₂	OH	OH
Vinorelbina (10)	CH ₃	CO ₂ CH ₃	OCH ₂ CH ₃	H

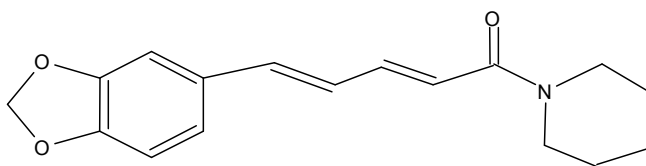
Figura 7. Estrutura química da vimblastina (7), vincristina (8), vindesina (9) e vinorelbina (10).



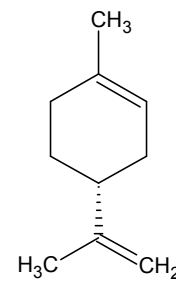
Beta-glucano (11)



Curcumina (12)



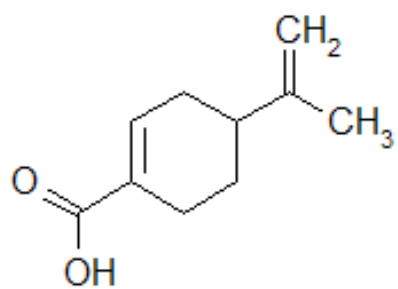
Piperina (13)



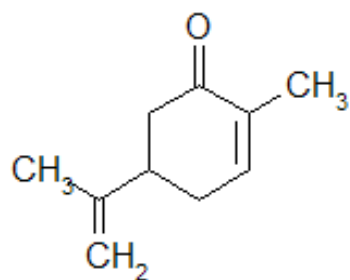
Limoneno

(14)

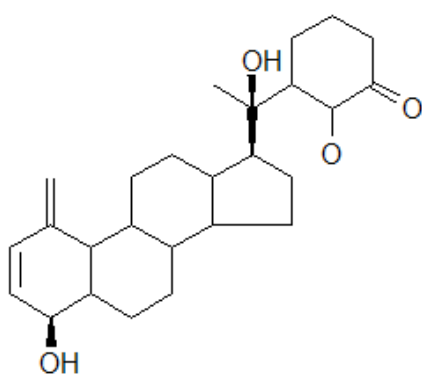
Figura 8. Estrutura química de algumas substâncias com potencial antimetastático.



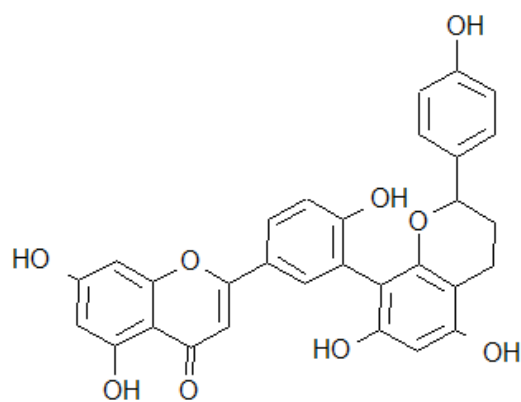
Ácido perílico (15)



Carvona (16)



Whitanolida (17)



Amentoflavona (18)

Figura 9. Estrutura química de algumas substâncias com potencial antimetastático.

1.2.1. Planta de estudo – *Capraria biflora*

A *Capraria biflora* L. (figura 10) é uma planta pertencente à família Schrophulariaceae com origem nas Antilhas e América do Sul, inclusive no nosso país (AQUINO *et al.*, 2007). Atualmente está situada nas zonas temperadas e áreas de clima tropical, sendo amplamente distribuída na América do Sul (Venezuela, Peru e Guiana Francesa); Na América Central (El Salvador, Trinidad-Tobago, Bahamas, Panamá, Curaçao, Guatemala e Porto Rico); Na América do Norte (Estados Unidos e México) e na Ásia (Índia e China) (CORRÊIA, 1984). No Brasil, a espécie está distribuída ao longo dos estados de Minas Gerais e Goiás e na costa entre os estados de Piauí e Espírito Santos (AQUINO *et al.*, 2007). É uma planta variável, herbácea ou arbustiva, cujo caule é ramoso, até 150 cm de altura (CORRÊIA, 1984).

A *C. biflora* é conhecida popularmente como “chá-da-terra”, “chá-do-méxico”, “chá-da-martinica”, “chá-do-rio”, “chá-da-américa”, “chá-das-antilhas” e “chá-de-lima” (AQUINO *et al.*, 2007). Suas folhas são utilizadas na medicina popular como agente analgésico, especialmente para cólicas menstruais e para dor pós-parto (CHERYL & LANS, 2007); no tratamento de hemorróidas e distúrbios reumáticos (ACOSTA *et al.*, 2003) e para os sintomas da febre, gripe, vômitos, inflamação pélvica e diarreia (VASCONCELLOS *et al.*, 2007). Além disso, esta planta é utilizada para problemas estomacais, desordens dermatológicas em geral, afecções do aparelho urinário, febrígura e como estimulante (SCOFIELD *et al.*, 2002; MATOS *et al.*, 2002).

Quanto aos seus efeitos biológicos, foi comprovada atividade analgésica central e periférica (ACOSTA *et al.*, 2003) e um potente efeito citotóxico e antiinflamatório (VASCONCELLOS *et al.*, 2007) do extrato aquoso das suas folhas.



Figura 10. Foto da espécie *Capraria biflora* com detalhes das folhas e flores (Foto de: T.L.G. LEMOS).

Em estudos realizados por AQUINO e colaboradores (2003), foi identificado qualitativamente as classes dos constituintes químicos presentes nas soluções hidroalcoólicas dos extratos das raízes, caule e folhas de *C. biflora*. Os resultados obtidos estão ilustrados na Tabela 2.

Tabela 2. Triagem fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos de raízes, caule e folhas de *Capraria biflora* (Aquino *et al.*, 2003) (+) presença; (-) ausência.

Classe fitoquímica	Extratos hidroalcoólicos		
	Raízes	Caule	Folhas
Alcalóide	-	-	-
Mono, Sesqui e Diterpenóides	+	+	+
Triterpenóides e Esteróides	+	+	+
Saponinas	-	-	-
Açúcares e polióis	+	+	+
Iridóides	-	-	-
Flavonóides	+	+	+
Fenilpropanoglicosídeos	+	+	+
Leucoantocianidinas e Proantocianidinas condensadas	+	-	-

Foi isolado a partir das raízes desta planta a biflorina (**19**), uma o-naftoquinona (GONÇALVES de LIMA *et al.*, 1953_a, 1953_b) com atividade antimicrobiana frente às bactérias GRAM-positivas álcool-ácido-resistentes e

alguns fungos (GONÇALVES de LIMA *et al.*, 1958; 1962; SERPA,1958). Esta quinona é o nosso objeto de estudo.

1.2.3. Substância de estudo: Biflorina

A biflorina (**19**) pertence a uma ampla e variada família de metabólitos secundários de distribuição natural chamada de quinonas(da SILVA *et al.*, 2003). As quinonas são compostos orgânicos cuja principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C.

Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídica: benzoquinonas – um anel benzênico; naftoquinonas - um anel naftalênico; antraquinonas - um anel antracênico linear ou angular (Figura 11) (da SILVA *et al.*, 2003).

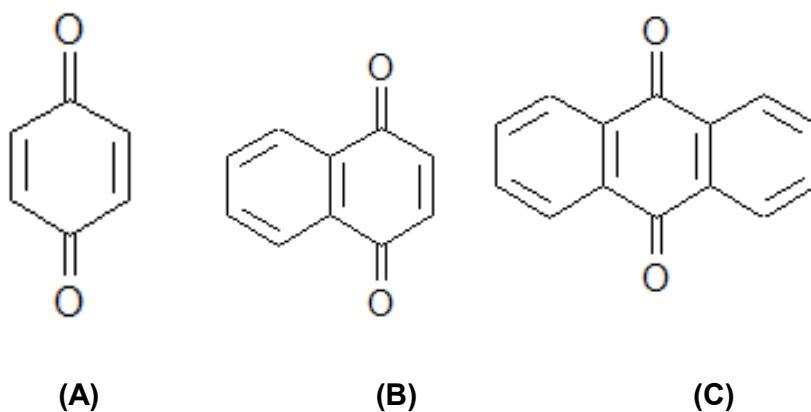


Figura 11. A) 1,4 p- benzoquinona; B) 1,4-naftoquinona; C) 9,10-anthroquinona.

Nossa substância de estudo é uma o-naftoquinona (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-bc]-piran-7,8-diona) de origem natural que pode ser

facilmente obtida das raízes da *Capraria biflora* L. (figura 10). Foi isolada pela primeira vez em 1953 por Gonçalves de Lima e colaboradores e seus dados de RMN de ^{13}C foram reportados pela primeira vez por Fonseca e colaboradores (2002).

Em 1954 a 1962, Gonçalves de Lima e colaboradores estudaram a atividade antimicrobiana da biflorina frente a diversos microorganismos, observando atividade antimicrobiana desta substância em diferentes métodos de extração. À medida que se avançavam os estudos para a obtenção da biflorina, tinha-se como resultado uma substância mais pura, com um menor valor de Concentração Mínima Inibitória (CMI), conseqüentemente mais ativa.

Em 1961, Gonçalves de Lima e colaboradores, comprovaram experimentalmente a fotossensibilidade da biflorina, verificando sua degradação por exposição à luz natural. Foi observado que seu produto de degradação continha duas substâncias, uma solúvel e outra insolúvel em éter de petróleo, e que ambas apresentavam atividade antimicrobiana menor em relação à própria biflorina, como mostrado na Tabela 3.

Além de sua atividade antimicrobiana, Lyra Junior (1999) observou sua atividade antifúngica frente a fungos dermatófitos.

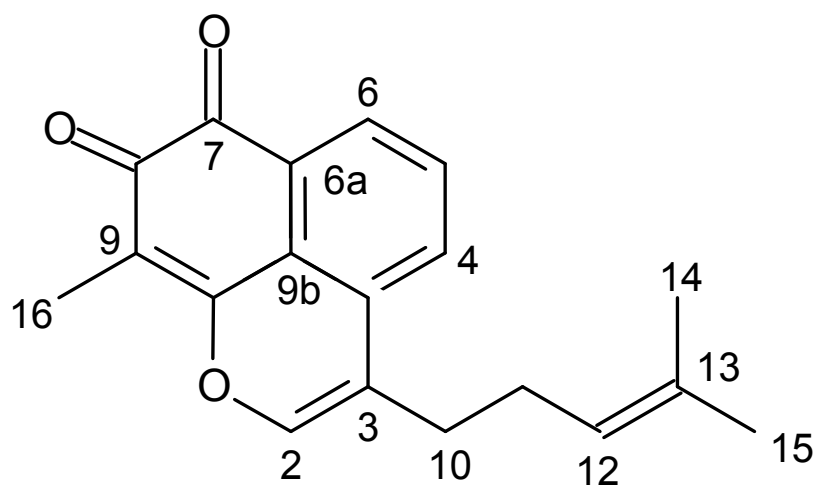


Figura 12. Estrutura química da biflorina (19), o-naftoquinona isolada das raízes da *Capraria biflora*.

O único caso clínico relatado com o uso da biflorina foi em 1958, onde uma pasta com 1% de biflorina cristalizada foi utilizada em um paciente de 14 anos, do sexo masculino, com lesão descrita da seguinte forma:

“Lesão eritematosa peribucal, abrangendo a parte externa dos lábios, a qual se estendia para cima até a altura do nariz, para baixo em toda a região mentoniana e lateralmente, sobre a face, até uns 5 cm além da comissura labial. A pele da área atingida apresentava-se edematosa com uma coloração vermelho forte e deixava exudar constantemente líquido claro e de cheiro pútrido em face do que o paciente mantinha constantemente um lenço sobre a lesão. No caso, o paciente queixava-se de forte sensação de ardência e prurido na zona afetada”.

Após coleta em diferentes pontos da lesão foi possível isolar um fungo identificado como *Trichosporon margaritipherum*. Foi utilizada a pasta de biflorina a 1%, veiculada em lanolina e vaselina, duas vezes ao dia. Após dois dias, a lesão apresentava-se com cor rósea, sem exudação, sem prurido e sem o odor pútrico. Após mais quatro dias o aspecto da pele em toda a área atingida era quase normal. O veículo da pasta foi trocado por uma substância de maior penetração, polietilenoglicol, constatando-se, após mais uma semana, o desaparecimento completo de qualquer vestígio de eritema (AQUINO *et al.*, 2006).

Além de seus efeitos antimicrobianos e antifúngicos, também foi demonstrado seu efeito citotóxico frente a cinco linhagens tumorais, elas: CEM e HL-60 (leucemia humana), B-16 (melanoma murino), HCT-8 (cólون humano) e MCF-7 (mama humano) (tabela 4) com ausência de potencial hemolítico quando avaliada frente a eritrócitos de camundongos, o que sugere que a citotoxicidade da biflorina não esteja relacionada à ruptura inespecífica da membrana plasmática (VASCONCELLOS *et al.*, 2005).

Além de seu alto poder citotóxico, foi estudada a atividade antitumoral da biflorina em ensaios *in vivo* utilizando animais transplantados com sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich. Nesses modelos, a biflorina demonstrou ter atividade antitumoral com baixa toxicidade, quando feita análise histopatológica do baço, rim e fígado. Além disso, apesar da baixa potência para a utilização da biflorina

isoladamente, quando associada com o 5-Fluouracil (5-FU) ela foi capaz de aumentar sua eficácia além de diminuir sua toxicidade sistêmica (VASCONCELLOS *et al.*, 2007).

Tabela 3. Concentrações mínimas inibitórias (CMI) da biflorina e de seus produtos de degradação pela luz natural (Gonçalves de Lima *et al.*, 1961)

Microorganismos	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
	Biflorina	Produto solúvel em éter de petróleo	Produto insolúvel em éter de petróleo
<i>Bacillus subtilis</i>	0,8 – 1,2	50,0	8,0 – 10,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,2 – 1,6	50,0	6,0 – 8,0
<i>Sarcina lútea</i>	0,1 – 0,2	40,0 – 50,0	1,0 – 2,0
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	20,0	50,0	50,0
<i>Escherichia coli</i>	20,0	50,0	50,0
<i>Brucella suis</i>	3,2 – 4,0	30,0 – 40,0	10,0 – 20,0
<i>Mycobacterium humanus</i>	20,0	50,0	40,0 – 50,0
<i>Nocardia asteróides</i>	6,8 – 8,0	50,0	10,0 – 20,0
<i>Candida albicans</i>	1,6 – 3,2	50,0	8,0 – 10,0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	20,0	50,0	50,0

Em experimentos realizados por Vasconcellos (2008), observamos, também, que a biflorina foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência dos animais transplantados com o melanoma B16 com ausência de toxicidade sistêmica. Inclusive, esse aumento de sobrevivência foi maior do que o do controle positivo (dacarbazina).

Como a linhagem celular murino B16, com baixa capacidade metastática (B16-F1) ou alta capacidade metastática (B16-F10), é extensamente utilizada como modelos experimentais para o estudo do processo metastático (ORTEGA, *et al.*, 2008) foi decidido estudar o potencial antimetastático da biflorina frente a modelos *in vivo* e *in vitro* utilizando as linhagens celulares B16-F10 (melanoma murino) e MDAMB-435 (melanoma humano), ambas com potencial metastático.

Tabela 4. Citotoxicidade da biflorina frente a linhagens tumorais (VASCONCELLOS *et al.*, 2004)

Linhagem celular	Biflorina IC₅₀ (µM)	Etoposídeo IC₅₀ (µM)	Doxorrubicina IC₅₀ (µM)
B16	1,20	0,19	0,05
MCF-7	1,30	>9,85	0,34
HCT-8	2,80	0,18	0,07
HL-60	6,30	0,02	0,03
CEM	3,30	0,05	0,03

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Avaliar o potencial antimetastático da biflorina, em ensaios *in vivo* e *in vitro*.

2.2. Específicos

- Avaliar o efeito da biflorina na metástase experimental *in vivo* e seu efeito na sobrevivência;
- Avaliar os parâmetros histopatológicos dos pulmões dos animais tratados com a biflorina.
- Avaliar a ação da biflorina na inibição da adesão celular das linhagens B16-F10 e MDAMB-435 sobre o colágeno tipo I;
- Avaliar a ação da biflorina sobre a migração celular das linhagens B16-F10 e MDAMB-435;
- Avaliar o efeito da biflorina sobre a atividade das MMP-2 e-9 das células B16-F10 utilizando o ensaio de Zimograma em gelatina.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais utilizados

3.1.1. Equipamentos

- Agitador de placa, MLW modelo Thys 2
- Agitador vortex, AD8850
- Balança analítica, GEHAKA AG200
- Balança pra pesar animais, Filizola
- Banho-Maria, MOD. 105 DI DELLTA
- Centrífuga centimicro, FANEM Modelo 212
- Centrífuga de placas Eppendorf, Modelo Centrifuge 5403
- Centrífuga excelsa Baby I, FANEM Modelo 206
- Contador manual, Division of Bexton, Dickinson and Company
- Destilador de água
- Espectrofotômetro de placas, DTX 880 multimode detector, Beckman Coulter
- Espectrômetro de massas, Micromass, Quattro MicroTM
- Electrophoresis Power supply EPS – 300
- Fluxo laminar, VECO
- Incubadora de células (CO₂ Water-Jacket Incubator), NUAIRES TS Autoflow
- Microscópio óptico, Metripex Hungray PZO-Labimex Modelo Studar lab
- Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot

- Pipetas automáticas, Gilson
- Sistema HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência ou CLAE), Shimadzu

3.1.2. Reagentes e Substâncias

- Ácido Acético, Vetec
- Ácido Clorídrico, Vetec
- Aminoácido não essenciais humano, Gibco
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), Proquímios
- Acrilamida, Sigma
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), Sigma
- Bis-acrilamida, Sigma
- Coomassie Brilliant Blue R-350, PhastGel Blue R
- Colágeno tipo I, Sigma
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Vetec
- Etanol, Vetec
- Eosina, Vetec
- Formaldeído, Dinâmica
- Gelatina, Sigma
- Hematoxilina, Doles
- Meio de cultura para células RPMI, Cultilab
- Metanol, Vetec
- Piruvato de sódio, Gibco
- Solução de vitamina humana, Gibco
- Soro fetal bovino (SFB), Cultilab

- Soroalbumina bovina (BSA), Sigma
- SDS (dodecilsulfato de sódio), Sigma
- Tris-Base, Sigma
- Triton-X-100, Vetec

3.1.3. Fármacos

- Doxorubicina, Sigma
- Estreptomicina, Cultilab
- Mitomicina-C, Sigma
- Penicilina, Cultilab

3.1.4. Comitê de Ética

Todos os procedimentos envolvendo a utilização de animais realizados no presente estudo seguiram as recomendações do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA, respeitando a legislação vigente, e sob autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (protocolo nº 52/08, Anexo 1).

3.1.5. Manutenção das células

As linhagens celulares de melanoma murino B16-F10 e melanoma humano MDAMB-435 foram obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD). As linhagens foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL). O meio utilizado foi o RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina), 1,5% de aminoácidos não essenciais, 1% de solução de vitamina humana e 1% de piruvato de sódio para a linhagem

B16-F10 e RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) para a linhagem MDAMB-435. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio era trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Quando necessário, utilizava-se tripsina + EDTA (0,25%) para que as células se desprendessem das paredes da garrafa.

3.1.6. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos linhagem C57Bl/6 (“black”) fêmeas com 60 dias de idade, pesando entre 25 – 30 g fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e alojados no biotério experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC.

Os animais foram mantidos sob condições controladas de higiene, iluminação (ciclo de claro/escuro de 12h), temperatura (25°C), recebendo água e alimentação *ad libitum* durante todo o experimento. Respeitou-se um período de adaptação de sete dias antes do início dos experimentos.

3.2. Obtenção da biflorina das raízes da *Capraria biflora*.

A planta foi coletada em 2008, em uma plantação no município de Fortaleza, e identificada pelo professor Edson de Paula Nunes (Universidade Federal do Ceará). A exsicata (nº 30.849) foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

A obtenção da biflorina foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará pela estudante Luciana Gregório de Souza Silva sob orientação da professora Dr^a Telma Leda Gomes de Lemos.

As raízes (4,5 kg) foram secas e pulverizadas. O material obtido foi extraído com éter de petróleo (4 L) durante duas horas e parcialmente evaporado a temperatura ambiente até a formação de um material sólido. Este material foi filtrado a vácuo com o surgimento de um sólido roxo (1 g). Foi feita cromatografia em Sílica Gel e eluição isocrática através de uma mistura binária de Éter de Petróleo e Acetato de Etila 9:1 (v/v). As frações foram obtidas através da cromatografia de camada delgada (CCD). Para a identificação da biflorina foram realizadas análises de espectroscopia (Ressonância Nuclear Magnética) além de comparações das suas propriedades físicas com os presentes na literatura.

3.3. Ensaio de metástase experimental

3.3.1. Princípio do Teste

A indução da metástase experimental foi feita utilizando células transplantáveis de melanoma murino (B16-F10). Esta linhagem foi estabelecida por Fidler (1973) oriunda do melanoma de ocorrência natural de camundongo C57BL/6 que, por meio da seleção progressiva, obteve o isolamento de variantes com diferentes graus de potencial metastático.

Estas células, quando inoculadas por via subcutânea, apresentam a capacidade de multiplicação neoplásica sem propiciar o desenvolvimento de metástase, enquanto que, quando inoculadas via endovenosa, desenvolvem nidação em parênquima pulmonar formando nódulos macroscópicos na superfície dos pulmões, passíveis de serem contados.

3.3.2. Procedimento Experimental

Para a indução da metástase experimental as células B16-F10 (106 cels/0,5 mL) foram inoculadas via veia lateral caudal de camundongos C57Bl/6 fêmeas. Os animais foram divididos em 3 grupos de 16 animais como se segue: grupo controle (GC), grupo tratado com biflorina 25 mg/kg/dia (GT1) e

grupo tratado com biflorina 50 mg/kg/dia (GT2). Após 24h da inoculação das células tumorais, os animais foram tratados com DMSO 10% (GC), biflorina 25 mg/kg/dia (GT1) ou biflorina 50 mg/kg/dia (GT2) em injeção via intraperitoneal (i.p.) durante 21 dias consecutivos. Ao final do tratamento, 8 animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o pulmão retirado e fixado em solução tampão de formaldeído a 10%. Os nódulos negros visíveis do pulmão foram contados com o auxílio de uma lupa. Após a contagem, foi feita análise histopatológica dos pulmões. Os demais animais restantes foram mantidos para avaliar a sobrevida.

3.3.3. Análise dos Dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para análise da taxa de sobrevida foi feita análise de Kaplan-Meier.

3.4. Análise histopatológica

Os pulmões foram retirados do formol e seccionados em pequenas fatias para posterior preparação das lâminas. O material foi fixado em formol a 10% por 24 horas, desparafinado em xilol por 15 minutos, e desidratado em concentrações crescentes de álcool até 70% (mergulhando-se rapidamente as lâminas), sendo posteriormente lavadas em água destilada até ter sido removido todo o álcool. Posteriormente as lâminas foram coradas com Hematoxilina 0,1%.

3.5. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

3.5.1. Princípio do teste

A avaliação do potencial citotóxico da substância teste foi realizada nas células B16-F10 (melanoma murino) e MDAMB-435 (melanoma humano) através do método do MTT após 72 horas de incubação. Este é um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido por Mossman em 1983 para estimação de proliferação e sobrevivência celular. Este teste baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor azul escura. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

3.5.2. Procedimento experimental

A biflorina foi incubada em diluição seriada durante 72 horas juntamente com as células. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200µL da solução de MTT (10% de meio RPMI 1640 sem soro) e foi reincubada por 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% de CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min.), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensão em 150µL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido as placas foram lidas no comprimento de onda de 550 nm.

3.5.3. Análise dos dados

Biflorina foi testada em diluição seriada, em triplicata. Foi registrado o gráfico absorbância X concentração e determinado sua IC₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir da regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software).

3.6. Ensaio de Crescimento Tumoral – MTT

3.6.1. Princípio do Teste

O mesmo para o ensaio de citotoxicidade (ver anteriormente: **3.5.1**). Este ensaio foi utilizado para determinar que as concentrações a serem utilizadas nos ensaios *in vitro* de adesão e migração não alteram o crescimento tumoral.

3.6.2. Procedimento experimental

A biflorina foi incubada (0; 0,32; 1,62 e 2,34 μM) durante 24 horas juntamente com as células. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. O procedimento é o mesmo que o item **3.5.2**.

3.6.3. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.7. Ensaio de Inibição da Adesão Celular - MTT

3.7.1. Princípio do Teste

Adesão celular consiste num processo complexo envolvido na embriogênese, migração, invasão e remodelagem tissular. Para promover esses processos, as células precisam aderir aos componentes da matriz

extracelular (via receptores de adesão), formando complexos com os componentes do citoesqueleto, a qual afeta a motilidade celular, diferenciação, proliferação e sobrevivência. O ensaio de adesão *in vitro* permite determinar se a substância teste interfere neste processo. A quantidade de células aderidas é quantificada pelo MTT (MOSMANN, 1983; BERRIDGE; TAN, 1993).

3.7.2. Procedimento Experimental

O colágeno tipo I diluído em ácido acético 0,1% foi imobilizado por 16h a 4°C *overnight* em placas de 96 poços (0,01 mg/mL / 100 µL / poço). Decorrido o tempo de imobilização do colágeno, foi feito o bloqueio dos poços com 200 µL de BSA 1% para garantir que a adesão das células ocorra somente à proteína imobilizada nos poços, já que sobre o BSA não ocorre adesão. Após 1h de incubação com o BSA, as células foram tripsinizadas, contadas e centrifugadas por 10 min. a 2.000 rpm. Após este procedimento, o pellet formado foi ressuspensão em meio RPMI sem soro e as células B16-F10 (2×10^5 / mL) e MDA-MB 435 (5×10^5 / mL) foram plaqueadas na presença e na ausência da biflorina (0,32; 1,62 e 2,34 µM para B16-F10 e 0,11; 0,81 e 1,17 µM para MDAMB-435) por 60 min. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado. Em seguida, foi adicionado 150µl/poço de MTT (10% em meio RPMI sem soro) e a placa incubada por mais 3 horas. Após este período as placas foram centrifugadas (3000 rpm / 10 min.) e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi ressuspensão com 150µL de DMSO. A coloração foi quantificada por leitura da absorbância a 550nm. Os valores de absorbância são diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis aderidas.

3.7.3. Análise dos Dados

Foi feito um gráfico absorbância vs concentração da droga e os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância

(ANOVA) seguida do teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.8. Ensaio de Migração Celular por Cicatrização (*Wound Healing*)

3.8.1. Princípio do Teste

Migração celular é um fenômeno essencial para o processo de invasão e metástase. Quando realizado uma cicatriz na monocamada de células na placa, as células com alta capacidade migratória ultrapassam essa linha, tornando possível o estudo de drogas que possam interferir nesse mecanismo (BRITO *et al.*, 2005).

3.8.2. Procedimento Experimental

O ensaio de migração celular foi baseado no modelo descrito por Bürk e colaboradores (1973), com adaptações. As células utilizadas para o ensaio, B16-F10 e MDAMB-435 foram plaqueadas na concentração de $2,0 \times 10^5$ em placa de 24 poços, em meio de cultura. As células foram mantidas por 72 horas em estufa, após plaqueamento, para adquirirem a confluência necessária. Em seguida os poços foram tratados com $5 \mu\text{g/mL}$ de mitomicina C (antiproliferativo) por 15 minutos. O pré-tratamento com mitomicina C garante que as células estejam migrando e não proliferando. Os poços foram lavados 3x com tampão salina fosfato estéril (PBS) e foi acrescentado 1 mL de meio em cada poço onde foi feita uma lesão na monocamada com a ponta da ponteira de cima para baixo com a formação de uma fenda. Os poços foram lavados 3x com PBS e acrescentado 1 mL de RPMI sem soro. Neste momento foram acrescentadas concentrações não-citotóxicas da biflorina (0,32; 1,62 e $2,34 \mu\text{M}$ para B16-F10 e 0,11; 0,81 e $1,17 \mu\text{M}$ para MDAMB-435). Foi observada a migração após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação com o composto. No tempo de 24h os poços foram fotografados.

3.8.3. Análise dos Dados

A análise foi feita visualmente (análise qualitativa).

3.9. Zimografia em gel de poliacrilamida em SDS co-polimerizado com gelatina

3.9.1. Princípio do teste

A zimografia é uma técnica pelo qual a matriz em que as proteínas serão separadas é composta por poliacrilamida co-polimerizada com determinados substratos, com a finalidade de se identificar atividades enzimáticas manifestadas por proteínas específicas. Este ensaio foi realizado para avaliar se a biflorina poderia agir ao modular a atividade enzimática das MMP-9 e -2.

3.9.2. Protocolo Experimental

Amostras: As células B16-F10 foram tratadas na presença e na ausência da biflorina (0; 0,32; 1,62 e 2,34 μ M) por 24h e mantidas em placas revestidas com colágeno do tipo I. Após esse tempo de incubação, o meio de cultura foi retirado e centrifugado (12.000 rpm / 5 min.). Após este período, o sobrenadante foi transferido para outro eppendorf e foi realizada a quantificação das proteínas totais utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976), usando a curva do albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A quantidade de proteína utilizada no ensaio foi de 15 μ g.

Zimografia: Foram feitos gel de poliacrilamida (12,5 %) contendo 0,1 % de gelatina segundo metodologia descrita por Macedo e colaboradores (2004). As corridas eletroforéticas foram desenvolvidas de acordo com o método descrito por Laemmili (1970) adaptado para o uso de géis de separação em placas. O gel de aplicação, contendo 3,5 % de poliacrilamida foi montado utilizando tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 10 %. O gel de separação,

contendo 12,5 % de poliacrilamida, foi montado em uma solução tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8, contendo SDS 10 %.

As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,325 M, pH 6,8), contendo 5 % de SDS e 10 % de glicerol e traços de azul de bromofenol. Em seguida, soluções contendo 15µg de proteínas aplicadas nos poços do gel de aplicação e separadas por eletroforese. A corrida eletroforética foi conduzida a uma voltagem constante de 100 V e 25 mA (Electrophoresis Power supply EPS – 300) por placa a 25 °C utilizando Tris 0,025M pH 8,3 contendo glicina 0,192M e SDS 0,1 % como tampão de corrida.

Após eletroforeses, os géis foram incubados em uma solução de Triton X-100 2,5 % em água por 40 min. a 25 °C sob agitação constante. Após esse período, os géis foram incubados em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 com CaCl₂ 10 mM por 16 h a 37 °C. Em seguida, os géis foram corados com uma solução de azul brilhante de Coomassie R-350 0,1 % em água: ácido acético: metanol (8:1:3,5 v/v/v) durante 4 horas e descorados com a mesma solução na ausência do corante, permitindo assim a visualização das bandas protéicas.

3.9.3. Análise estatística

A avaliação da atividade proteolítica deu-se com o aparecimento de regiões mais claras no gel, contrastando com o fundo azul (resultado da digestão do substrato presente na matriz poliacrilamida-gelatina).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio *in vivo* de metástase experimental e sobrevida

Para avaliar o potencial antimetastático *in vivo* desta o-naftoquinona, foi realizado o ensaio de metástase experimental (colonização) em camundongos C57Bl/6 (*Black*) utilizando a linhagem B16-F10 (alto poder metastático) inoculadas via veia caudal ($10^6 / 0,5$ mL). Neste ensaio a biflorina (25 mg/kg/dia e 50mg/kg/dia, i.p.) foi capaz de inibir a formação de nódulos metastático ($60,71 \pm 7,1$ e $46,43 \pm 1,75$, respectivamente) quando comparado ao controle ($161,83 \pm 8,16$) (figura 15) com 57 % e 71 % de inibição.

O efeito da biflorina sobre a taxa de sobrevida dos animais transplantados com as células do melanoma B16-F10 também foi avaliado. Neste ensaio, os animais foram tratados com biflorina (25 mg/kg/dia e 50 mg/kg/dia i.p.) por 21 dias. A taxa de sobrevida dos animais tratados com biflorina foi significativamente aumentada. Os animais controle sobreviviam em média $22,3 \pm 1,9$ dias, enquanto que os animais tratados com a biflorina sobreviveram em média $24,4 \pm 0,5$ e $25,3 \pm 0,42$, respectivamente. O tratamento com a biflorina aumentou 57% e 71% respectivamente (figura 16).

4.2. Análise histopatológica dos pulmões

As análises histopatológicas dos pulmões dos animais tanto do grupo controle quanto do grupo tratado demonstraram a presença de células do melanoma no parênquima pulmonar (setas brancas), o que comprova a formação dos focos metastáticos. Todavia, pode ser observada a diminuição do número de colônias metastáticas formadas nos grupos tratados em comparação com o grupo controle (figura 17).

Nesta análise também é observada a presença de hemácias (setas vermelhas) e pigmentos de hemossiderina (setas verdes) nos grupos tratados (Figura 17), o que demonstra a existência de microhemorragia recente e tardia, um provável efeito colateral.

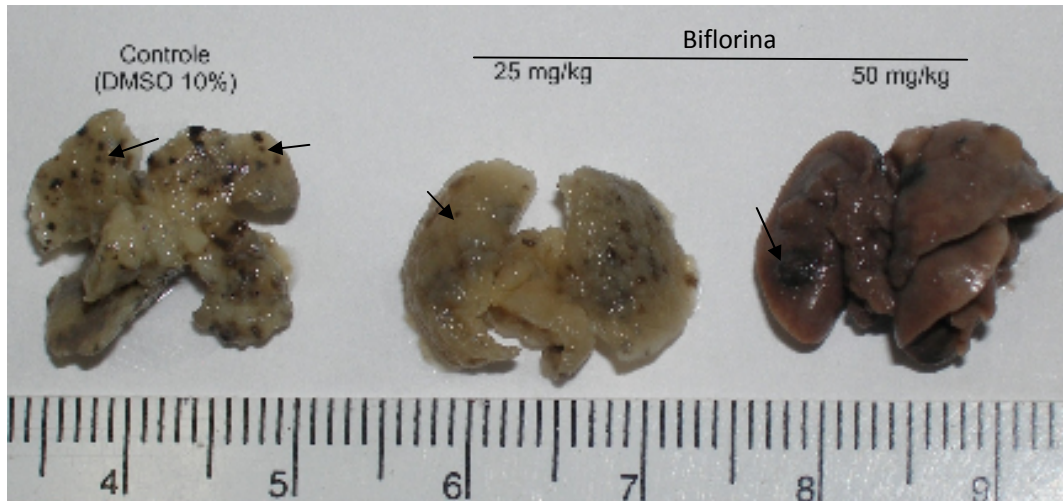


Figura 13. Pulmão com nódulos metastáticos: Grupo controle recebeu DMSO 10%, i.p.; Grupo tratado com biflorina a 25 mg/mL/dia i.p. e grupo tratado com biflorina a 50 mg/mL/dia i.p. Foi inoculada 10^6 células (B16F10) via veia lateral caudal de camundongos C57BL/6 e após 21 dias de tratamento os animais foram sacrificados e o pulmão retirado para a contagem dos nódulos metastáticos. Setas pretas: nódulos metastáticos

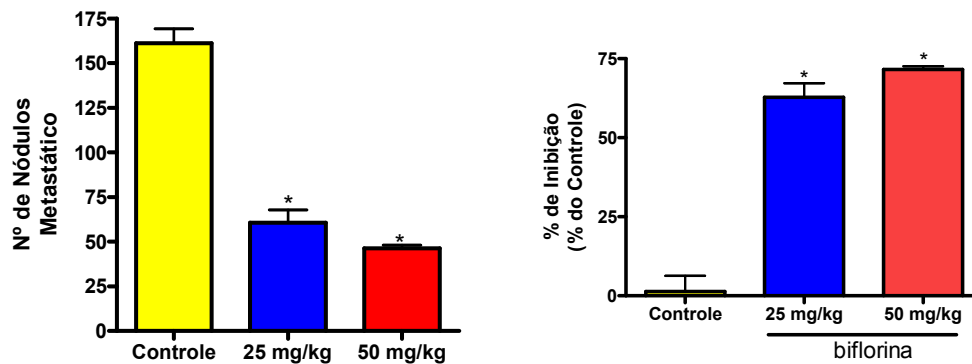


Figura 14. Efeito da biflorina sobre a metástase experimental induzida por injeção intravenosa do melanoma murino B16-F10 (10^6 i.v.) em camundongos C57BL/6. Os animais foram tratados por 21 dias com biflorina (25 mg/kg/dia e 50 mg/kg/dia, i.p.) e 24h após o último dia de tratamento, os animais foram sacrificados, os pulmões retirados, fixados em formol 10% e o número de nódulos pulmonares contados. Os animais controle receberam DMSO 10%. * $p < 0,001$.

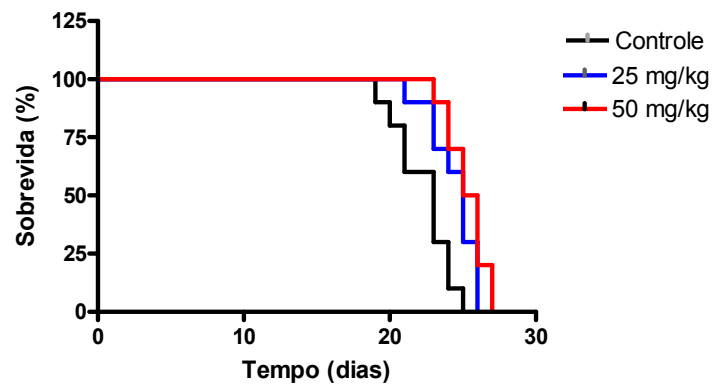


Figura 15. Efeito da biflorina sobre a taxa de sobrevivência dos animais transplantados com as células do melanoma B16-F10 (10^6 células i.v.). Os animais foram tratados com biflorina (25mg/kg/dia e 50mg/kg/dia i.p.) durante 21 dias. Animais controle receberam DMSO 10%. Os dados são resultados de um experimento. $P < 0,05$, χ^2 para o tempo de sobrevivência em animais tratados com a biflorina.

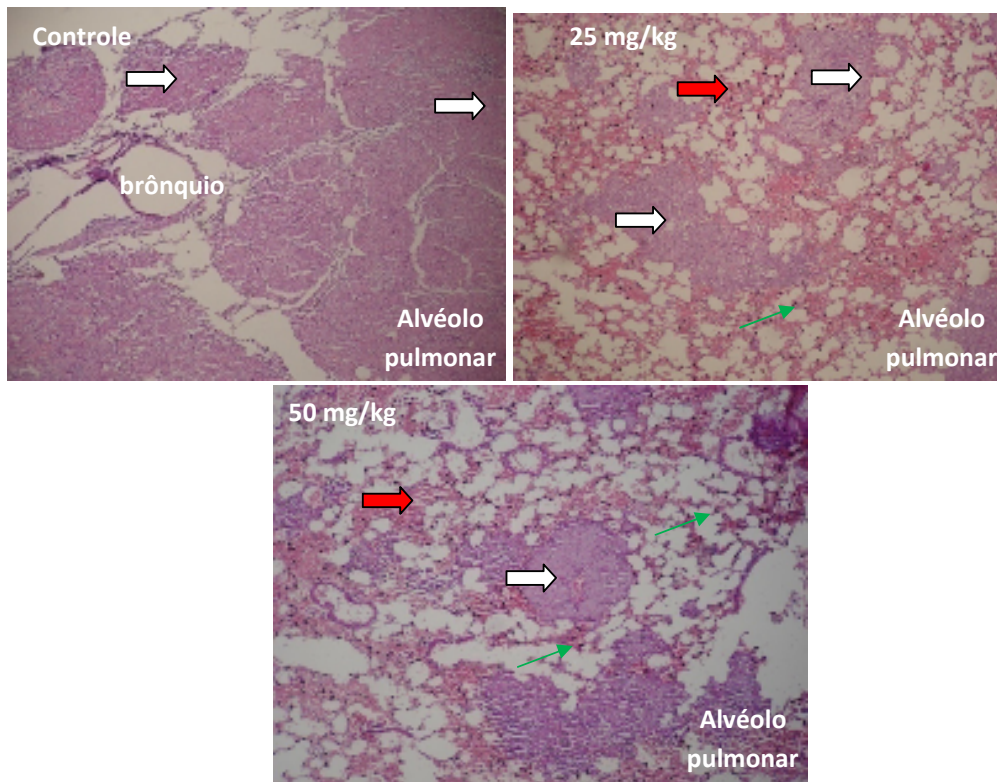


Figura 16. Análise histopatológica dos pulmões de camundongos transplantados com células tumorais B16-F10 via veia caudal. Os animais foram tratados diariamente com a biflorina (25 e 50 mg/mL, i.p.). Após 21 dias de tratamento os animais foram sacrificados e o pulmão retirado e fixado em solução de formaldeído 10%. Controle recebeu DMSO 10% i.p. Setas brancas: melanoma, seta verde: hemossiderina e seta vermelha: hemácia. Aumento de 100X

4.3. Citotoxicidade pelo MTT

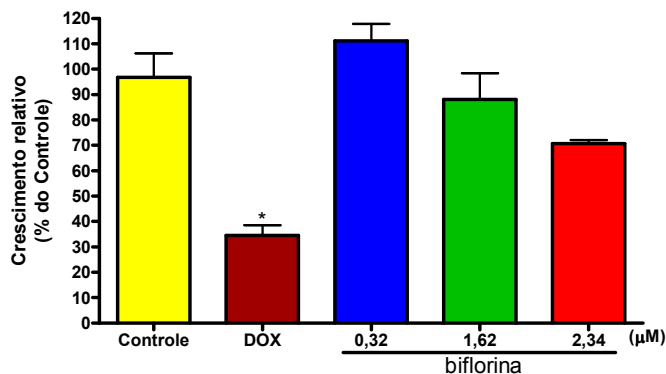
A avaliação da atividade citotóxica da biflorina sob a célula B16-F10 (melanoma murino) e MDAMB-435 (melanoma humano) foi realizada pelo método do MTT. As CI_{50} , determinadas após 72 h de incubação com as substâncias estão representadas na tabela 5. A biflorina teve atividade citotóxica concentração-dependente em ambas as linhagens.

Tabela 5. Efeito inibitório da biflorina e da doxorrubicina (controle positivo) das células B16-F10 e MDAMB-435. Os valores apresentados referem-se a CI_{50} (μM) e o intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear.

Linhagem Celular	Biflorina IC_{50} μM	Doxorrubicina IC_{50} μM
B16-F10	5,64 (5,315 – 5,735)	0,05 (0,02 – 0,10)
MDAMB-435	2,36 (2,020 – 2,545)	0,81 (0,74 – 0,95)

Como a biflorina foi citotóxica em ambas as linhagens, foi avaliado o seu efeito sobre o crescimento celular destas linhagens em 24 h de incubação, o tempo máximo dos ensaios *in vitro*, utilizando o método do MTT (figura 18) utilizando três concentrações, elas: 0,32; 1,62 e 2,34 μM para a linhagem B16-F10 e 0,11; 0,81 e 1,17 μM para a linhagem MDAMB-435. Nestas concentrações foi observado que não ocorre alteração significativa no crescimento tumoral.

A)



B)

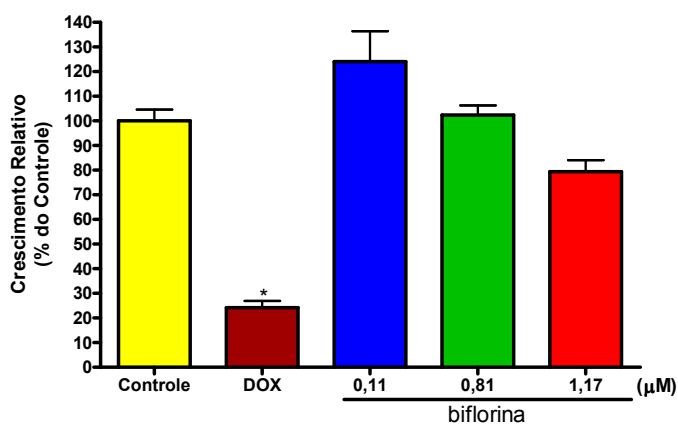


Figura 17. Efeito da biflorina sobre o crescimento das células do melanoma murino B16-F10 (A) e melanoma humano MDAMB-435 (B). As células foram incubadas com várias concentrações da biflorina ou doxubicina (DOX; 1,72 μM) por 24 h. Solução de MTT foi adicionada aos poços e estes incubados por 3h a 37°C. Após a incubação a placa foi lida em absorbância de 550 nm. O crescimento tumoral foi expresso em % do controle tratado apenas com o veículo utilizado para diluir a droga. Cada barra mostra a média ± EPM em três experimentos independente em triplicata. *P < 0,01 comparado com controle por one-way ANOVA seguido por teste de Dunnet.

4.4. Adesão Celular

Para avaliar o efeito da biflorina sobre o processo de adesão celular (célula-MEC), foi realizado ensaio utilizando as células B16-F10 e MDAMB-435 sob o colágeno do tipo I, um dos constituintes da MEC. Sabe-se que drogas que possam interferir nessa etapa são candidatas promissoras para o desenvolvimento de drogas antimetastáticas.

Neste ensaio, a biflorina foi capaz de inibir a adesão celular nas células B16-F10 ($50,13 \pm 9,6\%$; $55,79 \pm 11,9\%$ e $50,84 \pm 21,45\%$, respectivamente) e nas células MDAMB-435 ($14,24 \pm 6,388\%$; $31,49 \pm 1,263\%$ e $45,25 \pm 7,637\%$), esta última de maneira concentração-dependente (figura 19). Vale resaltar que, neste ensaio, foram utilizadas concentrações que não diminuem o crescimento celular, pra evitar um falso-positivo causado por um efeito citotóxico. Esse resultado reforça o provável potencial antimetastático da biflorina.

4.5. Migração Celular

Substâncias que modulem a capacidade migratória de linhagens tumorais são possíveis candidatos a fármacos com atividade antimetastática. Para avaliar esse potencial, foi feito ensaio de migração celular por cicatrização (*Wound healing*) utilizando as linhagens B16-F10 e MDAMB-435. Em ambas as linhagens, a biflorina foi capaz de inibir a migração celular (ensaio qualitativo) (figura 20 e 21).

4.6. Ensaio de Zimograma

Para avaliar se a biflorina também interfere na expressão e/ou liberação de MMPs, foi realizado o ensaio de zimograma em gelatina. Como a linhagem B16-F10 possui alta expressão das Gelatinases A e B, esse ensaio pode

informar se substâncias testes possam interferir na expressão ou secreção das MMP-2 e -9 pela linhagem B16-F10 cultivadas em poços revestidos com colágeno. Neste ensaio, a biflorina não alterou a liberação das MMP-2 e -9 (gelatinases) pela linhagem B16-F10 (figura 22).

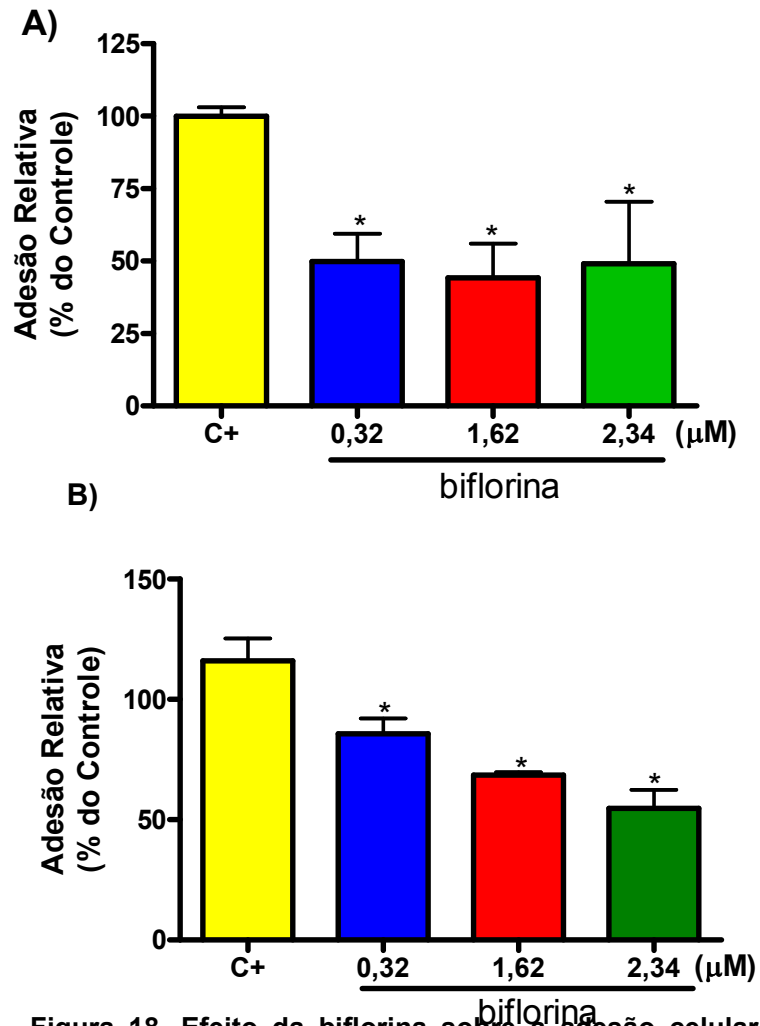


Figura 18. Efeito da biflorina sobre a adesão celular sobre o colágeno do tipo I das células do melanoma murino A) B16-F10 e B) MDAMB-435. O controle foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentes independentes em triplicata. * $p < 0,05$ comparado com o controle por one-way ANOVA seguido por Dunnett.

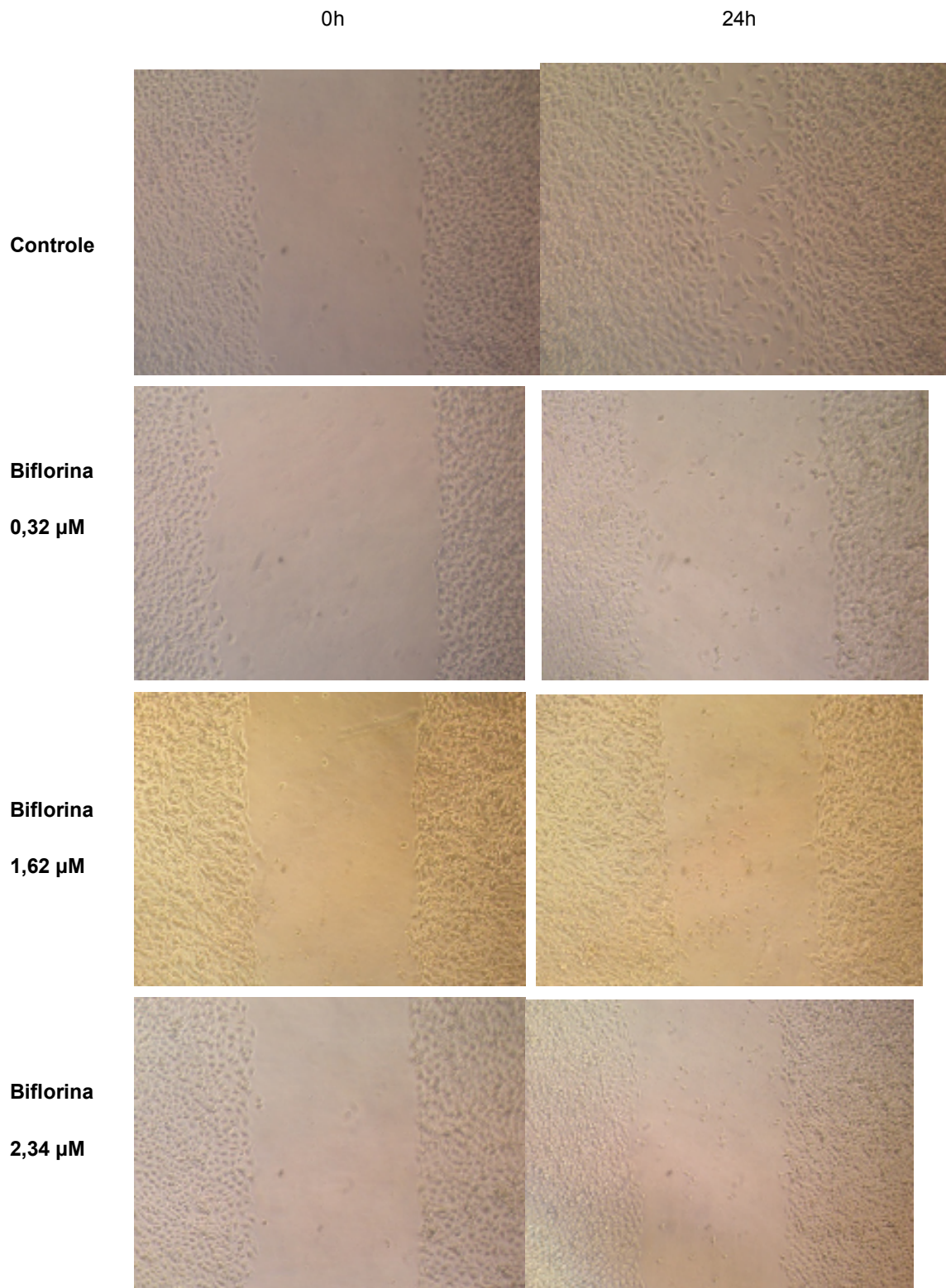


Figura 19. Microfotografia de campos celulares representativos do ensaio de migração celular em células B16-F10 (melanoma murino) em 0 e 24h. Controle (DMSO) e Biflorina 0,32; 1,62 e 2,34 μ M, respectivamente (aumento 100X).

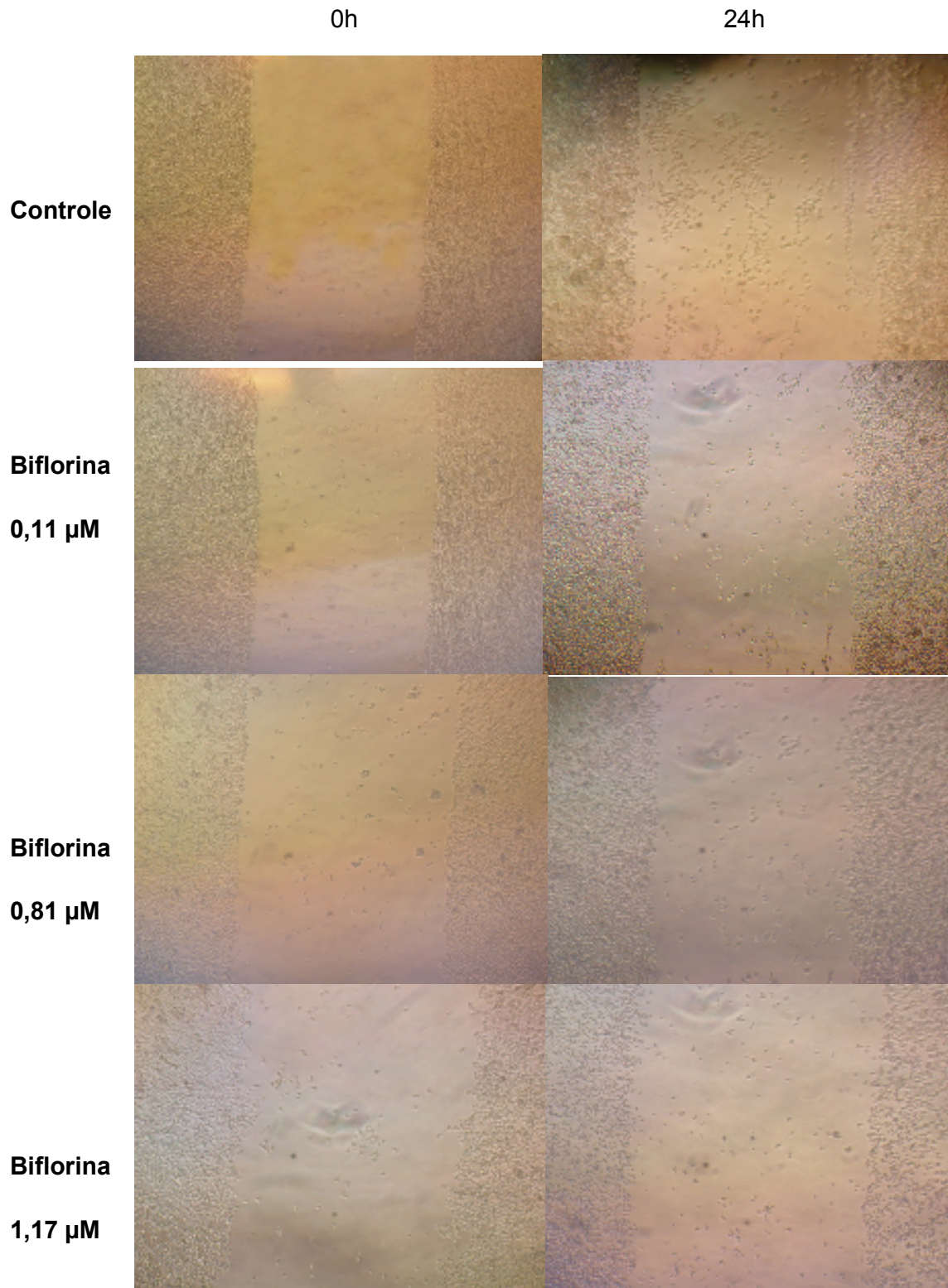


Figura 20. Microfotografia de campos celulares representativos do ensaio de migração celular em células MDA-MB-435 (melanoma humano) em 24h. A: controle (DMSO); B, C e D: Biflorina 0,11; 0,81 e 1,17 μ M respectivamente (aumento 100X).

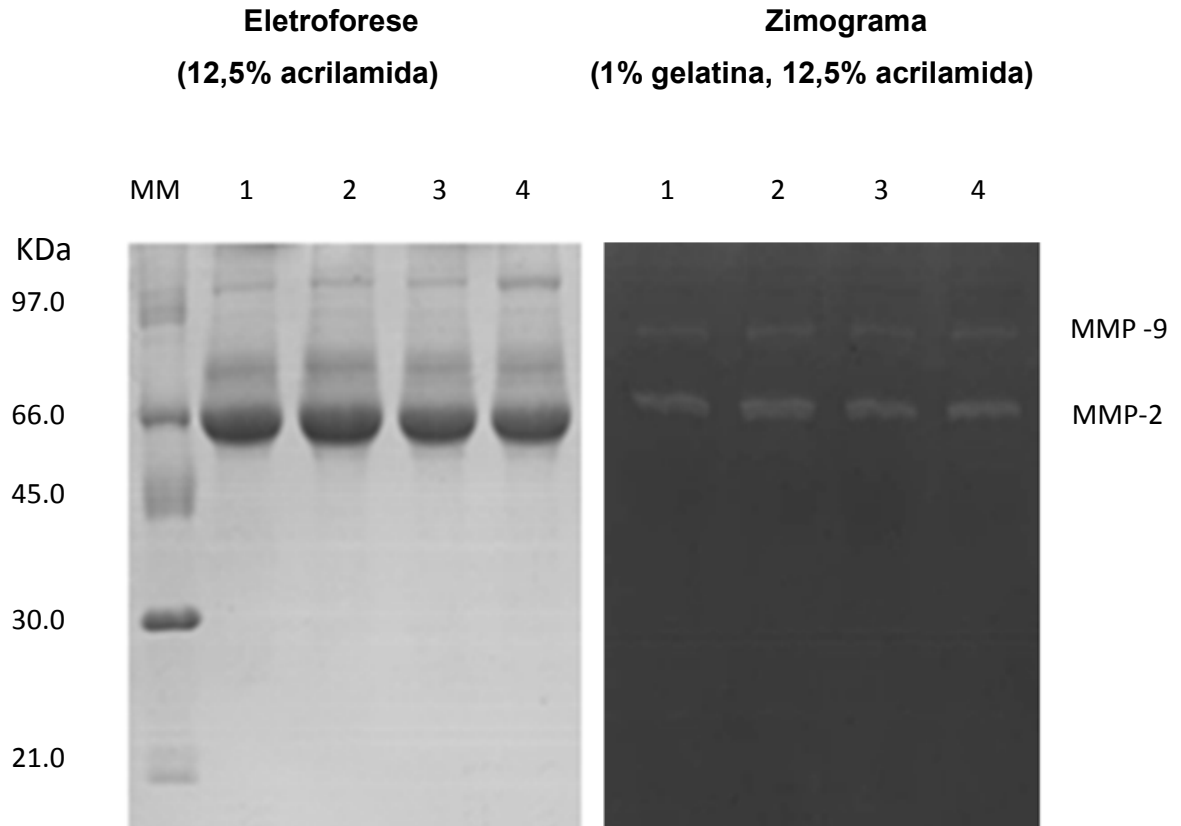


Figura 21. As células (B16-F10) foram tratadas na presença e na ausência de biflorina. MM=marcador, 1: Controle; 2: Biflorina 0,32 μ M; 3: Biflorina 1,62 μ M e 4: Biflorina 2,34 μ M em poços revestidos com colágeno. Após 24h, o meio foi retirado e feito o ensaio de zimograma.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Em estudos anteriores, realizados em nosso laboratório, foi observado que a biflorina, uma o-naftoquinona isolada das raízes da *Capraria biflora*, promovia o aumento da sobrevida dos animais transplantados com o melanoma B16, sem expressiva toxicidade sistêmica (VASCONCELLOS, 2008). VASCONCELLOS (2008) também relatou que este aumento na sobrevida causado pelo tratamento com a biflorina (25 mg/kg) era maior do que aquele obtido pela dacarbazina, utilizada no ensaio como controle positivo, única droga citotóxica utilizada na clínica para o tratamento do melanoma metastático.

A linhagem celular B16 é extensamente utilizada em modelos experimentais para o estudo do processo metastático. Esta linhagem, quando inoculadas via veia caudal de camundongos C57BL/6, possui a capacidade de colonizar o parênquima pulmonar (ORTEGA *et al.*, 2008). Como essas células produzem melanina, os nódulos pulmonares de cores negras-marrom possibilitam a contagem ao olho nu, o qual torna possível um rápido e fácil estudo de drogas com potenciais antimetastático (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 1997).

Diante deste quadro e diante dos resultados encontrados por Vasconcellos, nos propusemos avaliar o efeito da biflorina sobre a metástase experimental utilizando a linhagem celular B16-F10 (alto poder metastático). Vale ressaltar, ainda, que a extração e o isolamento desta naftoquinona envolvem procedimentos relativamente simples, o qual possibilita sua obtenção em larga escala (VASCONCELLOS, 2008).

Em ensaio de metástase experimental, realizado através da inoculação endovenosa das células B16-F10 em camundongos C57BL/6 (*black*), foi observado o efeito inibitório da biflorina na formação dos nódulos metastáticos no tecido pulmonar. Como mostrado na figura 15, essa redução não foi dose-dependente, isto é, mesmo dobrando a dose desta substância (de 25 mg/kg/dia para 50 mg/kg/dia) o efeito observado continua semelhante. Isto mostra que na

dose de 25 mg/kg/dia a biflorina já foi capaz de chegar ao seu efeito máximo, o que torna essa observação interessante, já que o efeito terapêutico pôde ser alcançado com o uso da menor dose estipulada para o ensaio. Ressaltando que, o uso de doses altas na terapia de qualquer doença, inclusive o câncer, pode ocasionar em um aumento da probabilidade do aparecimento de efeitos tóxicos e colaterais.

Quando realizado o ensaio descrito acima, apenas metade do grupo dos animais foi sacrificada, permitindo a observação da taxa de sobrevida dos animais remanescentes (n = 8). Neste ensaio observou-se que a biflorina aumentava a taxa de sobrevida dos animais inoculados com as células B16-F10 (Figura 16). Este ensaio também demonstrou que o efeito não é dose-dependente.

De forma semelhante à biflorina, diversas substâncias relatadas na literatura apresentam efeito inibitório sobre a metástase experimental. Podemos citar a whitanolida, substância bioativa extraída das raízes da *Whitanea somnifera*. Esta substância é capaz de inibir a formação dos nódulos pulmonares pelas células B16-F10 em 68 %, com efeito, na taxa de sobrevida de 25 %. A biflorina foi capaz de inibir em até 71 % (50 mg/kg/dia) a formação dos nódulos metastáticos.

Em análise histopatológica dos pulmões dos animais inoculados com as células do melanoma B16-F10, observamos a presença de focos metastáticos, comprovando a presença de metástase pulmonar (figura 17). É evidente a diminuição das colônias metastáticas formadas no grupo tratado em comparação com o grupo controle. Todavia, também é observada a presença de hemácias e pigmentos de hemossiderina no parênquima pulmonar, o que demonstra a presença de microhemorragia recente e tardia (figura 17). A análise destes resultados propõe que a biflorina possua como efeito colateral alguma disfunção na coagulação sanguínea, o que denota um efeito não-desejado.

Por outro lado, é bem relatado na literatura, que drogas anticoagulantes podem apresentar efeitos potenciais como agentes terapêuticos para o tratamento de tumores sólidos. De modo curioso, estas drogas parecem ser

mais eficazes na inibição do processo metastático do que na inibição de tumores primários. É conhecido, também, o uso de anticoagulantes na prevenção e no tratamento de metástase hematogênica, além de serem eficazes no prolongamento da sobrevivência dos pacientes com câncer (BOBEK *et al.*, 2004).

A heparina, por exemplo, inibe a formação de metástase hematogênica ao bloquear as P- e L- selectinas, moléculas de adesão presentes nas plaquetas envolvidas na formação de êmbolos tumorais. Além de esta droga ter efeito sobre a inibição da heparanase e atuação sobre citocinas e fatores de crescimento (STEVENSON *et al.*, 2007).

Outro exemplo interessante é o lapachol, uma naftoquinona com atividade citotóxica e antitumoral já conhecida. É bem descrito que esta quinona possui como efeito colateral a diminuição da coagulação sanguínea por antagonismo da vitamina K. Em ensaios utilizando a linhagem celular B16BL-6 (melanoma murino) foi observado que o lapachol tanto demonstra a capacidade de promover quanto inibir a metástase experimental, a depender do tempo e dose utilizada. Este primeiro efeito envolve sua atividade sobre a coagulação sanguínea (MAEDO *et al.*, 2008).

Diante disso, o provável efeito da biflorina sobre a coagulação sanguínea pode não ser exatamente um problema para estudos futuros. Porém, o mecanismo exato e a existência deste provável efeito colateral não foram investigados.

O ensaio de metástase experimental baseia-se na capacidade da célula em alcançar um órgão-alvo diferente daquele de tecido de origem, colonizar, adaptar-se a esse novo microambiente e proliferar. Substâncias que inibem esse processo podem ser candidatas promissoras para o desenvolvimento de fármacos antimetastático. Entretanto, neste tipo de ensaio, não é possível afirmar que uma droga possa agir diretamente sobre o processo de invasão celular, já que essa etapa inicial é pulada. Diante disso, ensaios complementares *in vitro* de adesão, migração celular são de suma importância para a avaliação e desenvolvimento de novas drogas com potencial antimetastático.

Em trabalho realizado por VASCONCELLOS e colaboradores (2005), foi demonstrado que a biflorina possuía atividade citotóxica frente a cinco linhagens tumorais, elas: CEM e HL-60 (leucemia humana), HCT-8 (cólon humano), MCF-7 (mama humano) e B-16 (melanoma murino). Como substâncias potencialmente citotóxicas podem resultar em efeito falso-positivo sobre os estudos *in vitro* de adesão e migração celular foi avaliado a citotoxicidade da biflorina frente às linhagens B16-F10 e MDAMB-435 (linhagens em estudo) utilizando o método do MTT.

Neste ensaio observamos que a biflorina possuía efeito citotóxico em ambas as linhagens condizendo com os estudos anteriores (Tabela 4).

Substâncias citotóxicas apresentam um problema para os estudos de adesão e migração celular, já que em vez de observarmos um efeito antiadesão ou antimigração estaremos diante do seu efeito citotóxico. Isto é, no ensaio de adesão celular, por exemplo, as células não serão impedidas de aderir ao substrato da MEC devido a uma provável ação sobre alguma molécula de adesão, mas, por entrar em morte celular. Esta situação torna inviável a realização desses ensaios diante de concentrações que causam morte celular.

Uma alternativa de se evitar um efeito falso-positivo é a seleção das concentrações não-citotóxicas para os estudos de adesão e migração *in vitro*. Para avaliar se as concentrações a serem utilizadas nos ensaios, foi realizada ensaio de crescimento tumoral utilizando o método do MTT em tempo de incubação de 24 h.

Dentre as diversas etapas da cascata metastática, a adesão celular obviamente é um evento crítico (ZHAO *et al.*, 2008), como mostrado na figura 3. Como o colágeno do tipo I é um dos constituintes da matriz extracelular, e, conseqüentemente, essa adesão confere a células sua capacidade de invasão, foi avaliado o efeito da biflorina sobre a adesão celular sobre o colágeno tipo I. Neste ensaio esta quinona foi capaz de inibir a adesão das células B16-F10 e MDAMB-435 em concentrações não-citotóxicas (Figura 19). Este resultado sugere que a biflorina pode apresentar propriedade de inibir a invasividade das células tumorais por esse mecanismo.

Diversas substâncias estudadas anteriormente também possuem potencial antimetastático ao agir sobre as moléculas de adesão do tipo integrina. A eristostatina e albolabrina, por exemplo, são desintegrinas isoladas de veneno de serpente que inibem a adesão de células do melanoma à fibronectina, laminina e vitronectina (SOZKA *et al.*, 1991). A contortrostatina, outra desintegrina dimérica isolada do veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix*, inibe a adesão de células tumorais à fibronectina, vitronectina e ao colágeno tipo I ao ligar-se a integrina $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ (TRIKHA *et al.*, 1994; ZHOU *et al.*, 2000). Em um derivado de produtos naturais, a salvicina, um diterpenóide quinona, inibe adesão das células MDAMB-435 ao promover *down-regulation* à subunidade β_3 do receptor do tipo integrina (ZHOU *et al.*, 2008). Todos esses compostos possuem atividade antimetastática quando avaliados em ensaios *in vivo*.

Outra etapa que pode atribuir um potencial antimetastático a diversas substâncias é sua capacidade em modular a motilidade celular, propriedade que possui um papel fundamental na invasão tumoral e formação de metástases (Figura 3 e 5). Linhagens de células tumorais que são altamente invasivas e metastáticas apresentam um maior grau de motilidade do que seus homólogos com baixa capacidade metastática (LANG *et al.*, 2005). Tanto as células B16-F10 quanto a MDAMB-435 possuem alto grau de motilidade celular o que confere a essas linhagens um alto poder metastático tornando possível o estudo de substâncias com atividade antimigratória.

O método utilizado nesse trabalho foi o *Wound healing* desenvolvido por Bürk em 1973. É um método simples, barato e um dos primeiros métodos desenvolvido para estudar a migração celular direcional *in vitro* (RODRIGUEZ *et al.*, 2006).

Neste ensaio, observou-se que a biflorina é capaz de inibir a migração celular tanto das células B16-F10 quanto das células MDAMB-435 (Figura 20 e 21). O exato mecanismo pelo qual a biflorina inibe a migração celular não foi determinado, já que a migração celular é um processo bastante complexo e diversos fatores estão envolvidos neste mecanismo.

De forma semelhante ao observado com a biflorina, algumas substâncias relatadas na literatura demonstram capacidade de inibir a motilidade celular, como o glicoalcalóide alfa-tomatina, presente nos tomates (*Lycopersicon esculentum*). Esta substância inibe a migração das células A549 (adenocarcinoma de pulmão humano) de maneira concentração-tempo dependente tanto em ensaios utilizando a câmara de Boyden quanto no ensaio de migração por cicatrização (*Wound Healing*) (SHIH *et al.*, 2009).

Outra característica importante que confere às células tumorais em invadir e formar metástase é a sua capacidade em secretar enzimas proteolíticas que irão degradar os componentes da MEC. Vários tipos de proteinases têm sido implicados na degradação da MEC, mas um grupo principal de enzima envolvida são as metaloproteinases da matriz (MMPs).

Diversos fármacos inibidores das MMP têm sido sintetizados para estudos no tratamento de neoplasias malignas (WYLIE *et al.*, 1999; MAEKAWA *et al.*, 2000; MAKI *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 1997; KIDO *et al.*, 1999). Dentre estas substâncias, podemos citar os peptideomiméticos, os não-peptideomiméticos, os derivados da tetraciclina e os bisfosfonatos, sendo que todos interferem na expressão e ativação das MMPs, reduzindo a função dessas enzimas e conseqüentemente diminuindo a degradação da MEC. Dessa maneira, tem-se buscado a inibição da função das MMPs como uma forma alternativa de terapia anti-câncer (PEREIRA, 2006).

Em ensaio realizado de zimografia em gelatina observou-se que a biflorina não altera a liberação das MMP-2 e -9 pelas células B16-F10.

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que a biflorina inibe a formação de metástase experimental além de inibir eventos cruciais para o processo de invasão tumoral, o que a torna bastante promissora para o desenvolvimento de novos fármacos antimetastáticos. Entretanto, demais estudos são necessários para confirmar essa teoria e para a elucidação do seu exato mecanismo de ação e possíveis efeitos colaterais.

Perspectivas

Os resultados obtidos nesse trabalho tornam necessário o estudo dos possíveis efeitos da biflorina sobre o processo de metástase.

A avaliação da biflorina sobre a adesão celular, não somente das células estudadas nesse trabalho, mas, também, de outras linhagens, é uma das avaliações indispensáveis para a elucidação de seu mecanismo de ação. Ensaio utilizando outros substratos da MEC, como a fibronectina, laminina, vitronectina e colágeno tipo IV, funcionam como estratégias para determinar possível preferência do efeito desta quinona sobre algum substrato específico. Associado a isso, o uso de outras linhagens tumorais também torna-se útil para a determinação da preferência da biflorina sobre alguma molécula de adesão, já que algumas linhagens expressam ou não de forma preferencial subtipos específicos de integrinas, por exemplo. Esta estratégia pode ser utilizada para a determinação da molécula de adesão responsável pelo efeito da biflorina, o que pode ser confirmado em ensaios de *Western blot*.

Outro caminho a ser desvendado é seu provável efeito sobre a coagulação sanguínea. Será que esta naftoquinona tem efeito sobre a coagulação sanguínea, de forma semelhante ao lapachol (outra naftoquinona)? Como esse efeito pode ser benéfico ou maléfico em futura terapia com a biflorina?

Além disso, apesar da biflorina não possuir atividade sobre a liberação e/ou expressão das gelatinases A e B (MMPs -2 e -9), outras vias envolvidas na degradação ativa protéica dos componentes da MEC podem ser investigadas. Uma dessas vias é a cascata do ativador de plasminogênio, cujo papel na invasão celular é bem descrito na literatura (CHU *et al.*, 2006).

Como já bem estabelecido, os mecanismos da formação de novos vasos induzidas pelas células tumorais (e percorridas pelas células endoteliais) são muito semelhantes com os mecanismos de invasão tumoral. Pelo exposto neste trabalho, observamos que a biflorina possui a capacidade de alterar mecanismos cruciais para que ocorra a invasão celular: adesão e migração.

Este olhar guia futuros estudos para avaliar o potencial antiangiogênico desta molécula. Ensaios de adesão, migração e invasão utilizando células endoteliais e ensaios de formação de tubos e angiogênese *in vivo* pode ser um caminho para a continuidade do estudo da biflorina.

Vale resaltar ainda que, estamos diante de uma molécula que possui tanto atividade citotóxica e antitumoral (VASCONCELLOS *et al.*, 2005; VASCONCELLOS *et al.*, 2007) quanto capacidade de alterar o processo de formação de metástase. Estas características enfatizam a importância dessa molécula para descobertas futuras promissoras.

Diante disso, podemos observar que a base fornecida por esse trabalho contribui de forma bastante promissora a extensa pesquisa pela busca de novos protótipos a fármacos antineoplásicos. A construção e o desenvolvimento de novos estudos são necessários, a fim de determinar se, realmente, esta substância (ou seus derivados) possa vir, um dia, a entrar em estudo clínico e ter utilidade para terapias futuras. Principalmente diante da urgência do mercado farmacêutico no desenvolvimento de terapias efetivas para o tratamento dos cânceres metastáticos.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos dentro deste projeto de pesquisa, podemos concluir que:

- A Biflorina é capaz de inibir a formação de metástase experimental induzida pela linhagem B16-F10 além de aumentar a taxa de sobrevivência;
- A Biflorina é citotóxica nas linhagens B16-F10 e MDAMB-435;
- A Biflorina é capaz de inibir a adesão das células B16-F10 e MDAMB-435 ao colágeno tipo I em concentrações não-citotóxicas;
- A Biflorina é capaz de inibir a migração celular das células B16-F10 e MDAMB-435 em concentrações não-citotóxicas;
- A Biflorina não é capaz de inibir a atividade das MMP-2 e -9 das células B16-F10 cultivadas sobre o colágeno, o que exclui esse mecanismo de ação;

Referências
Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGLUND K, RAUVALA M, PUISTOLA U, ANGSTROM T, TURPEENNIEMI-HUJANEN T, ZACKRISSON B. Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial câncer- MMP-9 correlates to the grade and the stage. **Gynecol Oncol.** v.94, p.699-704, 2004.

AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S.; TAKADA, Y. BANERJEE, S. Curcumin Suppresses the Paclitaxel-Induced Nuclear Factor-KB Pathway in Breast Cancer Cells and Inhibits Lung Metastasis of Human Breast Cancer in Nude Mice. **Clinical Cancer Research**, v.11, p.7490-7498, 2005.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**, 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas.

ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; MAGALHÃES, L.E.; TUFIK, S. - Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo, UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, 2004. 167p.

AQUINO, T. M. "Caracterização Farmacognóstica de *Capraria biflora* L. e Estudo Biológico e Físico-químico de seus Metabólitos Secundários". **[Dissertação]**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

AUMAILLEY, M.; GAYRAUD, B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. **Journal of Molecular Medicine**, v.76, p.253-265, 1998.

AYAD, S.; BOOT-HANDFORD, R. P.; HUMPHRIES, M. J.; KADLER, K. E.; SCHUTTLEWORTH, C. A. The Extracelular Matrix. 2^a ed. **FactsBook Series**. 1998.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BELIVEAU, R.; GINGRAS, D.; KRUGER, E.A.; LAMY, S.; SIROIS, P.; SIMARD, B.; SIROIS, M.G.; TRANQUI, L.; BAFFERT, F.; BEAULIEU, E.; DIMITRIADOU, V.; PE'PIN, M.C.; COURJAL, F.; RICARD, I.; POYET, P.; FALARDEAU, P.; FIGG, W.D.; DUPONT, E. The Antiangiogenic Agent Neovastat (AE-941) Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-mediated Biological Effects. v. 8, p.1242–1250, **Clinical Cancer Research**, 2002.

BELLON, G.; MARTINY, L.; ROBINET, A. Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** v.49, p.203–220, 2004.

BERNHARD EJ, GRUBER SB, MUSCHEL RJ. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 91(10), p.4293-7, 1994.

BEZERRA, D. P. Estudo das propriedades anticancer da piplartina. [TESE], Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2008.

BOBEK, V. AND KOVARÍK, J. Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.58, p. 213–219, 2004.

BOSMAN, F. T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **Journal of pathology**, v. 200, p. 423-428. 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem**, v.772, p.248-54, 1976

BRASIL. Ministerio da Saude. Instituto Nacional do Cancer. **Estimativa 2008**: incidencia de cancer no Brasil. Brasilia, DF, 2007.

BRITO, G.A; CARNEIRO-FILHO, B. ORIÁ, R.B. DESTURA, R.V.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Clostridium difficile toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. **Dig Dis Sci**. v.50, n°7, p.1271-1278, 2005.

BURK RR. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.70, p.368-372, 1973.

BUZAID, A.C. & MURREN, J.R. Chemotherapy for advanced malignant melanoma. **Int. J. Clin. Lab. Res.** v. 21, p.205-9, 1992.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat. Med.** v.9, p.653–660, 2003.

CAVALLARO, U., CHRISTOFORI, G. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. **Biochim. Biophys. Acta**, v.15, p.39–45, 2001.

CHEN, H.W.; LEE, J.Y.; HUANG, J.Y.; WANG, C.C.; CHEN1, W.J.; SU, S.F.; HUANG, C.W.; HO, C.C.; CHEN, J.J.W.; TSAI, M.F.; YU, S.L.; YANG, P.C. Curcumin Inhibits Lung Cancer Cell Invasion and Metastasis through the Tumor Suppressor HLJ1. **Cancer Research** v.68, p.742-8, 2008.

CHERRINGTON, J.M., STRAWN, L.M., SHAWVER. New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents. **Adv. Cancer Res.** v.79, p.1–38, 2000.

CHIN, D.; BOYLEC, G. M.; KANEA, A. J.; THEILEA, D. R. Invasion and metastasis markers in cancers. **British Journal of Plastic Surgery** v.58, p.466–474, 2005.

CHU, S.H.; YANG, S.F.; LIU, S.J.; KUO, W.H.; CHANG, Y.Z.; HSIEH, Y.S. In vitro and in vivo antimetastatic effects of *Terminalia catappa* L. leaves on lung cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, p.1194–1201, 2007.

CLARK, S.R. The investigation of Tumor Metastasis. D. Phil. [Tese] Oxford University, 1985.

COLOMER, R. Gemcitabine and paclitaxel in metastatic breast cancer. **Oncology** v.18, p.8–12, 2004.

CONWAY, E.M., COLLEN, D., CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovascular Res.** 49, 507–521, 2001.

CORREIA, M.P. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil, vol. 02, p. 205., Ministério da Agricultura, Inst. Bras. de Desenvol. Florestal.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V. e JIMENEZ, P.C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Quim. Nova.** v. 32. P.703-716, 2009.

DI LUZIO, N.R.; WILLIAMS, D.L.; MCNAMEE, R.B.; EDWARDS, B.F.; KITAHAMA, A. Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucan. **Int J Cancer**, v.24, p.773–9, 1979.

DUFFY, M.J.; MAGUIRE, T.M.; HILL, A.; MCDERMOTT, E.; O'HIGGINS, N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. **Breast Cancer Res.** v.2, p.252-7, 2000.

ECCLES, S.A. e WELCH, D.R. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. **The Lancet.** v. 369, 2007

ESTRADA, A.; YUN, C.H.; VAN KESSEL, A.; LI, B.; HAUTA, S.; LAARVELD, B. Immunomodulatory activities of oat beta-glucan in vitro and in vivo. **Microbiol Immunol**, v.41, p.991–8, 1997.

EVANS, G.R.D. & MANSON, P.N. Review and current perspectives of cutaneous malignant melanoma. **J. Am. Col. Surg.** v.178 p.523-40, 1994.

FALARDEAU, P.; CHAMPAGNE, P.; POYET, P.; HARITON, C.; DUPONT, E. Neovastat, a naturally occurring multifunctional antiangiogenic drug, in phase III clinical trials. **Semin Oncol.** v.28, p.620-5, 2001.

FONSECA, A.M.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L.; LEMOS, T.L.G. Total assignments of ^1H and ^{13}C spectra of biflorin and bis-biflorin from *Capraria biflora*. Magnetic resonance in chemistry. v.41, p.1038-40, 2002.

FUJITA, M; HAYASHI, I; YAMASHINA, S; ITOMAN, M; MAJIMA, M. Blockade of angiotensin AT1a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis, and metastasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.294, p.441–447, 2002.

FUNDYLER O, KHANNA M, SMOLLER BR. Metalloproteinase-2 expression correlates with aggressiveness of cutaneous squamous cell carcinomas. **Mod Pathol**. v.17, p.496-502, 2004.

GARBE, C; EIGENTLER, T. K. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art. **Melanoma Res**. v.17, p.117-27, 2007

GAY S, M.; MILLER, E.J. Collagen in the Physiology and Pathology of Connective Tissue. *Gustav Fischer*, 1978.

GIANOTTI, A.; SOMMER, C. A.; CARMONA, A. K.; HENRIQUE-SILVA, F. Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L and human breast cancer cell invasion. **Biol. Chem.**, 389, 447–453, 2008.

GILLIAN MURPHY, G. & NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular Aspects of Medicine* v.29, p. 290–308, 2008

GLOUSHANKOVA, N.A. Changes in Regulation of Cell–Cell Adhesion during Tumor Transformation *Biochemistry (Moscow)*, v. 73, No. 7, p. 742-750, 2008.

GOGAS, H.J., KIRKWOOD, J.M., SONDAK, V.K. Chemotherapy for metastatic melanoma. Time for a change? **Cancer**, v. 109, p 445-464, 2007.

GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I.L.; LOUREIRO, P.; CARMONA, C.L.; BERNARD, M.Z. Biflorina, novo antibiótico isolado da *Capraria biflora* (Scrophulariaceae). **Revista de Química Industrial**, v. 22 (249), p.1-3, 1953.

GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I.L.; LOUREIRO, P. Novas observações sobre a biflorina-antibiótico isolado da *Capraria biflora*

(Scrophulariaceae), **Anais da Sociedade Biologia Experimental.**, v.XI (1), p.3-9, 1953b.

GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I.L. Método simples de extração e purificação da biflorina. **Revista do Instituto de Antibióticos de Recife**, v.1 (1), p.7-9, 1958.

GONÇALVES DE LIMA, O., I.L. D'ALBUQUERQUE, D. MAIA & M.A. BORBA. . Ação da luz sobre a biflorina. **Rev. Inst. Antib.** v.3, p.97-100, 1961.

GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I.L.; NAVARRO, M.C.P. Novo Método de Extração Purificação da Biflorina com Possibilidade Industrial, **Revista do Instituto de Antibióticos de Recife**, v.4 (1/2), p.79-81, 1962

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.9, p.2783 – 2797, 2000.

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

GEBHARDT, R. *In vitro* screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. **Planta Medica**, v.66, p.99 – 105, 2000.

GUERITTE, F.; FAHY, J. **The vinca alkaloids**. In: Cragg, G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J. (Eds.), *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, p. 123 – 136, 2005.

GUERRY, D. & SCHUCHTER, L.M. - Disseminated melanoma – is there a new standard therapy? **N. Engl. J. Med.**, v.327, p.560-1, 1992

GULLO, V.P.; McALPINE, J.; LAM, K.S.; BAKER, D.; PETERSEN, F. Drug discovery of natural products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n.7, p.523-31, 2006.

GURUVAYOORAPPAN & KUTTAN, G. Cells in C57BL/6 Mice Effect of Amentoflavone on the Inhibition of Pulmonary Metastasis Induced by B16F-10 Melanoma. **Integr Cancer Ther.** v. 6, p.185, 2007.

HAASS, N.K.; SMALLEY, K.S.; LI, L.; HERLYN, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Res** v.18, p. 150–9, 2005.

HAJEK, R.; VORLICEK, J.; SLAVIK, M. Paclitaxel (Taxol®); A review of its antitumor activity in clinical studies. **Neoplasma**, v.43, p.141 – 154, 1996.

HAYWARD, N.K.; PARSONS, P.G.; DE WEVER, W.B.C; MAREEL, M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. **Journal of Pathology**, v. 200, p. 429-447, 2003.

HAY, E.D. Extracellular matrix. **J Cell Biol**, v. 91 p. 205, 1981.

HEGERFELDT, Y., M. TUSCH, E.-B. BROCKER, P. FRIEDL. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, b1-integrin function, and migration strategies. **Cancer Res.** v.62, p. 2125-30, 2002.

HEJNA, M.; RADERER, M.; ZIELINSKI, C. C. Inhibition of metastases by anticoagulants. **Journal of the National Cancer Institute.** v. 91, n.1, p. 22-6, 1999.

HEUSSEN, C, DOWDLE, E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Anal. Biochem.** v.102, p. 196-202, 1980

HIDALGO M., ECKHARDT, S.G. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. **J Natl Cancer Inst.**v.93, p.178-93, 2001.

HOOD, J.D.; CHERESH, D.A. Role of integrins in cell invasion and migration. **Nature Rev. Cancer** 2: 91-100, 2002.

HOSOOKA, T.; NOGUCHI, T.; NAGAI, H.; HORIKAWA, T.; MATOZAKI, T.; ICHIHASHI, M.; KASUGA, M. Regulation of Cell Motility and Growth by Dok-1. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, p. 5437–5446, 2001.

HSU, M.Y., MEIER, F.E., NESBIT, M., HSU, J.Y., VAN BELLE, P., ELDER, D.E., AND HERLYN, M. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and downregulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am. J. Pathol.* v.156, p.1515–25, 2000

HUA, J.; MUSCHEL, R.J. Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. *Cancer Res.* v. 56(22), p.5279-84, 1996.

IKEBE T, SHINOHARA M, TAKEUCHI H, BEPPU M, KURAHARA S, NAKAMURA S, *et al.* Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis.* v. 17(4), p.315-23, 1999.

JACHAK, S.M.; BUCAR, F.; KARTNIG, J. Antiinflammatory activity of extracts of *Biophytum sensitivum* in carrageenan induced paw edema. *Phytotherapy Res.* v.13, p.73-74, 1999.

JOHNSON, J.P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* v.18, p.345–357, 1999.

JUHÁSZ A. Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypofaryngeal cancers. *Laryngoscope* v.110, p.84-92, 2000.

KAWAMATA, H.; KAMEYAMA, S.; KAWAI, K.; TANAKA, Y.; NANM L.; BARCH, D.H. *et al.* Marked acceleration of the metastatic phenotype of a rat bladder carcinoma cell line by the expression of human gelatinase A. *Int J Cancer.* v.63(4), p.568-75, 1995.

KERKELA, E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol.* v.12, p.109-25, 2003.

KIDO, A.; TSUTSUMI, M.; IKI, K.; MOTOYAMA, M.; TAKAHAMA, M.; TSUJIUCHI, T. *et al.* Inhibition of spontaneous rat osteosarcoma lung metastasis by 3S-[4-(N-hydroxyamino)- 2R-isobutylsuccinyl]amino-1-methoxy-3,4-dihydroc arbostyryl, a novel matrix metalloproteinase inhibitor. **Jpn J Cancer Res.** v.90, n.3, p.333-41,1999.

KINGSTON, D.G.I. Taxol and its analogs. In: Cragg, G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J. (Eds.), *Anticancer Agents from Natural Products*. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, p. 89 – 122, 2005.

KIRKPATRICK, P. Stitching together naturally. **Nature**, v. 1, p. 748, 2002.

KNUDSEN, K. A.; TUSZYNSKY, G. P.,; HUANG, T. F.; NIEWIAROWSKI, S. Trigramin, an RGD-containing peptide from snake venom, inhibits cellsubstratum adhesion of human melanoma cells. **Exp. Cell Res.** v. 179, p. 42- 49, 1988.

KOCH, A.W.; BOZIC, D.; PERTZ, O.; ENGEL, J. Homophilic adhesion by cadherins. **Curr Opin Struct Biol**, v. 9, p. 275-81, 1999.

KOH, H.K. Cutaneous melanoma, review article. **N. Engl. J. Med.**,v.325, p.171-82,1991.

KOYAMA, H.; IWATA, H.; KUWABARA, Y.; IWASE, H.; KOBAYASHI, S.; FUJII, Y. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oesophageal carcinoma; a study using in situ zymography. **Eur J Cancer.** v.36, p.2164-70, 2000.

KURCHAT, P.; MAUCH, C. Mechanisms of metastasis. **Clin. Exp. Dermatol.** v.25, n.6, p.482–9, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature.** v.227, p.680-685, 1970.

LAKHANI, S.; SELBY, P.; BLISS, J.M. - Chemotherapy for malignant melanoma: combinations and high doses produce more responses without survival benefit. **Br. J. Cancer**, v.61,p.330-34,1990

LAPIÈRE, C.M. Tadpole collagenase, the single parent of such a large family. **Biochimie** v.87, p. 243-47, 2005.

LEE, K. J.; KIM, J. Y.; CHOI, J. H.; KIM, H. G. Inhibition of tumor invasion and metastasis by aqueous extract of the radix of *Platycodon grandiflorum*. **Food and Chemical Toxicology** v.44, p.1890–96, 2006

LI, J., ZHANG, Y.P., KIRSNER, R.S.,Angiogenesis in woundrepair: angiogenic growth factors and the extracel- lular matrix. **Microsc. Res. Tech.** v.60, p.107–14, 2003.

LIN S.C.; LO, S.S.; LIU, C.J.; CHUNG, M.Y.; HUANG, J.W.; CHANG, K.W. Functional genotype in matrix metalloproteinases-2 promoter is a risk factor for oral carcinogenesis. **J Oral Pathol Med.** v.33, p.405-9, 2004.

LIN, S.C.; CHUNG, M.Y.; HUANG, J.W.; SHIEH, T.M.; LIU, C.J.; CHANG, K.W. Correlation between functional genotypes in the matrix metalloproteinases-1 promoter and risk of oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med.** v.33, p.323-6, 2004.

LIOTTA, L. A. Gene products which play a role in cancer invasion and metastasis. **Breast Cancer Res. Treat.** v.11, p. 113–24, 1988.

LIOTTA, L.A., STETLER-STEVENSON, W.G., Steeg, P.S. Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements. **Cancer Invest.** v.9, p.543–51, 1991.

LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C. The microenvironment of the tumour-host interface. **Nature**, v. 411, p. 375-79. 2001.

LIPSCHIK, G.Y.; KOVACS, J.A. Emerging targets in Antibacterial and Antifungal Chemoterapy. 1ed. New York, Chapman & Hall; p. 568-588, 1992.

LIU, W.W.; ZENG, Z.Y.; WU, Q.L.; HOU, J.H.; CHEN, Y.Y. Overexpression of MMP-2 in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis. **Otolaryngol Head Neck Surg.** v.132, p395-400, 2005.

LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, J., *Molecular Cell Biology*, fourth ed. W.H. Freeman and Company, New York, pp. 751–792, 817–822, 970–988, 1056–1082, 2002.

LUKASHEV, M. E.; WERB, Z. ECM signaling: orchestrating cell behavior and misbehavior. **Trends in Cell Biology**, v. 8, p. 437-441, 1998

McCOWEN, M.C. & R.L. STONE. **Eli Lilly Research Records** (18.953) Indianapolis, 1953.

MACEDO, M.L. FREIRE, M.D. PARRA JR., A. A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*, **J. Agric. Food Chem.** v.52 p.2533-2540, 2004.

MAEKAWA, R.; MAKI, H.; WADA, T.; YOSHIDA, H.; NISHIDA- NISHIMOTO, K.; OKAMOTO, H. *et al.* Anti-metastatic efficacy and safety of MMI-166, a selective matrix metalloproteinase inhibitor. **Clin Exp Metastasis.**v.18, p.61-6, 2001.

MAKI, H.; HOJO, K.; TANAKA, H.; SAWADA, T.Y.; MAEKAWA, R.; YOSHIOKA, T. Augmented anti-metastatic efficacy of a selective matrix metalloproteinase inhibitor, MMI-166, in combination with CPT-11. **Clin Exp Metastasis.**;v.19, p.519-26, 2002.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Rev. Cancer** 2: 143- 148, 2002.

MANOLA, J.; ATKINS, M.; IBRAHIM, J.; KIRKWOOD, J.M. Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. **J. Clin. Oncol.**, v.18, p.3782-93, 2000

MANU, K.A.; KUTTAN, G. Anti-metastatic potential of Punarnavine, an alkaloid from *Boerhaavia diffusa* Linn. *Immunobiology* v.214, p. 245–255, 2009.

MARIA, S. S. Estudo comportamental da linhagem celular Vero quando cultivada em substrato de gel de colágeno tipo I. [Tese] UNICAMP, 1994

MARIA, S. S. e WADA, M. L. F. Cytochemical analysis of Vero cells on collagen gel in long term culture. *In vitro Cell Dev Biol- Animal* 33 (10), 748-750, 1996.

MARIA, S. S. Estudo citoquímico, imunocitoquímico e de análise de imagem de células fibroblásticas em proliferação e apoptose na ausência e presença de colágeno tipo I hiperpolimerizado”. [Tese] UNICAMP; Campinas, 1998.

MASKOS K, BODE W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol Biotechnol.* v.25, p.241-66, 2003

MEHLEN, P. & PUISIEUX, A. Metastasis: a question of life or death. *Nature Review*, 449-59, 2006.

MENON, R.; KUTTAN, G.; KUTTAN, MAKI.; HOJO, H.; TANAKA, H.; SAWADA, T.Y.; MAEKAWA, R. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin Lata G., *Cancer Letters* 141 (1999) 159±165

MORTON, D.L.; ESSNER, R.E.; KIRKWOOD, J.M.; WOLLMAN, R.C. Malignant melanoma. In: **Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast Jr RC, Gansler TS, Holland JF, Frei III E (eds)**. *Holland Frei Cancer Medicine* 6. BC Decker Inc: Hamilton, Canada, Chapter 10., 2003

MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63. 1983.

NEAL, C.P.; BERRY, D.P. Basic principles of the molecular biology of cancer II: angiogenesis, invasion and metastasis. *Surgery*, 24:4 120-126, 2006.

NESBIT, M., AND HERLYN, M. Adhesion receptors in human melanoma progression. *Invasion Metastasis* 14, 131–146, 1994.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* v.66, p.1022-37, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v.70, p.461 – 477, 2007.

NOBILI S.; LIPPI, D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; CAPACCIOLI, S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, v. 59, p. 365-78, 2009

ORMROD, D. & SPENCER, C. M. Topotecan: a review of its efficacy in small cell lung cancer. *Drugs*, v.58, p.533-51, 1999.

ORTEGA, A.; CARRETERO, J.; OBRADOR, E.; ESTRELA, J.M.. Tumoricidal activity of endothelium-derived NO and the survival of metastatic cells with high GSH and Bcl-2 levels. *Nitric Oxide* v.19, p.107–14, 2008.

ORTHOLAND, J.Y. & GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v.271 . 280, 2004.

PAN, X.; TAN, N.; ZENG, G.; ZHANG, Y.; JIA, R. Amentoflavone and its derivatives as novel natural inhibitors of human cathepsin **B. Bioorg Med Chem.** v.13, p.5819-25, 2005

PARKS, W.C.; SUDBECK, B.D.; DOYLE, G.R.; SAARIALHO-KERE, U.K. Matrix metalloproteinases in tissue repair. In: Parks WC, Mecham RP. Matrix metalloproteinases. San Diego: Academic Press; p.263-98, 1998.

PARKS, W.C.; SUDBECK, B.D.; DOYLE, G.R.; SAARIALHO, Y. T. Augmented anti-metastatic efficacy of a selective matrix metalloproteinase inhibitor, MMI-166, in combination with CPT-11. *Clin Exp Metastasis*.v.19, p.519-26, 2002.

PASHOS, K.A.; CANOVAS, D.; BIRD, N.C. The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis. **Cellular Signalling** v.21, p. 665–674, 2009.

PAWELEK, J.M. Viewing Malignant Melanoma Cells as Macrophage-Tumor Hybrids **Cell Adhesion & Migration** v.1, p.1-6, 2007

PELIZON A.C., KANENO, R., SOARES, A., MEIRA, D.A., SARTORI, A. Immunomodulatory activities associated with beta-glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Physiol Res** v. 55, p.557–64, 2005.

PEREIRA, A.C.; CARMO, E.D.; SILVEIRA, V.A.S.; AMADEI, S.U.; ROSA, L.E.B. O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. **Revista Brasileira de Cancerologia** v.52, p.257-62, 2006.

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

POTTS, J.R.; CAMPBELL, I.D. Structure and functions of fibronectin modules. **Matrix Biol**, v. 15, p. 313-20, 1996.

PRADEEP, C.R.; KUTTAN, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. **Clinical & Experimental Metastasis**, v.19, p.703 – 708, 2002.

PRADEEP, C.R.; KUTTAN, G. Effect of beta-carotene on the inhibition of lung metastasis in mice. **Phytomedicine**. v.10, p.159-64, 2003.

PURI, D. The insulinotropic activity of a Nepalese medicinal plant *Biophytum sensitivum*: preliminary experimental study. **J Ethnopharmacol**. v.78, p.89-93, 2001.

QIAN, F.; LI, Y-P; SHENG, X; ZHANG, Z-C; SONG, R; DONG, W.; CAO, S-X.; HUA, Z-C.; XU1, Q. PRL-3 siRNA Inhibits the Metastasis of B16-BL6 Mouse Melanoma Cells In Vitro and In Vivo. **Molmed** v.13 p.151-59, 2007

RAMIREZ F.; RIFKIN D. B. Cell signaling events: a view from the matrix. **Matrix Biol.** v.22, p.101-7, 2003

RAMOS, O. H. P.; KAUSKOT, A.; COMINETTI, M. R.; BECHYNE, I.; PONTES, C. L. S.; CHAREYRE, F.; MANENT, J.; VASSY, R.; GIOVANNINI, M.; LEGRAND, C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. CRE´PIN, M.; BONNEFOY, A. A novel avb3-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clin Exp Metastasis** v.25, p.53–64, 2008.

RÉCAMIER, J.C.A. In: Recherches sur le traitement du cancer. **Gabon**, Paris, 1829.

REDINBO, M. R., STEWART, L., KUHN, P., CHAMPOUX, J. J., HOL, W. G. J. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. **Sci.** v.279, p. 1504-13, 1998.

RIETHDORF, S.; WIKMAN, H.; PANTEL, K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. **Int J Cancer.** v.1, p.1991-2006, 2008.

ROBBINS & COTRAN, Pathologic Basis Of Disease 7ª edição, 2004.

ROCKMAN, H.; SCHADENDORF, D. Drug resistance in human melanoma: mechanisms and therapeutic opportunities. **Onkologie** v.26, p.81–587, 2003.

RODRIGUES, M. A. Anisotropias ópticas em feixes de colágeno e pesquisa de morte celular em fibroblastos de tendões durante o estabelecimento do diabetes espontâneo em camundongos não-obesos (NOD) [TESE] Universidade Estadual de Campinas, 2004.

RODRIGUEZ, L.G.; WU, X.; GUAN, J.L. Wound-healing assay. **Methods Mol Biol.** v.294, p.23-9, 2005.

RUNDHAUG, J.E. Matrix metalloproteinases and angio- genesis. **J. Cell. Mol. Med.** v.9, p.267–85, 2005.

SANTOS, O.; MCDERMOTT, C.D.; DANIELS, R.G.; APPELT, K. Rodent pharmacokinetic and anti-tumor efficacy studies with a series of synthetic inhibitors of matrix metalloproteinases. **Clin Exp Metastasis**. v.15, p.499-508, 1997

SCHMEICHEL K. L.; BISSEL M. J. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. **J Cell Sci**. v.15, p.2377-88. 2003.

SCHOR, S. L. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro. **J Cell Sci**. v.41, p.159-75, 1980.

SCOTT-BURDEN, T. Extracellular matrix: the cellular environment. International Union of Physiological Science, v. 9, p. 110-115. 1994

SEIKI, M.; KOSHIKAWA, N.; YANA, I. Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. **Cancer Metastasis Rev**. v.22, p.129-43, 2003.

SHEN, Y.D.; TIAN, Y.X.; BU, X.Z. GU, L.Q. Natural tanshinone-like heterocyclic-fused ortho-quinones from regioselective Diels-Alder reaction: Synthesis and cytotoxicity evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry** p.1-7, 2009

SHEU, J. R.; TENG, C. M.; HUANG; T. Triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing antiplatelet peptide inhibits cell-substratum adhesion and melanoma cell-induced lung colonization. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 83, p. 885-893, 1992.

SMITH, J. J.; DEANE, N. G.; DHAWAN, P.; AND BEAUCHAMP, R. D. Regulation of metastasis in colorectal adenocarcinoma: A collision between development and tumor biology. **Surgery** v. 144, 2008.

SINGH, S.; AGGARWAL, B.B. Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). **J Biol Chem** v.270, p.24995-5000, 1995.

SOSKA, T.; KNUDSEN, K. A.; BEVIGLIA, L.; ROSSI, C.; POGGI, A.; NIEWIAROWSKI, S. Inhibition of murine melanoma cell-matrix adhesion and experimental metastasis by albolabrin, an RGD-containing peptide isolated from the venom of *Trimeresurus albolabris*. **Exp. Cell Res.**, v. 196, p. 6-12, 1991.

SRIVASTAVA, V.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K.; GUPTA, M.; KHANUJA, S. P. S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. **Bioorg. Med. Chem.**, v.13, p.5892-08, 2005

STAKER, B. L.; HJERRILD, K.; FEESE, M. D.; BEHNKE, C. A.; BURGIN, A. B.; STEWART, .L. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, p.15387-92, 2002

STETLER-STEVENSON, W.G.; AZNAVOORIAN, S.; LIOTTA, A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. **Annu Rev Cell Biol.** v. 9, p.541-73, 1993.

STIMAMIGLIO, M. A. Organização da matriz extracelular nos linfonodos infiltrados pelo linfoma histiocítico verdadeiro. Importância da fibronectina como molécula central na progressão tumoral [TESE] Universidade Federal de Santa Catarina, 2004

STRACKE, M.L.; GUIRGUIS, R.; LIOTTA, L.A.; SCHIFFMANN, E. Pertussis toxin inhibits stimulated motility independently of the adenylate cyclase pathway in human melanoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 146, p.339-345, 1987

TALLANT, C.; MARRERO, A.; GOMIS-RUTH, F.X. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochimica et Biophysica Acta* (in press), 2009

TAKINO, T.; MIYAMORI, H.; WATANABE, Y.; YOSHIOKA, K.; SEIKI, M.; SATO, H. Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration. **Cancer Res.** v.64, p.1044-9.

TEPASS, U. Cytoskeleton, Cell Movement, Cell Adhesion, Cell Cycle, Development (BIO250 Lecture Notes). University of Toronto Press, Toronto, pp. 20–25, 2001..

THEJASS, P; KUTTAN, G. Antimetastatic activity of Sulforaphane. **Life Sciences** v.78, p.3043–50, 2006.

THOMAS, G.T.; LEWIS, M.P.; SPEIGHT, P.M. Matrix metalloproteinases and oral cancer. **Oral Oncol** v. 35, p. 227-33, 1999.

TUCKER, G. C. Inhibitors of integrins. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 2, n. 4, p. 394-402, 2002.

VASCONCELLOS, M.C. Estudo do potencial antitumoral da biflorina, o - naftoquinona isolada das raízes de *Capraria biflora*. [TESE] Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, CE, 2008.

VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, D.P.; FONSECA, A.M.; PEREIRA, M.R.P.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; ALVES, A.P.N.N.; COSTA-LOTUDO, L.V. Antitumor Activity of Biflorin, an o-Naphthoquinone Isolated from *Capraria biflora*. **Biol. Pharm. Bull.** v.30, n.8, p.1416-21, 2007.

VASCONCELLOS, M.C.; MONTENEGRO, R.C.; MILITÃO, G.C.G.; FONSECA, A.M.; PESSOA, O.D.L.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUDO, L.V. Bioactivity of biflorin, a typical o-napthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. **Z. Naturforsch.** v.60, p. 394-8, 2005.

VANDENBERG, C.A. Integrins step up the pace of cell migration through polyamines and potassium channels. **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 105, p.7109–10, 2008.

WAGNER, J.D.; GORDON, M.S.; CHUANG, T.Y.; COLEMAN, J.J. Current therapy of cutaneous melanoma. **Plast. Reconstr. Surg.**,v.105, p.1774-99,2000.

WYLIE, S.; MACDONALD, I.C.; VARGHESE, H.J.; SCHMIDT, E.E.; MORRIS, V.L.; GROOM, A.C *et al.* The matrix metalloproteinase inhibitor batimastat inhibits angiogenesis in liver metastases of B16F1 melanoma cells. **Clin Exp Metastasis**. v.17, p.111-7, 1999.

XIONG, J. P.; STEHLE, T.; ZHANG, R.; JOACHIMIAK, A.; FRECH, M.; GOODMAN, S. L.; ARNAOUT, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha\beta 3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. **Science**, v. 296, n. 5565, p. 151-155, 2002

YOONA, T.J.; KIMA, T.J.; LEEA, H.; SHIN, K.S.; YUNC, Y.P.; MOONE, W.K.; KIME, D.W.; LEE, K.H. Anti-tumor metastatic activity of β -glucan purified from mutated *Saccharomyces cerevisiae*. **International Immunopharmacology** v. 8, p.36–42, 2008

YUDOH, K.; MATSUNO, H.; KIMURA, T. 1,25-dihydroxyvitamin d 3 inhibits in vitro invasiveness through the extracellular matrix and in vivo pulmonary metastasis of b16 mouse melanoma. **J Lab Clin Med** v. 133, p. 120-8, 1999.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.;CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos : a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil.**Quim. Nova**, v.24, p. 147-52, 2001

ZHAO, J.; QI, Q.; YANG, Y.; YOU, Q.D.; GU, H.Y.; WANG, W.; QIANG, L.Q.; ZHANG, L.B.; LU, NA.; LIU, W.; GUO, Q.L. Inhibition of α_4 integrin mediated adhesion was involved in the reduction of B16-F10 melanoma cells lung colonization in C57Bl/6 mice treated with gambogic acid. **European Journal of Pharmacology**. v. 589, p.127-31, 2008.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T.; SIM, G. A. Plant antitumor agents. i. the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *camptotheca acuminata*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 88, p.3888-90, 1966

WYLIE, S.; MACDONALD, I.C.; VARGHESE, H.J.; SCHMIDT, E.E.; MORRIS, V.L.; GROOM, A.C. *et al.* The matrix metalloproteinase inhibitor batimastat inhibits angiogenesis in liver metastases of B16F1 melanoma cells. **Clin Exp Metastasis**.v.17, n.2, p.111-7, 1999.

WOESSNER, J.F. Jr. The matrix metalloproteinase family. In: Parks WC, Mecham RP. Matrix metalloproteinases. San Diego: Academic Press; 1998. p.1-14.

WOESSNER, J.F. Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J.** v.5, n8, p.2145-54, 1991.

ZHAO, A. W.; LIUA, H.; XUA, S.; ENTSCHLADENB, F.; NIGGEMANNB, B.; ZAÈNKERB, K. S.; HAN, R. Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase. **Cancer Letters** v.162, p. S49±S55, 2001

ZHOU, Q.; SHERWIN, R. P.; PARRISH, C.; RICHTERS, V.; GROSHEN, S.G.; TSAO-WEI, D.; MARKLAND, F.S. Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 61, p. 249-260, 2000.

ZHOU, J.; CHEN, Y.; LANG, J.Y.; LU, J.J.; DING, J. Salvicine inactivates β_1 integrin and inhibits adhesion of mda-mb-435 cells to fibronectin via reactive oxygen species **Signaling. Mol Cancer Res** v. 6, n. 2, p. 194-204, 2008

Anexo



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes da Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366-8331 Fax (85) 3366-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 52/08, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMETASTÁTICA DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE PRODUTOS NATURAIS E COMPOSTOS SINTÉTICOS”**, de responsabilidade de Adriana Andrade Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 27 de agosto de 2008.

Fortaleza, 22 de setembro de 2008.


Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA