



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

**ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE NOVOS ÉSTERES SINTÉTICOS  
DERIVADOS DA MISTURA TRITERPENOIDICA  $\alpha$ -/ $\beta$ -AMIRINA EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS *IN VITRO***

**ASSUERO SILVA MEIRA**

**FORTALEZA - CE**

**2011**

**ASSUERO SILVA MEIRA**

**ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE NOVOS ÉSTERES  
SINTÉTICOS DERIVADOS DA MISTURA TRITERPENOIDICA  $\alpha$ -/ $\beta$ -  
AMIRINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO***

**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.**

**Orientadora: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa**

**FORTALEZA - CE**

**2011**

M451e Meira, Assuero Silva

Estudo do potencial citotóxico de novos ésteres sintéticos derivados da mistura triterpenoidica  $\alpha$ -/ $\beta$ -amirina em modelos experimentais *in vitro* / Assuero Silva Meira. – Fortaleza-Ce, 2011.

124f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia; Fortaleza-Ce, 2011.

1. Apoptose 2. Triterpenos 3. Ensaio de Seleção de Medicamentos Antitumorais I. Pessoa, Cláudia do Ó (Orient.) II. Título.

CDD: 615.31

**ASSUERO SILVA MEIRA**

**ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE NOVOS ÉSTERES  
SINTÉTICOS DERIVADOS DA MISTURA TRITERPENOIDICA  $\alpha$ -/ $\beta$ -  
AMIRINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO***

Dissertação submetida à coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título 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 em 31/01/2011

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti (Co-Orientador)  
Universidade Federal do Ceará

---

Profª. Dra. Mariana Lima Vale  
Universidade Federal do Ceará

---

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

*À Deus,*

*Aos meus pais,*

**Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:**

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

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

**Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP**

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

**Instituto Claude Bernard – InCb**

## AGRADECIMENTOS

À **Dra. Cláudia do Ó Pessoa**, que numa conversa de instantes, me deu a oportunidade de ser seu orientando. Sou muito agradecido pelo apoio e incentivo que me deu durante toda fase de meu mestrado. Obrigado professora pela amizade e confiança!

Ao **Dr. Bruno Cavalcanti** que muito ajudou com seu imenso conhecimento e disponibilidade. Obrigado pelo apoio, confiança e pelos conselhos dados em diversas oportunidades.

Ao **Dr. Manoel Odorico de Moraes** por proporcionar as melhores condições de trabalho no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) para que esse trabalho fosse realizado;

Ao **Washington** e a **Daisy** pela amizade e parceria em muitos experimentos, principalmente neste trabalho, que na verdade é nosso.

Aos professores **Jairo Diniz** e a **Maria Izabel**, por terem contribuído com valiosos conselhos no meu exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. Paulo N. Bandeira** por isolar e disponibilizar quantidades suficientes de amostra para realização desse trabalho;

À **Silvana** França, pois sem ela tudo seria mais difícil. Obrigado Sil pela paciência e dedicação.

À **Erivanda** e à **Rogéria** pelo suporte dado ao laboratório, fazendo acontecer todos os experimentos

À **Adelania Roque, Sheyla Prado e Maria das Graças**, pessoas que completam o laboratório, dando suporte técnico e emocional a todos!;

Ao **Felipe** a quem sou grato por muitas lições de citometria de fluxo e pela participação em muitos experimentos, mostrando-se sempre disponível.

Aos amigos do LOE: **Gabrilla, Patrícia, Aline Martins, Aline Sbardelloto, Prof. Hidenburgo, Vanesca, Danilo, Diego Veras, Delano, Ana Jérсия, , Hemerson, Adriana, , Cecília, Kristiana, Michel, Gardênia, Miller, Elthon, Arinice, Eveline, Rafael**, pela ajuda diária, companheirismo, aprendizado, apoio e discussões científico-metodológicas. E em especial aos amigos Bruno Cavalcanti e Igor (Boy do LOE), pela imensa ajuda na genotoxicidade e pela socialização, muitas vezes na sexta-feira, no Bitonho.

À **Aura Yda** pela disposição e boa vontade que a todos acolhe.

À meus pais, principalmente, à minha mãe, **Lucia Meira**, a quem devo minha vida, pelos seus conselhos apoio e verdadeira amizade. Todas as minhas conquistas também são dela. Ao meu pai, **Zilmar**, por ter me apoiado do seu jeito particular.

Aos meus irmãos, **Anrafel** e **Arioque**, diferentes personalidades que somados somos uma família forte e feliz.

À **Kelly Christine**, minha mulher, amiga e amante, a ela teria que dedicar uma dissertação inteira de linhas, pois sem seu amor, companheirismo e força nada disso teria acontecido. Obrigado amor pela paciência e carinho!

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

## RESUMO

### ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE NOVOS ÉSTERES SINTÉTICOS DERIVADOS DA MISTURA TRITERPENOIDICA $\alpha$ -/ $\beta$ -AMIRINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*

Dissertação de Mestrado. Autor: Assuero Silva Meira. Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cláudia do Ó Pessoa. Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. 2011

Triterpenóides são compostos que nos últimos anos têm despertados grande interesse em razão de sua diversidade estrutural e da descoberta de um amplo espectro de atividades farmacológicas. O presente estudo avaliou o potencial citotóxico de quatro derivados de uma mistura de  $\alpha$ -, $\beta$ -amirina em linhagens tumorais humanas. Dentre estes, apenas o composto 3-O-Carboximaleinato de  $\alpha$ -, $\beta$ -amirina (**3a/3b**) foi ativo, especialmente na linhagem leucêmica HL-60, com valores de IC<sub>50</sub> variando entre 1,8 e 3,0  $\mu$ M. Este derivado foi avaliado, também frente à outra linhagem leucêmica, K562, com IC<sub>50</sub> variando entre 1,76 e 2,96  $\mu$ M, sugerindo uma especificidade desta substância para leucemias. E sua especificidade para células tumorais foi confirmada em ensaios de citotoxicidade em células não transformadas, sendo testada em uma linhagem de macrófagos, J774 (IC<sub>50</sub> entre 3,10 e 3,60  $\mu$ M) e em células mononucleares do sangue periférico humano (CMSPH), cuja proliferação não foi impedida e não houve dano ao DNA destas células. Nenhum dos compostos mostrou atividade hemolítica contra eritrócitos de camundongos (EC<sub>50</sub> > 200  $\mu$ g/mL), o que sugere uma citotoxicidade por mecanismos de ação mais específicos. Desta forma, a fim de determinar o mecanismo de ação envolvido, uma sequência de experimentos *in vitro* foram realizados na linhagem HL-60. As células foram tratadas em diferentes concentrações da amostra **3a/3b** (1,5, 3,0 e 6,0  $\mu$ M) por 24h. A viabilidade das células HL-60 (teste azul de tripan e citometria de fluxo) foi reduzida nas concentrações de 3,0 e 6,0  $\mu$ M, após o tratamento. A análise morfológica das alterações celulares realizada por métodos de coloração (May-Grünwald-Giemsa e laranja de acridina/brometo de etídio (LA/BE)) e por citometria de fluxo (integridade de membrana) revelaram características típicas de células apoptóticas (membrana íntegra, redução do volume celular, núcleo picnótico e cromatólise), também nas concentrações de 3,0 e 6,0  $\mu$ M. Outros testes por citometria de fluxo revelaram que houve externalização da fosfatidilserina, que não houve formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e que a molécula **3a/3b** induziu apenas a via extrínseca da apoptose, pela ativação da caspase iniciadora 8 e a consequente ativação das caspases efetoras 3 e 7. Estes dados indicam um mecanismo citotóxico por indução de uma via apoptótica, envolvendo receptores de morte. Por conseguinte, estes resultados apontam o potencial citotóxico do análogo **3a/3b**.

**Palavras-chave:** *Protium heptaphyllum*, derivados de  $\alpha$ -, $\beta$ -amirina, atividade citotóxica e apoptose

## ABSTRACT

### STUDY OF CYTOTOXIC POTENTIAL OF NEW SYNTHETIC ESTERS DERIVATIVES OF THE TRITERPENOID MIXTURE $\alpha$ -/ $\beta$ -AMIRINA IN EXPERIMENTAL MODELS IN VITRO.

Dissertation. Author: Assuero Silva Meira. Advisor: Dr. Cláudia do Ó Pessoa. Post-graduate in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará. 2011.

Triterpenoids are compounds that in recent years have aroused considerable interest because of their structural diversity and the discovery of a broad spectrum of pharmacological activities. This study evaluated the cytotoxic potential of four derivatives of a mixture of  $\alpha$ -,  $\beta$ -amyirin in human tumor cell lines. Among these, only compound 3-O- $\alpha$ -Carboximaleinato of,  $\beta$ -amyirin (**3a/3b**) was active, especially in the leukemic cell line HL-60, with IC<sub>50</sub> values ranging from 1.8 to 3.0  $\mu$ M. This derivative had its cytotoxic evaluated, also at the other leukemia cell line, K562, with IC<sub>50</sub> values ranging between 1.76 and 2.96  $\mu$ M, suggesting a specificity of this substance for leukemia. And their specificity for tumor cells was confirmed in cytotoxicity assays in a strain of macrophages, J774 (IC<sub>50</sub> between 3.10 and 3.60  $\mu$ M) and mononuclear cells in human peripheral blood mononuclear cells, whose proliferation was not prevented, and there wasn't damage in the DNA of these cells. None of the compounds showed hemolytic activity against erythrocytes of mice (EC<sub>50</sub>> 200 mg / mL), suggesting a cytotoxic mechanism more specific. Thus, to determine the mechanism of action involved, sequences of in vitro experiments were performed in HL-60 cell line. Cells were treated at different concentrations of the sample **3a/3b** (1.5, 3.0 and 6.0  $\mu$ M) during 24h. The viability of HL-60 cells (trypan blue test and flow cytometry) was reduced at concentrations of 3.0 and 6.0  $\mu$ M after treatment. Morphological analysis of cellular changes performed by staining methods (May-Grünwald-Giemsa and acridine orange / ethidium bromide (LA / BE)) and by flow cytometry (membrane integrity) showed typical features of apoptotic cells (intact membrane, reduction of cell volume, picnotic nucleus and chromatolysis), also at concentrations of 3.0 and 6.0  $\mu$ M. Further testing by flow cytometry revealed that there was externalization of phosphatidylserine, there was no formation of reactive oxygen species (ROS) and that the molecule **3a/3b** only induced the extrinsic pathway of apoptosis by activation of initiator caspase 8 and subsequent activation of caspases 3 and 7. These data indicate a cytotoxic mechanism induced by an apoptotic pathway, involving death receptors. Therefore, these results indicate the cytotoxic potential of **3a/3b** analogue.

**Keywords:** *Protium heptaphyllum*, derivatives of  $\alpha$ -, $\beta$ -amyirin, cytotoxic activity, apoptosis

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Marcos do Câncer.....	19
<b>Figura 2</b>	Estágios da carcinogênese química e os eventos envolvidos em cada um.....	20
<b>Figura 3</b>	Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira.....	22
<b>Figura 4</b>	Características morfológicas da apoptose e necrose.....	27
<b>Figura 5</b>	Via extrínseca da apoptose.....	29
<b>Figura 6.</b>	Via intrínseca da apoptose.....	31
<b>Figura 7</b>	Fármacos derivados de produtos naturais introduzidos em 2007 no mercado farmacêutico.....	33
<b>Figura 8</b>	Atividades farmacológicas atribuídas aos grupos triterpenóides: lupeol, ácido oleanólico, ácido betulínico, betulino e ácido ursólico.....	34
<b>Figura 9</b>	Estrutura química de alguns compostos triterpenos.....	35
<b>Figura 10</b>	Derivados de $\alpha$ -amirina ( $R_1 = H$ , $R_2 = CH_3$ ) e $\beta$ -amirina ( $R_1 = CH_3$ , $R_2 = H$ ).....	37
<b>Figura 11</b>	Padrão de dano ao DNA para o ensaio cometa.....	61
<b>Figura 12</b>	Efeito do composto <b>3a/3b</b> sobre a viabilidade de células da linhagem HL-60 determinado pelo teste do azul de tripan após 24 h de incubação.....	66
<b>Figura 13</b>	Efeito do composto <b>3a/3b</b> sobre a concentração de células viáveis da linhagem HL-60, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.....	67
<b>Figura 14</b>	Análise morfológica de células da linhagem HL-60 após 24 h de incubação, coradas com May-Grünwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica.....	70
<b>Figura 15</b>	Efeito do composto <b>3a/3b</b> sobre a viabilidade de células da linhagem HL-60 coradas com Brometo de etídeo/Laranja de acridina determinado por microscopia de fluorescência após 24 h de incubação.....	71

<b>Figura 16</b>	Efeito do composto <b>3a/3b</b> sobre a integridade de membrana de células da linhagem HL-60, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.....72
<b>Figura 17</b>	Efeito da amostra <b>3a/3b</b> (1,5 $\mu$ M, C - 3,0 $\mu$ M, D e 6,0 $\mu$ M, E) sobre a morfologia de células HL-60 determinado por citometria de fluxo.....73
<b>Figura 18</b>	Efeito do composto <b>3a/3b</b> sobre a peroxidação lipídica em células leucêmicas HL-60, analisado pelo método colorimétrico do TBARS, após 24 horas de incubação.....74
<b>Figura 19</b>	Efeito do composto <b>3a/3b</b> sobre a externalização da fosfatidilserina em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação.....77
<b>Figura 20</b>	Efeito do composto <b>3a/3b</b> sobre a externalização da fosfatidilserina em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação. Análise da apoptose.....78
<b>Figura 21</b>	Efeito da amostra <b>3a/3b</b> sobre a geração de EROs em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando H <sub>2</sub> -DCF-DA, após 1 e 3 horas de incubação.....79
<b>Figura 22</b>	Efeito do composto <b>3a/3b</b> sobre a ativação de caspase iniciadora 8 (A) e caspase iniciadora 9 (B) em células leucêmicas de HL-60 determinado por citometria de fluxo utilizando FLICA e FAM (verde), após 24 horas de incubação.....81
<b>Figura 23</b>	Efeito da amostra <b>3a/3b</b> sobre a ativação de caspases efetoras 3 e 7 em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando FLICA e FAM (verde), após 24 horas de incubação.....82
<b>Figura 24</b>	Conclusão dos resultados alcançados com o protótipo <b>3a/3b</b> .....95

## LISTA DE TABELAS

<b><u>Tabela 1</u></b>	Aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares dos diferentes tipos de morte celular.....25
<b><u>Tabela 2</u></b>	Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> por meio do teste do MTT.....45
<b><u>Tabela 3</u></b>	Atividade citotóxica dos compostos triterpênicos ( <b>1a/1b</b> , <b>2a/2b</b> , <b>3a/3b</b> , <b>4a/4b</b> ) em linhagens celulares de câncer e normais.....64
<b><u>Tabela 4</u></b>	Efeito do composto <b>3a/3b</b> sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.....75
<b><u>Tabela 5</u></b>	Avaliação do potencial genotóxico do composto <b>3a/3b</b> em CMSPH (células mononucleares do sangue periférico humano) pelo ensaio do cometa, após 24 h de incubação.....83

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>®</b>	Marca Registrada
<b>ANOVA</b>	Analisis of Variance (Análise de Variância)
<b>BE/LA</b>	Brometo de Etídio / Laranja de Acridina
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>E.P.M.</b>	Erro Padrão da Média
<b>FDA</b>	U.S. Food and Drug Administration
<b>HTS</b>	High Throughput Screening
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração Inibitória Média
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
<b>pH</b>	Potencial Hidrogênionico
<b>q.s.p</b>	Quantidade suficiente para
<b>RNM</b>	Ressonância Nuclear Magnética
<b>RPMI</b>	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
<b>TBS</b>	Tris Buffer Solution (Tampão Tris)
<b>US-NCI</b>	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1</b>	<b>Câncer.....</b>	<b>18</b>
1.1.1	Aspectos gerais.....	18
1.1.2	Epidemiologia do câncer.....	21
1.1.3	Tratamento do câncer.....	22
<b>1.2</b>	<b>Tipos de morte celular.....</b>	<b>23</b>
<b>1.3</b>	<b>Desenvolvimento de drogas a partir de produtos naturais.....</b>	<b>32</b>
<b>1.4</b>	<b>Triterpenos – alfa-/beta-amirina.....</b>	<b>34</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>38</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>38</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Métodos.....</b>	<b>44</b>
3.2.1	Isolamento da mistura da $\alpha$ -, $\beta$ -amirina ( <b>a/b</b> ).....	44
3.2.2	Linhagens celulares.....	45
3.2.2.1	Obtenção e cultivo das células tumorais.....	45
3.2.2.2	Obtenção das células mononucleares do sangue periférico.....	46
3.2.3	Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas - teste do MTT.....	47
3.2.4	Avaliação da atividade antiproliferativa em células mononucleares de sangue humano periférico (cmsp) – ensaio do alamar blue.....	48
3.2.5	Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos swiss ( <i>mus musculus</i> ).....	50
3.2.6	Estudo do padrão de morte celular e do efeito sobre a progressão do ciclo celular.....	51

3.2.6.1	Determinação da viabilidade celular - teste do azul de tripan.....	51
3.2.6.2	Análise morfológica - coloração por may-grunwald-giemsa.....	52
3.2.6.3	Análise morfológica - coloração diferencial por brometo de etídio/laranja de acridina.....	53
3.2.6.4	Determinação da peroxidação lipídica pela medição de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS).....	54
3.2.6.5	Testes utilizando citometria de fluxo.....	55
3.2.7	Avaliação do potencial genotóxico - ensaio cometa.....	60
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Avaliação da atividade citotóxica e hemolítica dos compostos triterpênicos.....</b>	<b>63</b>
<b>4.2</b>	<b>Avaliação da viabilidade de células HL-60 após tratamento com o composto 3a/3b.....</b>	<b>64</b>
<b>4.3</b>	<b>Avaliação da morfologia de células HL-60 após tratamento com o composto 3a/3b.....</b>	<b>67</b>
<b>4.4</b>	<b>Determinação da peroxidação lipídica pela medição de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS).....</b>	<b>73</b>
<b>4.5</b>	<b>Avaliação do efeito do composto 3a/3b sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HL-60.....</b>	<b>74</b>
<b>4.6</b>	<b>Determinação da externalização da fosfatidilserina.....</b>	<b>75</b>
<b>4.7</b>	<b>Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio.....</b>	<b>78</b>
<b>4.8</b>	<b>Efeitos da amostra 3a/3b sobre a ativação das caspases iniciadoras 8 e 9 em células HL-60.....</b>	<b>79</b>
<b>4.9</b>	<b>Efeitos da amostra 3a/3b sobre a ativação das caspases efetoras 3 e 7 em células HL-60.....</b>	<b>82</b>
<b>4.10</b>	<b>Avaliação do potencial genotóxico em células tumorais humanas de HL-60 e células mononucleadas de sangue periférico (CMSP).....</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>

<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>115</b>
<b>8.1</b>	<b>Anexo I – artigo: amyirin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells.....</b>	<b>115</b>
<b>8.2</b>	<b>Anexo II – Menção honrosa, no XXI simpósio de plantas medicinais do Brasil.....</b>	<b>125</b>

## 1. INTRODUÇÃO

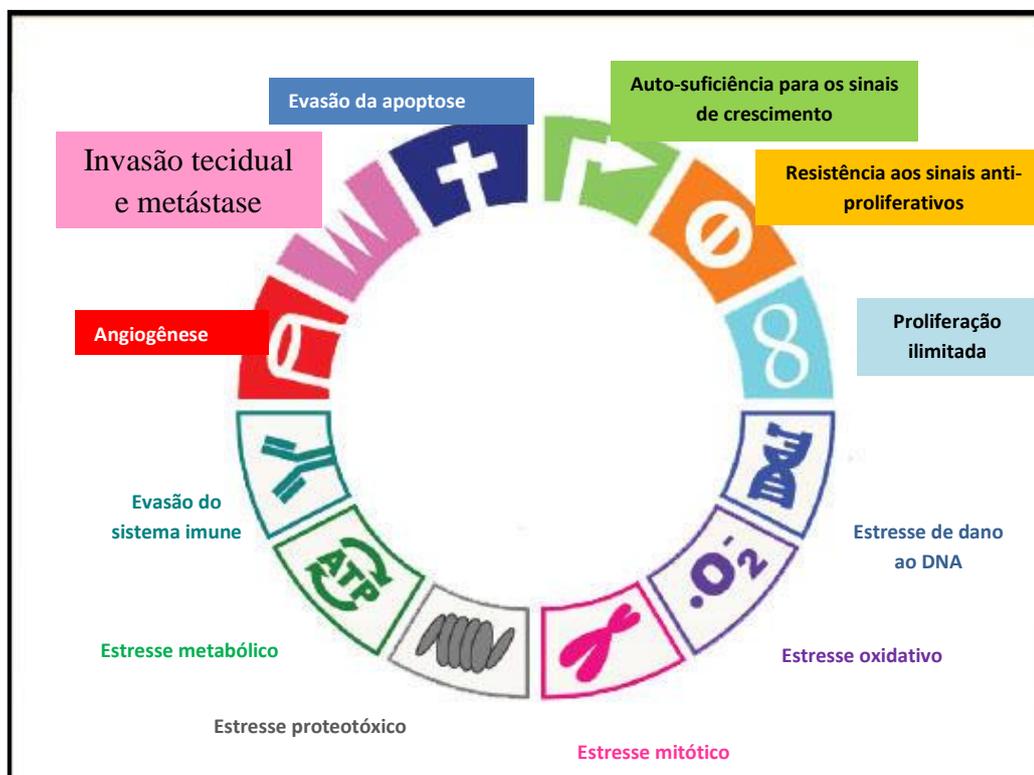
### 1.1 Câncer

#### 1.1.1 Aspectos gerais

O câncer é uma doença que há muito tempo acompanha a humanidade, muitos trabalhos relatam a presença de tumores malignos encontrados no esqueleto de pessoas que viveram em sociedades da antiga Grécia, Egito e Chile. Recentemente, foi feito o primeiro diagnóstico histopatológico de um câncer retal, em uma múmia egípcia (DAVID & ZIMMERMAN, 2010), o que confirma a presença desta patologia em épocas muito diferentes da nossa sociedade.

A origem da palavra câncer (caranguejo, em grego) veio da Grécia antiga com Hipócrates, pai da medicina, que fez uma analogia entre o crescimento infiltrante do câncer e a forma como esse crustáceo se prende ao solo usando suas patas. Atualmente, câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (BROWN & ATTARDI, 2005). Estas células são definidas por múltiplas características estruturais, moleculares e comportamentais. De acordo com uma descrição recente, algumas alterações são ditas como essenciais na fisiologia celular; coletivamente, determinam o crescimento maligno, sendo descritos como marcos do câncer. Dentre estes marcos, pode-se citar: auto-suficiência na regulação dos sinais de crescimento celular, a insensibilidade aos sinais que inibem este crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), ilimitado potencial replicativo, indução da angiogênese, invasão tecidual e metástases, estresse metabólico, proteotóxico, mitótico, oxidativo e de dano ao DNA (**Figura 1**). Além disso, os tumores evoluíram de forma a garantir apoio nas células do estroma, atrair novos vasos sanguíneos, e, finalmente, adquiriram estratégias para escapar da detecção imunológica (HANAHAN & WEINGER, 2000; KNOWLES & SELBY, 2005; BALDUCCI, 2007; KROEMER & POUYSSEGUR, 2008; LUO *et al.*, 2009). Muitos desses traços fenotípicos podem ser provocados por alterações genéticas que envolvem amplificação funcional, através de mutações, e/ou superexpressão de oncogenes chaves, juntamente com

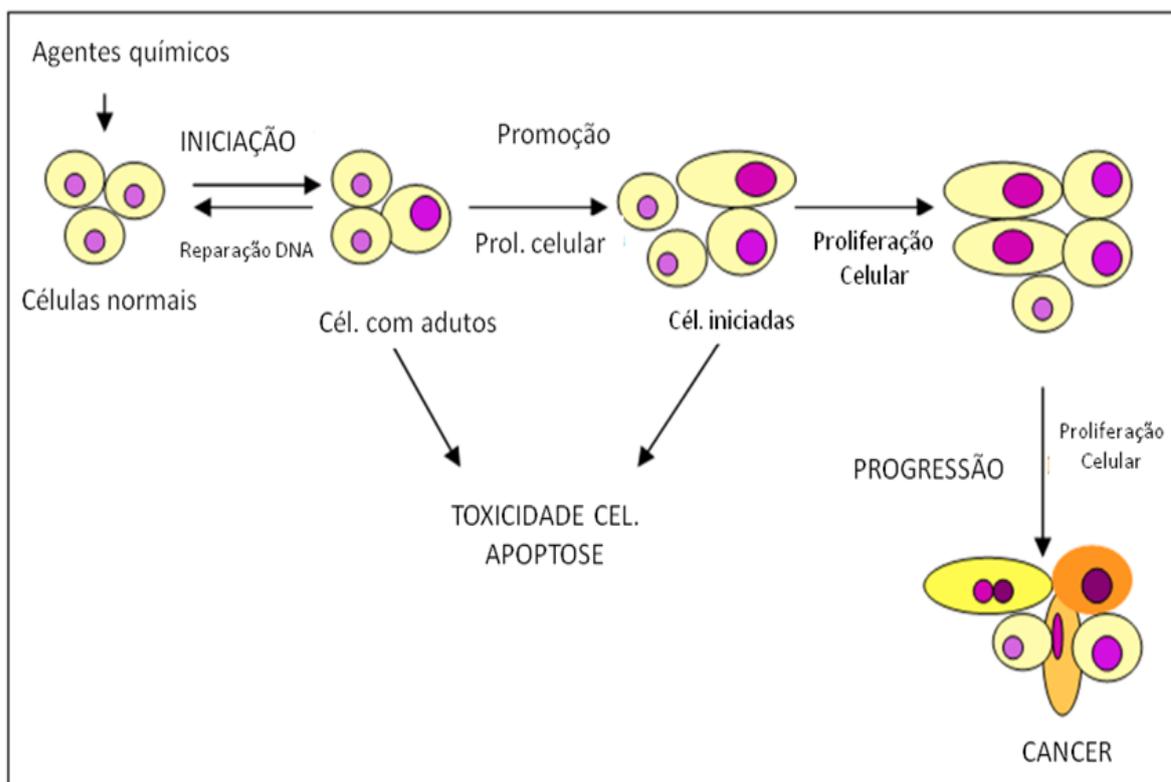
mutações que causam perda de função (deleção) e/ou supressão de silenciadores epigenéticos, importantes na supressão tumoral (MERLO *et al*, 2006; VINEIS *et al*, 2010).



**Figura 1:** Marcos do Câncer. Adaptado de LUO *et al.*, 2009.

A aquisição destes fenótipos, pelas células (processo denominado de carcinogênese), se dá em grande parte pela reativação e modificação de muitos programas celulares, normalmente usados durante o desenvolvimento normal, os quais controlam a proliferação celular, migração, polaridade, apoptose e diferenciação durante a embriogênese e homeostase tecidual (LUO *et al*, 2009). E dentre os fatores que ajudam a promover essas alterações celulares estão a idade (FOLKMAN & KALLURI, 2004), hereditariedade (ARENDS, 2000) e os fatores ambientais, que são bem representados pelo cigarro, dieta e radiação (HECHT, 1999; GOLDMAN & SHIELDS, 2003; MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2004), colocam o organismo em contato com diversos componentes químicos capazes de interagir com várias moléculas na célula, inclusive o DNA. O acúmulo de alterações, que podem ocorrer mais rápido do que os mecanismos celulares de reparo dão origem a um processo denominado de “carcinogênese química”, dividida conceitualmente em quatro etapas: iniciação, promoção, conversão para a malignidade e progressão tumoral (**Figura 2**). As

mudanças genéticas resultante da interação química-DNA são definida como iniciação. Com o passar do tempo, ocorrem mudanças genéticas adicionais. Oncogenes tornam-se ativos e genes supressores de tumor juntamente com genes de reparo do DNA tornam-se inativos, levando a uma instabilidade genômica. Com a continuidade do processo, o cenário direciona-se para as transformações malignas (expressão de fenótipos malignos), progressão tumoral e metástase (WEINBERG, 2008; KUMMAR *et al.*, 2004; RIEGER, 2004; BERTRAM, 2001).



**Figura 2.** Estágios da carcinogênese química e os eventos envolvidos em cada um. Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2007.

### 1.1.2 Epidemiologia do câncer

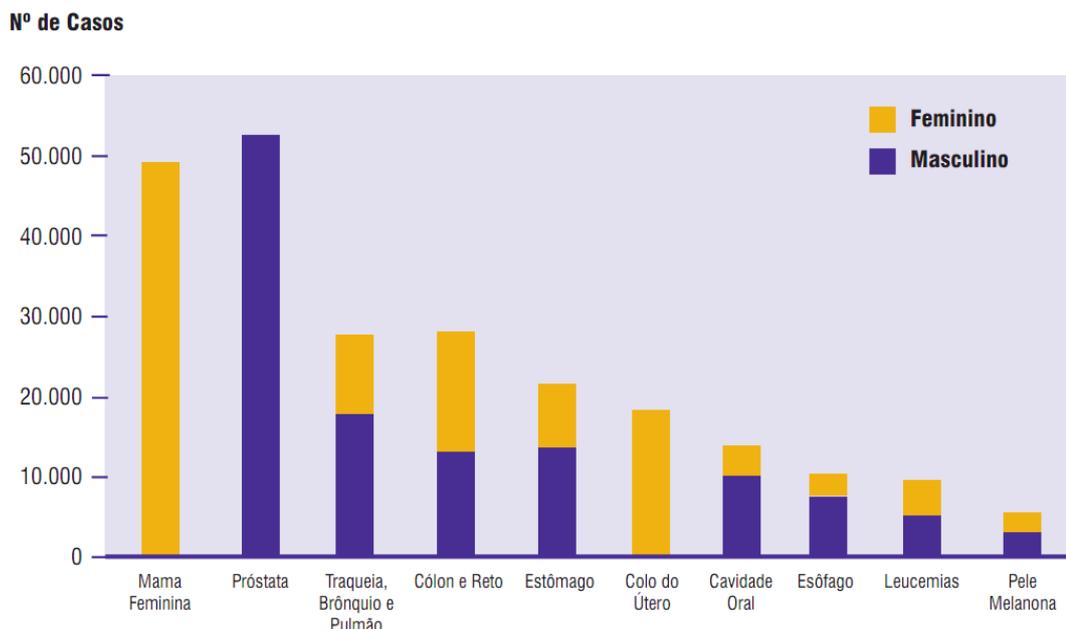
Estudos epidemiológicos da incidência de câncer demonstraram que o risco de desenvolvê-lo varia entre os grupos populacionais e estas diferenças são associadas com fatores do estilo de vida e hábitos individuais (GUTIÉRREZ & SALSAMENDI, 2001). E no dia mundial de combate ao câncer, 4 de fevereiro de 2010 a *World Health Organization* (WHO) disse que alterações no de estilo de vida, uma melhor prevenção e rastreamento podem evitar em até 40% dos casos de câncer.

As mais recentes estatísticas, anunciadas pela WHO, mostram que o câncer causa em torno de 7,6 milhões de mortes em todo o planeta a cada ano. Destes, mais de 72% ocorrem em países de baixa e média renda. E as estimativas anunciam que as mortes provocadas pelo câncer atingirão em 2030 o valor de 17 milhões em todo o mundo.

O câncer de pulmão continua sendo o grande vilão matando a cada ano mais pessoas do que qualquer outro tipo de câncer. Alguns tipos de câncer são mais comuns em países desenvolvidos, tais como o câncer de próstata, de mama e cólon. Enquanto, o câncer de fígado, estômago e cérvix, são mais comuns em países em desenvolvimento (WHO, 2010)

No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010, serão válidas também para o ano de 2011, e apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina. (INCA, 2009).

Em 2010, ocorreram mais de 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (**Figura 3**).



**Figura 3.** Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira. Fonte: INCA, 2009.

Diante desse cenário, fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação, como: na promoção da saúde, na detecção precoce, na assistência aos pacientes, na vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social, na pesquisa e na gestão do Sistema Único de Saúde (SUS).

### 1.1.3 Tratamento do câncer

Atualmente, as abordagens terapêuticas mais usadas nos pacientes com câncer, após a cirurgia, são a quimioterapia, a radiação ionizante, a imunoterapia e a terapia gênica (KUMAR *et al.*, 2004). A quimioterapia consiste em um tratamento a base de fármacos, de forma isolada ou combinada (poliquimioterapia), com o objetivo de atingir, apenas, as células transformadas, interferindo no processo de crescimento, disseminação e/ou invasão tecidual (SOUZA *et al.*, 2007). O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as células normais (FULDA & DEBATIN, 2004).

No entanto, apesar do considerável arsenal de drogas já existentes para o tratamento do câncer, em muitos casos, o sucesso terapêutico não é alcançado por causa de falhas nos

esquemas terapêuticos, altos índices de recidivas, redução da sobrevida dos pacientes e dos efeitos adversos, o que leva a uma contínua busca por novos fármacos (SALGALLER & LODGER, 1998). A resistência ao tratamento, seja inerente ou adquirida, é um problema grave, pois reduz a atividade de drogas contra o câncer, desde aquelas convencionais, como as mais modernas, orientadas a um alvo molecular. Um quadro mais complexo das causas e das contribuições de formas específicas de resistência está emergindo através da aplicação de tecnologias de expressão farmacológica, genética e proteômica e entramos em um momento emocionante, onde novas ferramentas de pesquisa molecular estão sendo aplicadas não só para caracterizar as causas de tais resistências, mas na identificação racional de novos tratamentos e combinações de tratamentos que estão sendo rapidamente traduzida para avaliações clínicas com êxito crescente (O'CONNOR *et al*, 2007).

## 1.2 Tipos de morte celular

A morte celular pode ser classificada de acordo com sua aparência morfológica (que pode ser apoptótica, necrótica, autofágica ou associada com a mitose), com critérios enzimáticos (com e sem envolvimento de nucleases, ou de classes distintas de proteases, tais como caspases, catepsinas e transglutaminases), aspectos funcionais (programada ou acidental, fisiológica ou patológica) ou através de características imunológicas (imunogênica ou não imunogênica) (MELINO, 2001).

E quando se pode dizer que uma célula está morrendo? As células em processo de morte começam um mecanismo inicialmente reversível, até um ponto que não há retorno, no qual se torna irreversível (KROEMER, *et al*, 2009). Tem sido proposto que este ponto poderia ser representado pela massiva ativação de caspases (COHEN, 1997), perda do potencial transmembrana da mitocôndria (GREEN & KROEMER, 2004) ou a exposição de resíduos de fosfatidilserina, que emitem sinais para as células da vizinhança a fagocitarem. Contudo a dezenas de trabalhos que mostram a ativação de caspases num contexto não letal e em mecanismos de diferenciação (GARRIDO & KROEMER, 2004; GALLUZZI *et al*, 2008). O potencial transmembrana da mitocôndria pode ser dissipado por protonóforos sem a progressão imediata para morte celular. Além disso, a exposição de resíduos de fosfatidilserina pode ser reversível, por exemplo em neutrófilos granulocíticos (YANG *et al*, 2002).

Neste sentido, a fim de determinar características que definam um mecanismo irreversível de morte celular o *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD) propôs que uma célula deverá ser considerada em processo de morte, quando qualquer uma das seguintes características morfológicas ou bioquímicas forem encontradas: perda da integridade da membrana, como definido pela incorporação de corantes vitais (exemplo: Iodeto de Propídeo) *in vitro*; presença de fragmentação celular e nuclear, dentro de pequenos corpos (formação de corpos apoptóticos); e/ou presença de fagossomos *in vivo* (KROEMER, *et al*, 2009)

A **tabela 1** mostra os principais aspectos morfológicos e bioquímicos dos vários tipos de morte celular.

**Tabela 1.** Aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares dos diferentes tipos de morte celular.

Tipo de morte celular	Características Morfológicas	Características Bioquímicas
Apoptose	<p>Células arredondadas</p> <p>Retração de pseudópodes</p> <p>Redução do volume celular e nuclear (picnose)</p> <p>Fragmentação nuclar (Cariorrexe)</p> <p>Pequena modificação de organelas citoplasmáticas</p> <p>Formação de <i>blebbing</i></p> <p>Absorção dos corpos apoptóticos pelas células fagocíticas <i>in vivo</i></p>	<p>Ativação de proteína pró-apoptóticas, como as da família Bcl-2 (ex.: Bax, Bad, Bid etc.)</p> <p>Ativação de caspases</p> <p>Dissipação do potencial transmembrana da mitocôndria</p> <p>Permeabilização da membrana mitocondrial</p> <p>Fragmentação oligonucleossomal do DNA</p> <p>Ruptura da membrana plasmáticas</p> <p>Exposição de resíduos de fosfatidilserina</p> <p>Excesso na produção de EROs</p> <p>Acúmulo de DNAss</p>
Autofagia	<p>Ausência de condensação da cromatina</p> <p>Vacuolização do citoplasma</p> <p>Acumulação de (duplo membranados) vacúolos autofágicos</p> <p>Pouca ou nenhuma</p>	<p>Dissociação da Beclina-1 da Bcl-2/X<sub>L</sub></p> <p>Dependência dos produtos gênicos do <i>atg</i></p> <p>Conversão de LC3-I em LC3-II</p> <p>Degradação de p62<sup>Lck</sup></p>

---

	absorção pelas células fagocíticas, <i>in vivo</i>	
Cornificação	Eliminação de organelas citosólicas	Expressão de TGs
	Modificações da membrana plasmática	Expressão de substratos TGs
	O acúmulo de lipídios nos grânulos F e L	Atividade <i>crosslinking</i>
	Extrusão de lipídios no espaço extracelular	
	Descamação (perda de corneócitos) pela ativação de protease	
Necrose	Inchaço citoplasmático (oncoses)	Ativação de calpaínas
	A ruptura da membrana plasmática	Ativação de catepsinas
	Inchaço das organelas citoplasmáticas	Colapso nos níveis de ATP
	Moderada condensação da cromatina	HMGB-1 libera LMP
		Fosforilação de RIP-1
		Ubiquitinação de RIP-1
		Aumento na geração de EROs
		Padrão específico na clivagem do PARP-1

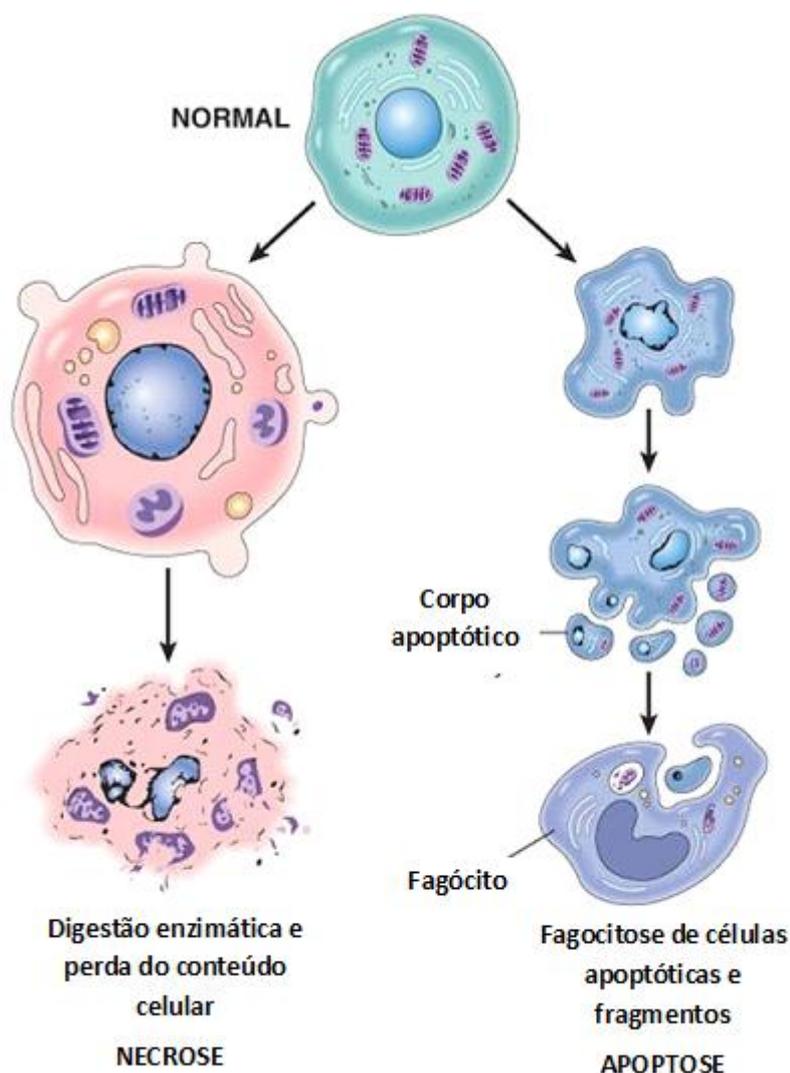
---

Abreviações: EROs, espécies reativas de oxigênio; LC3, proteína associada a microtúbulo (cadeia leve 3); TG, transglutaminase; HMGB1, proteína de alta mobilidade grupo Box 1; LMP, permeabilização de membrana lipossomal.; Receptor de interação protéica, RIP-1; Poli ADP ribose polimerase, PARP.

Fonte: Adaptado de KROEMER, *et al*, 2009.

A apoptose é caracterizada por mudanças morfológicas típicas e bem definidas (**Figura 4**), além da formação de corpos apoptóticos que contém material nuclear e

citoplasmático que são subseqüentemente fagocitados por macrófagos, não havendo assim extravasamento de material pró-inflamatório (KERR *et al*, 1972; DANIAL & KORSMEYER, 2004). Dentre as mudanças bioquímicas características da apoptose estão a clivagem proteolítica por caspase (RICCI & ZONG, 2006), externalização da fosfatidilserina (PS) (FADOK *et al*, 1992; DENECKER *et al*, 2001), mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial com perda do potencial de membrana (KROEMER & REED, 2000, RICCI & ZONG, 2006), liberação de proteínas presentes no espaço intermembranar da mitocôndria (VAN LOO *et al*, 2002), dentre outras. (Tabela 1)



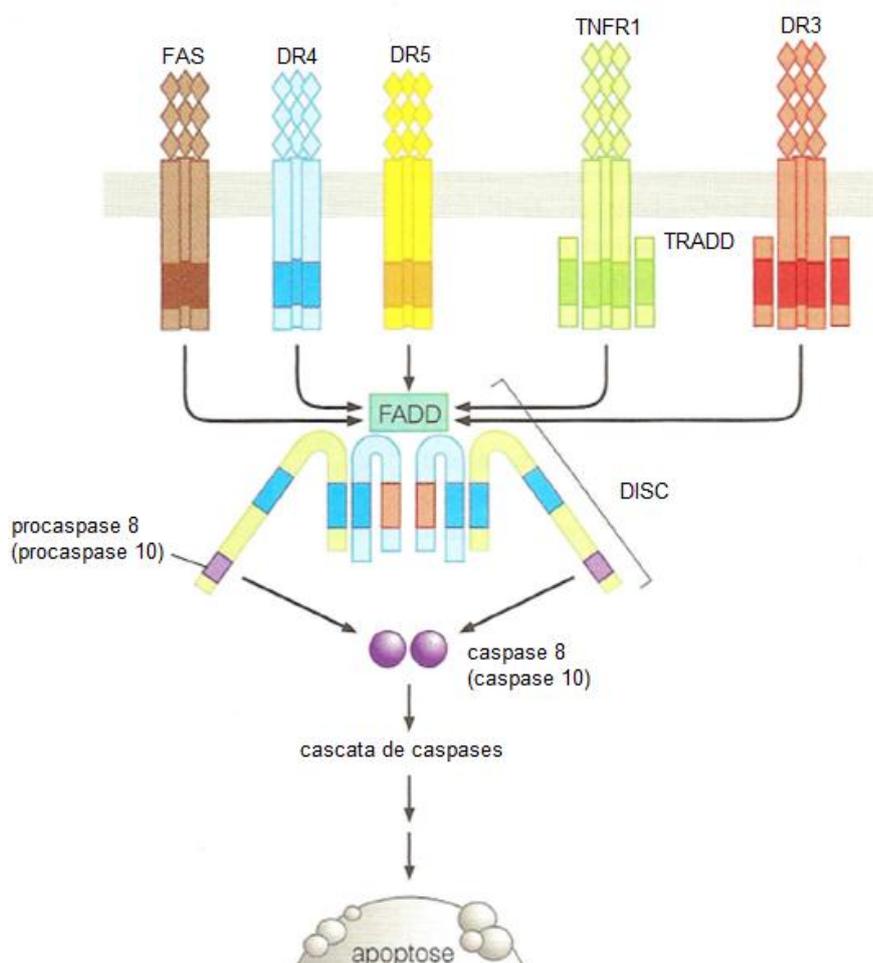
**Figura 4.** Características morfológicas da apoptose e necrose. Adaptado de Grivicich *et al*, 2007.

Há duas vias distintas de sinalização molecular que levam à morte celular por apoptose, a via intrínseca ou mitocondrial e a via extrínseca ou via do receptor de morte (MARTELLI *et al*, 2001; FADEEL & ORRENIUS, 2005).

A via extrínseca desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (MARTELLI *et al*, 2001).

Todos os membros da família rTNF, que incluem Fas, TNFR1, DR3, DR4 e DR5, possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes. Tal fato resulta na trimerização e conseqüente ativação dos receptores de morte específicos. A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma seqüência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular" (BUDIHARDJO *et al*, 1999; ZIMMERMANN *et al.*, 2001)

Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD (domínio de morte associado à Fas), ou TRADD (domínio de morte associado ao TNF) (ASHKENAZI, 2002). O complexo resultante é chamado DISC (complexo de sinalização indutor de morte) que atua na conversão das procaspases iniciadoras (8 e/ou 10) em suas respectivas caspases ativas através de clivagem autoproteolítica (DONEPUDI *et al.*, 2003; FADEEL & ORRENIUS, 2005). Após ativação das procaspases 8 e /ou 10 em suas caspases ativas, estas últimas convergem na cascata apoptótica intrínseca clivando e ativando as caspases executoras (3, 6 e 7) culminando assim com morte celular por apoptose (GUIMARÃES & LINDEN, 2004) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Via extrínseca da apoptose. Adaptado de Weinberg, 2008.

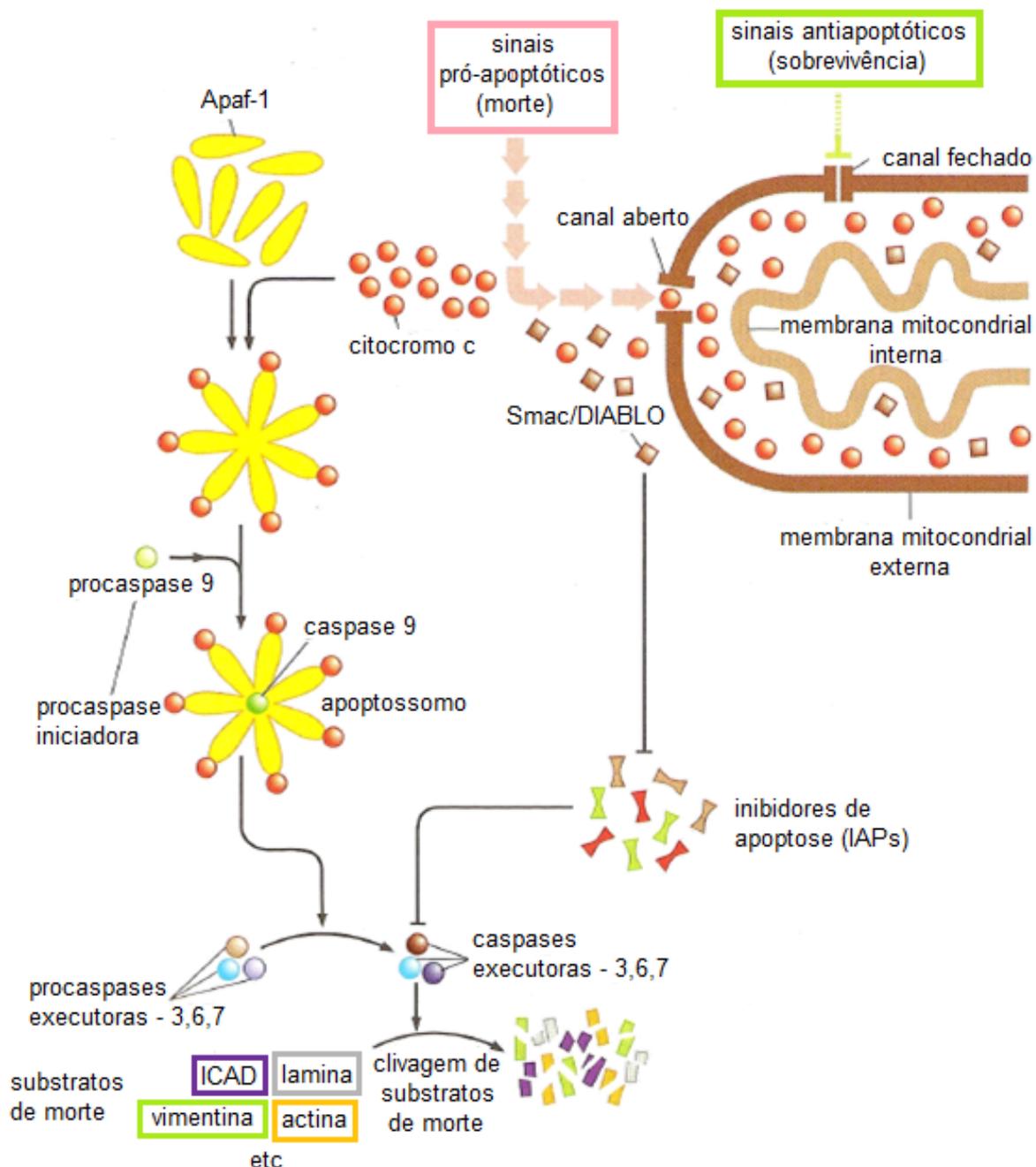
A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER, 2000). Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (GRIVICICH *et al.*, 2007).

Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ( $\Delta\psi$ ), bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Ao mesmo tempo, a água do espaço entre membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e conseqüente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (LOEFFLER & KREMER, 2000; GUPTA, 2003). Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a alteração do  $\Delta\psi$  e TPM levam à perda da

homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) (KROEMER & REED, 2000). O aumento nos níveis de EROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do  $\Delta\psi$  (GREEN & KROEMER, 2004). A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Além disso, é sabido que as EROS induzem a ativação das caspases -9 e -3 (GOTTLIEB, 200; WEINBERG, 2008).

Alguns estudos indicam que durante a apoptose ocorre a formação de um megaporo que contém diversas proteínas e abrange as membranas interna e externa da mitocôndria (WETZEL & GREEN, 1999). Através desse poro ocorre a liberação do citocromo c para o citoplasma onde participa da ativação da apoptose. Os diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e conseqüente liberação de citocromo c e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol (LOEFFLER & KREMER, 2000). Quando no citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 (protease apoptótica ativadora do fator 1) e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa (GUIMARÃES & LINDEN, 2004). Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (**Figura 6**).

Mais recentemente, foi descrita a participação, na via mitocondrial, de uma flavoproteína conhecida por Fator Indutor de Apoptose (AIF). A AIF migra da mitocôndria para o núcleo após um estímulo de apoptose e induz a condensação da cromatina e fragmentação do DNA em fragmentos de 50Kb, independente da ativação das caspases (BRÖKER *et al*, 2005).



**Figura 6.** Via intrínseca da apoptose. Adaptado de Danial & Korsmeyer 2004.

A necrose, como mostrado na **tabela 1** constitui uma forma de morte celular passiva e independente de energia (PROSKURYAKOV *et al.*, 2003). Os marcos desse tipo de morte envolve alterações dramáticas na mitocôndria, incluindo despolarização mitocondrial, depleção de ATP, geração de EROs (espécies reativas de oxigênio), perda da homeostase de cálcio, além de causar vacuolização citoplasmática, perda de integridade da membrana,

inchaço da célula seguido de lise completa, sem formações de vesículas, e desintegração das organelas. (LOURO *et al.*, 2002; ZONG & THOMPSON, 2006).

Por um longo tempo, a necrose tem sido considerada apenas como uma forma acidental incontrollada de morte celular, mas a evidências que a execução da morte celular por necrose pode ser finamente regulada por um conjunto de vias de transdução de sinal e mecanismos catabólico. Por exemplo, o domínio de receptores de morte (TNFR1, Fas/CD95 and TRAIL-R) e receptores *Toll-like* (TLR3 and TLR4) tem demonstrado que provocam necrose, em especial na presença de inibidores de caspase. Esse tipo de necrose estaria presente nas doenças neurodegenerativas, doenças inflamatórias, infecções e câncer, bem como em outros processos. Dentre as características morfológicas da necrose programada estão a despolarização mitocondrial, ativação de proteases (não-caspase), perda da homeostase de cálcio, depleção de ATP e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ZONG & THOMPSON, 2006)

A autofagia é morfológicamente definido como um tipo de célula morte que ocorre na ausência de condensação da cromatina mas acompanhada por vacuolização autofágica maciça do citoplasma (**Tabela 1**). Em contraste com as células apoptóticas (cuja depuração é assegurada por imersão e degradação lisossomal), células que passam por este processo apresentam uma morfologia que têm pouca ou nenhuma associação com os fagócitos (Baehrecke, 2005; Clarke, 1990).

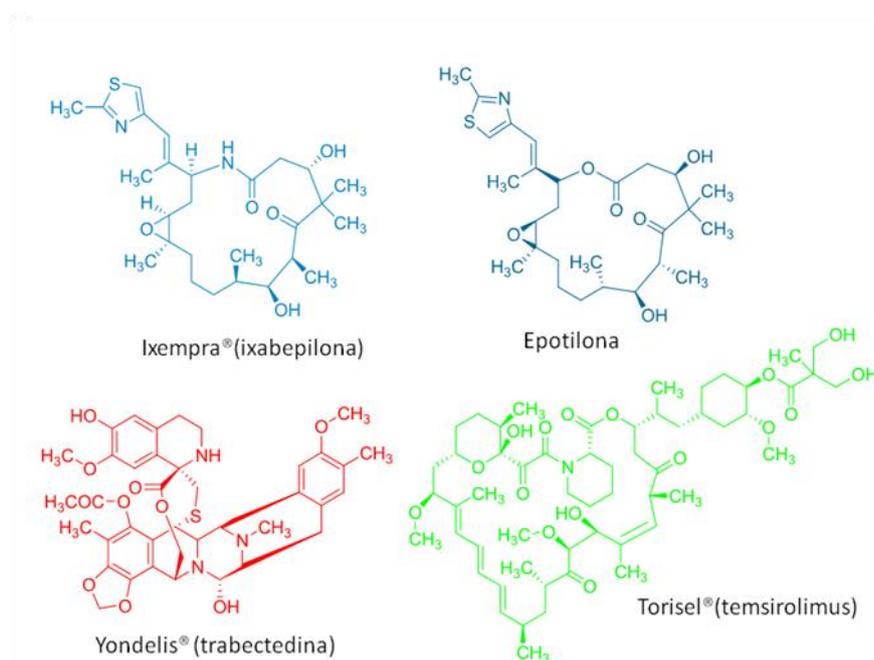
Cornificação é uma forma muito específica de morte celular programada, que ocorre na epiderme, morfológicamente e bioquimicamente distinta da apoptose. Este tipo de morte leva à formação de corneócitos, que são queratinócitos mortos, contendo um amálgama de proteínas específicas e lipídios, que são necessários a formação da camada córnea da pele (KROEMER, *et al.*, 2009)

### **1.3 Desenvolvimento de drogas a partir de produtos naturais**

As fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico. De fato, mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais está em fase de testes clínicos, principalmente para tratamento do câncer e de doenças infecciosas (HARVEY, 2008). Além disso, um total de 13 fármacos derivados de produtos naturais foram aprovados para utilização clínica entre 2005 e 2007 (BUTLER, 2008).

As estratégias para a descoberta de novos fármacos têm mudado ao longo dos anos. Os programas de prospecção no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos começaram no início dos anos 50 e consistiam em testes de novos compostos em camundongos inoculados com leucemias L1210 e P388. Esse modelo foi bastante questionado, uma vez que não era considerado representativo dos tumores humanos, na sua maioria tumores sólidos. Sendo assim, o modelo foi reconsiderado e, atualmente, os programas de prospecção incluem uma etapa inicial de testes *in vitro* em linhagens tumorais humanas utilizando técnicas automatizadas (High Troughput Screening – HTS) o que tem resultado num elevado número de moléculas promissoras (HARVEY, 1999).

Com a aprovação, em 2007, dos medicamentos Ixempra® (ixabepilona), derivado da epotilona com ação em microtúbulos, Yondelis® (trabectedina) primeiro medicamento anticâncer verdadeiramente de origem marinha, alquilante de DNA, e Torisel® (temsirolimus), inibidor de proteína quinase mTOR, os produtos naturais estão definitivamente de volta ao cenário da pesquisa em oncologia (**Figura 7**) (BAILLY, 2009).



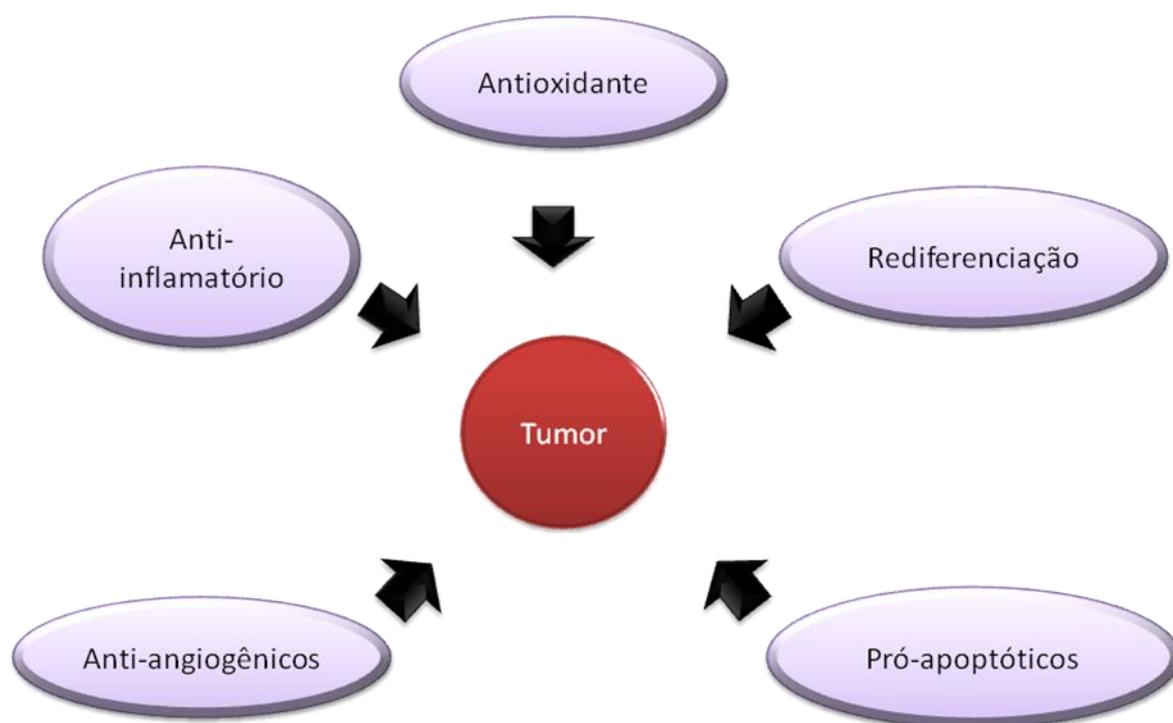
**Figura 7.** Fármacos derivados de produtos naturais introduzidos em 2007 no mercado farmacêutico. Adaptado de COSTA-LOTUFO *et al*, 2009.

Desta forma, com o aumento das tecnologias de *screening*, de análise química e molecular surge o interesse em desenvolver novas drogas, a partir das moléculas de produtos naturais, estocadas nas bibliotecas químicas de muitos laboratórios, pois a diversidade natural e a seletividade a certos alvos moleculares conferem a eles propriedades únicas, que podem

servir de ponto de partida para modificação estrutural, através de técnicas de síntese e modelagem molecular (SHANG & TAN,, 2005).

#### 1.4 Triterpenos – alfa-/beta-amirina

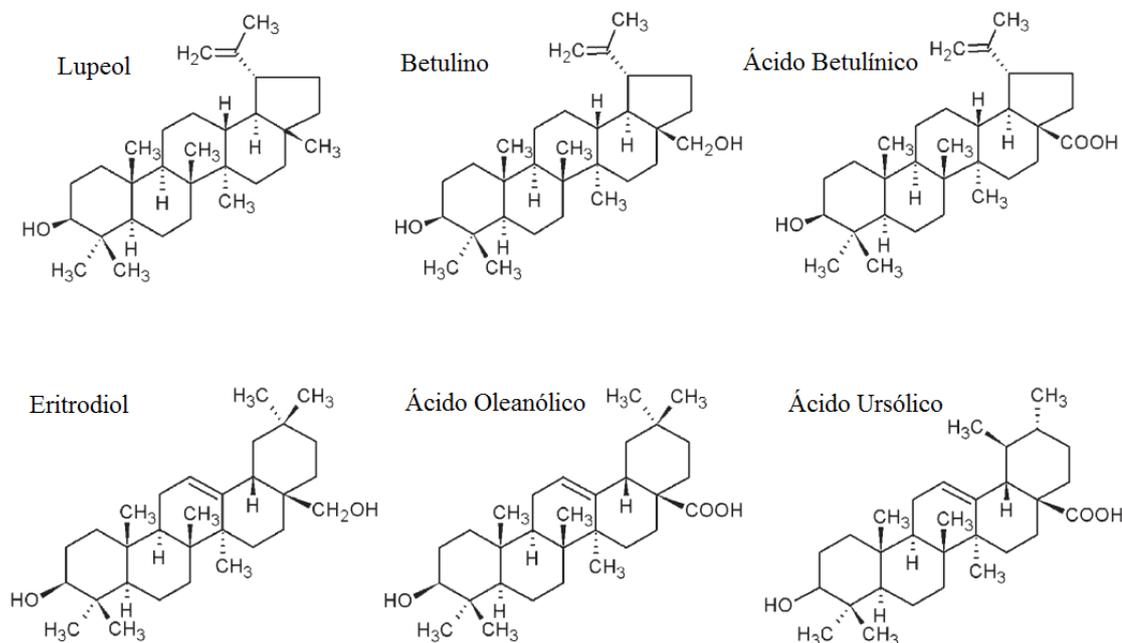
Triterpenóides pentacíclicos são compostos que nos últimos anos têm despertados grande interesse em razão de sua diversidade estrutural e da descoberta de um amplo espectro de atividades farmacológicas, tais como: antiinflamatório, antioxidante e anticarcinogênico (**Figura 8**). Nos últimos dez anos um grande número de derivados sintéticos de triterpenoides naturais tem contribuído significativamente para o estudo farmacológico destes compostos (BANDEIRA *et al*, 2007).



**Figura 8.** Atividades farmacológicas atribuídas aos grupos triterpenóides: lupeol, ácido oleanólico, ácido betulínico, betulino e ácido ursólico. Adaptado de LASZCZYK, 2009.

Eles pertencem ao grupo dos terpenóides (também conhecidos como isoprenóides), o maior grupo dos produtos naturais (GERSHENZON & DUDAREVA, 2007), ao qual pertencem os taxanos. Estes compostos consistem de seis unidades isopreno e podem ser isolados de vários tipos de materiais vegetais. Eles ocorrem em diversas variações e podem

ser subclassificados em vários grupos incluindo os esqualenos, lanostanos, damaranos, lupanos, oleananos, ursanos, hopanos, cicloartanos, friedelanos, cucurbitacinas e compostos micelânicos (**Figura 9**) (SETZER & SETZER, 2003; CONNOLLY & HILL, 2008).



**Figura 9.** Estrutura química de alguns compostos triterpenicos. Adaptado de LASZCZYK, 2009.

Muitos deles, ou de seus derivados sintéticos, estão sendo rotineiramente investigados como produtos medicinais, atuando em várias doenças, inclusive o câncer. Como exemplo, pode-se citar o ácido 3 $\beta$ ,25-epoxi-3 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-28-oico, um triterpenóide do grupo lupano, que apresentou um notável efeito inibitório em um modelo carcinogênico de pele induzido em camundongos, iniciado com ultra-violeta e promovido com acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol-13. O número de animais que traziam algum papiloma foi significativamente reduzido, assim como o número de papilomas por camundongo, em cada grupo, também foi reduzido. Desta forma, a administração oral do ácido reduziu, em quase 50%, a incidência de papilomas (FUKUDA *et al*, 2006). Sua presença em muitos legumes e frutas, incluindo azeitonas, morangos e mangas, propõe que este composto seja um potencial agente antitumoral da dieta (SALEEM *et al*, 2004).

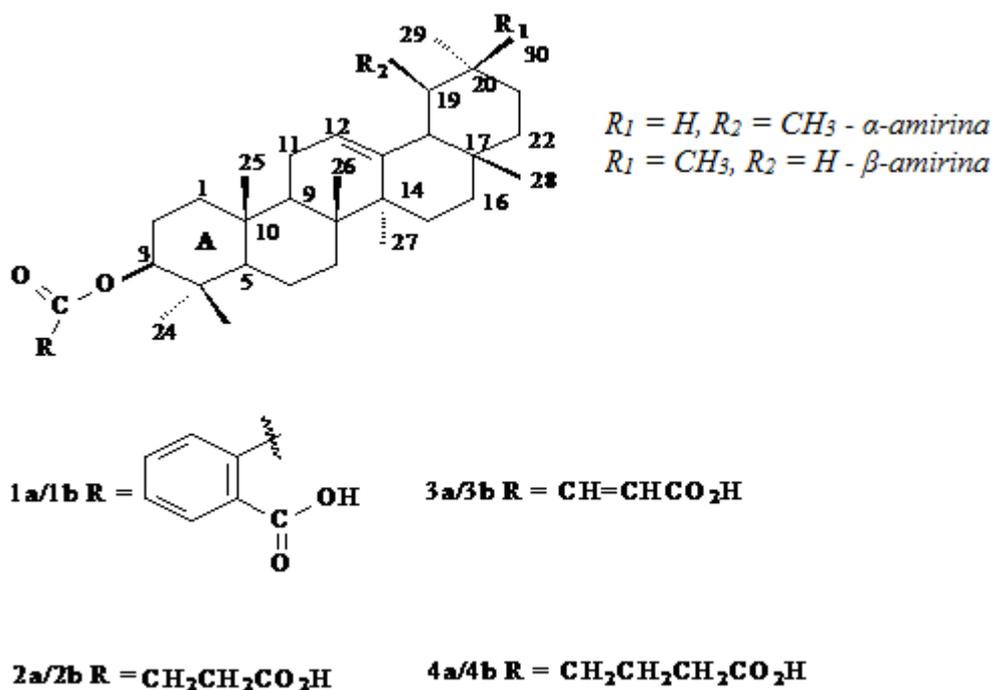
O grupo dos oleananos também apresentam resultados interessantes em pesquisas recentes, relativas a suas propriedades antitumorais. Oleananos sintéticos foram testados, satisfatoriamente, quanto a sua seletividade em induzir apoptose em células cancerígenas,

resistentes a quimioterapia usual e quanto a supressão do crescimento tumoral, induzindo a diferenciação das células (LIBY *et al*, 2007). Dois destes potentes oleananos sintéticos, ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO) e seu metil éster (CDDO-Me), estão sendo testados em fase I na pesquisa clínica (LIBY *et al*, 2007).

Da sub-família dos ursanos, o ácido ursólico foi descoberto como inibidor da expressão fator de necrose tumoral (TNF)-induzido e NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-gene regulado, ciclina D1, ciclooxygenase, além da metaloproteinase-9 da matriz. Além do mais, o ácido ursólico inibe transdutores de sinais e ativadores da transcrição. Além de inibir a proliferação e induzir a apoptose em células tumorais. Por conta da sua presença nas maçãs, manjeriço e ameixas, foi sugerido o seu potencial como quimioprotetor na prevenção de diversos tipos de câncer, inclusive os melanomas (PATHAK *et al*, 2007)

Neste aspecto os triterpenos pentacíclicos  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina, de ocorrência natural em várias espécies, especialmente na resina de espécies, do gênero *Protium*, são possuidoras de atividades antiinflamatória (KO *et al*, 2007), gastoprotetora (MELO *et al*, 2010), antinociceptiva (LIMA-JÚNIOR *et al*, 2006) e antidepressiva (ZHOU *et al*, 2010). Estudos realizados com a resina de *Protium heptaphyllum*, demonstraram que esta possui todas estas propriedades farmacológicas, atribuídas a presença de triterpenóides pentacíclicos especialmente a  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina (ARAGÃO *et al*, 2006; OLIVEIRA *et al*, 2007). Esta mistura triterpenoídica apresenta esqueleto básico do tipo ursano e oleano respectivamente, cuja principal diferença está entre a posição do grupo metil no anel E localizado no C-20.

Neste sentido o grupo do professor Dr. Paulo Nogueira Bandeira sintetizou novos derivados, representados na **figura 10**, de  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina, especialmente ésteres localizados no C-3 do anel A: 3-O-Carboxibenzoato de  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina (**1a/1b**), 3-O-Carboxisuccinato de  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina (**2a/2b**), 3-O-Carboximaleinato de  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina (**3a/3b**), 3-O-Carboxiglutarato de  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina (**4a/4b**). Esses compostos foram estudados quanto ao potencial anti-câncer, no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental vinculado ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.



**Figura 10.** Derivados de  $\alpha$ -amirina ( $R_1 = H, R_2 = CH_3$ ) e  $\beta$ -amirina ( $R_1 = CH_3, R_2 = H$ ).  
 (a)**1a/1b** Anidrido benzóico, Py, refluxo ( $50^\circ C$ ), éter etílico, 8h.; (b)**2a/2b** Anidrido succinico, DMAP, refluxo ( $50^\circ C$ ),  $CH_2Cl_2$ , 8h; (c)**3a/3b** Anidrido maleico, refluxo ( $50^\circ C$ ),  $CH_2Cl_2$ , 8h; (d)**4a/4b** Anidrido glutarico, DMAP, refluxo ( $50^\circ C$ ),  $CH_2Cl_2$ , 8h.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Determinar o potencial citotóxico e os possíveis mecanismos de ação dos análogos triterpênicos: 3-O-Carboxibenzoato de  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina (**1a/1b**), 3-O-Carboxisuccinato de  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina (**2a/2b**), 3-O-Carboximaleinato de  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina (**3a/3b**), 3-O-Carboxiglutarato de  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina (**4a/4b**) em modelos experimentais *in vitro*.

### 2.2 Específicos

- Avaliar a atividade citotóxica dos análogos amirínicos em célula tumoral HL-60 (leucemia), em células mononucleadas isoladas de sangue periférico humano e em eritrócitos de camundongo usando o ensaio do MTT, alamar blue e hemólise, respectivamente;
- Avaliar os prováveis mecanismos de ação responsáveis pela citotoxicidade dos análogos com melhor potencial citotóxico, através de:
  - análise morfológica utilizando a linhagem de leucemia HL-60;
  - Mensuração do estresse oxidativo através ensaio do TBARS utilizando a linhagem de leucemia HL-60;
  - Técnicas de citometria de fluxo utilizando como modelos experimentais a linhagens de leucemia HL-60;
  - Análise da incorporação de corantes vitais (iodeto de propídeo) – integridade de membrana;
  - Determinar o conteúdo de DNA nuclear das células – ciclo celular;
  - Verificar a externalização da fosfatidilserina;
  - Verificar a geração de espécies reativas de oxigênio – ROS;
  - Determinar a da ativação de caspases iniciadoras (-8 e -9) e efetoras (-3 e -7);
- Avaliar o potencial genotóxico usando o Ensaio Cometa em células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

##### Soluções, reagentes e fármacos

Ácido Acético	-	Vetec®
Ácido Clorídrico	-	Vetec®
Álcool Etílico	-	Vetec®
Agarose 1%	0,5g de agarose Água deionizada q.s.p. 50mL	FMC- Bioprodu cts®
Agarose LMP 1,5%	1,5g de agarose PBS q.s.p. 100mL	Gibco®
Agarose NMP 0,5%	0,5g de agarose PBS q.s.p. 100mL Gibco®	Gibco®
Anticorpo biotinizado Antiimunoglobulina de camundongo	1µL de anticorpoanti- imunoglobulina BSA 5% q.s.p.100µLde solução	Sigma®
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® -
Brometo de Etídio 100 µg/mL	1mg de brometo de etídeo PBS q.s.p 10mL de solução	Sigma® -

Citrato de Sódio	-	Grupo Química®
Cloreto de Sódio (NaCl)	-	Labsynth®
Diaminobenzidina (DAB)	5µL de DAB 1mL de Tris-HCl (Tris0,05M) pH= 7,6 2µL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Immunotech® Proquímios® Proquímios®
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	Vetec®
Doxorrubicina	-	Zodiac®
EDTA	-	Qeel®
Eosina 0,5%	0,5g de Eosina 80mL de Álcool etílico 0,5mL de Ácidoacético 20mL de H <sub>2</sub> O	Doles®
Estreptavidina– Peroxidase	1µL de Estreptavidina– peroxidase BSA 5% q.s.p. 100µL de solução	Sigma® Dako®
Ficoll	-	Sigma®
Fitohemaglutinina	-	Sigma®

Formaldeído 10%	100mL de formaldeído H <sub>2</sub> O q.s.p. 1L	Dinâmica ®
		Doles®
	0,5g de Hematoxilina	Labsynth
	10mL de Glicerina	®
Hematoxilina 0,1%	25g de Sulfato de alumínio	Labsynth
	0,1g de Iodeto de potássio	®
	H <sub>2</sub> O q.s.p. 500mL de solução	Labsynth ®
Hidróxido de Sódio (NaOH)	-	Vetec®
Iodeto de propídeo 50 µg/mL	1mg de iodeto de propídeo PBS q.s.p. 50mL	Boehringer r®
Laranja de Acridina	1g de laranja de acridina (100 µg/mL) H <sub>2</sub> O q.s.p. 10mL de solução Diluído em água deionizada e esterelizada, filtrado em filtro Millipore (0,22µm) e complementado com SBF 10%, 1% de glutamina, 1% de antibióticos, 1% de bicarbonato de sódio (0,75 %) e 25mM de HEPES	Fluka®
Meio de cultura de Células RPMI 1640		Cultilab®
MTT	20mg de MTT PBS q.s.p. 100mL de solução	Sigma® -
N-Lauroylsarcosine	-	Sigma®
Penicilina– estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL Estreptomicina 10mg/mL	Cultilab® Cultilab®

Ringer-lactato	Cloreto de Sódio=0,600g Cloreto de Potássio=0,030g Cloreto de Cálcio2H <sub>2</sub> O=0,020g Lactato de Sódio=0,30g Água q.s.p. 100mL	Laboratório Biosintética® Gentamicina Novafarma®
Sulfato de Gentamicina	-	-
Solução de Eletroforese	EDTA 1mM, NaOH 300mM, pH>13	-
Solução de Lise	NaCl <sub>2</sub> , 5M, EDTA 100mM Tris 10mM, N-Lauroylsarcosine 1% pH=10, TritonX-1001%, DMSO 10%	-
Solução de Neutralização	Tris 0,4M, pH=7,5	-
Soro fetal bovino	-	Cultilab®
Solução salina (para hemólise)	8,5g de Cloretodesódio (0,85%) 1,11g de Cloreto de cálcio(10mM) H <sub>2</sub> O q.s.p 1L de solução	Labsynth® Reagen®
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5M Citrato de sódio 0,15M H <sub>2</sub> O	-
Tampão fosfato (PBS)	8,766g de Cloreto de sódio 2,14g de NaHPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,276gdeNaHPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> Oq.s.p.1Ldesolução(pH=7,2)	Labsynth® Labsynth®

		Labsynth ® -
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5M Tris 0,5M (pH=7,6) H <sub>2</sub> O	Labsynth ® Proquímios® -
Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5% 0,125g de EDTA 450mL de PBS	Cultilab® Proquímios® -
TritonX-100	-	Isofar®
Xilol 10%	100mL de formaldeído H <sub>2</sub> O q.s.p. 1L	Dinâmica ®

### Equipamentos

Agitador de placa, MLWModeloThys2®

Agitador de tubo, DonnerAD8850®

Banho maria, DELLTAModelo105Di®

Centrífuga Centimicro, FANENModelo212®

Centrífuga Excelsa Baby, IFANENModelo206®

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403®

Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin®

Citômetro de fluxo, GuavaEasyCytemini®

Deonizador de água MilliQ, Milipore®

Espectrofotômetro de placa DTX880, Beckman Coulter®

Fluxo laminar, VECO®

Incubadora de células, (CO2WaterJacketIncubator) NUAIRETS Autoflow®

High Throughput Screening (HTS)/Laboratory Automation Workstation,  
Biomek3000,

Beckman

Coulter®

Máquina fotográfica digital, OlympusC7070®

Microondas, Panasonic®

Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO Labimex Modelo Studarlab®

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot®

Microscópio de fluorescência, Olympus®

Micrótomo, SLEE Mainz®

pHmetro, MicronalB474®

Pipetas automáticas, Gilson®

Sistema de Eletroforese Horizontal mini-Submarine, Amersham Biosciences®

Sistema de Foto-documentação, Kodak®

### Material biológico

Linhagens celulares de câncer humano mantidas em cultura (**Tabela 2**);

Células mononucleares de sangue periférico humano isoladas de voluntários sadios;

Protocolo COMEPE (Comitê de Ética de Pesquisa da UFC) nº 281/09.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Isolamento da mistura da $\alpha$ -, $\beta$ -amirina (**A/B**)

A mistura triterpenoídica da  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina (**a/b**) foi isolada da resina da espécie *Protium heptaphyllum*, analisada por RMN de  $^1\text{H}$ , a qual possibilitou a determinação da mesma numa proporção de 2 : 1 respectivamente (BANDEIRA, 2002).

A caracterização da mistura da  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina e dos ésteres derivados foi feita por meio de dados espectroscópicos de infravermelho e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  incluindo 2D.

As estruturas químicas desse novo grupo de moléculas estão representadas na **figura 10**. Essa caracterização foi realizada sob a supervisão do Prof Paulo N. Bandeira, no Laboratório de Química Orgânica, da Universidade Estadual Vale do Acaraú.

### 3.2.2 Linhagens celulares

As células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade estão listadas quanto ao tipo histológico e a origem na **tabela 2**.

**Tabela 2** – Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* por meio do teste do MTT.

Linhagem	Tipo Histológico	Origem
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana
HCT-8	Carcinoma de cólon	Humana
SF-295	Glioblastoma	Humana
MDAMB-231	Carcinomademama	Humana
K-562	Leucemia mielocítica crônica	Humana
CMSPH	Linfócitos	Humana
J774	Macrofágos	Humana

#### 3.2.2.1 Obtenção e cultivo das células tumorais

As linhagens tumorais foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75cm<sup>3</sup> volumede250mL), e mantidas com os meios RPMI 1640 ou DMEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% deCO<sub>2</sub> a 37 °C. Diariamente, acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células soltassem das paredes das garrafas (PESSOA, 2000).

### 3.2.2.2 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis. A coleta de sangue foi realizada em frascos heparinizados (vacutainer) por profissionais capacitados da Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) da Universidade Federal do Ceará. As células foram isoladas através de um gradiente de densidade por meio da utilização do Histopaque<sup>TM</sup>-1077. Uma amostra de 3mL de sangue periférico foi diluída em 5mL de PBS. Essa solução foi adicionada a um tubo Falcon contendo 2mL de Histopaque<sup>TM</sup>-1077 e, posteriormente, centrifugada por 30 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, a solução foi separada, em virtude da densidade do Histopaque<sup>TM</sup>-1077, em três camadas visíveis (figura 1). Uma superior (soro), uma intermediária (células e Histopaque<sup>TM</sup>-1077) e uma inferior (hemácias). Em seguida, a região intermediária foi cuidadosamente removida e adicionada a um terceiro tubo contendo PBS, o qual foi centrifugado por 20 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspensionado em 2mL de PBS. As células foram utilizadas imediatamente após o processo de isolamento, sendo cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e fitohemaglutinina (2 a 4%).

### 3.2.3 Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas - teste do MTT

#### **Princípio do teste**

A avaliação do efeito citotóxico dos compostos triterpênicos em células tumorais humanas foi realizada pelo Teste do MTT após 72 h de incubação. Este é um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido por Mosmann em 1983 para estimar a proliferação e a sobrevivência celular. É definido na literatura como apropriado para estimar a citotoxicidade (PESSOA *et al.*, 2000; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2008) e 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 púrpura. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

#### **Procedimento experimental**

Inicialmente os quatro novos ésteres, derivados da mistura triterpênica,  $\alpha/\beta$ -amirina, foram testados em concentração única (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para avaliação do potencial citotóxico. Nesta etapa, foram utilizadas três linhagens de tumores sólidos (HCT-8, SF295 e MDA-MB-435). A partir deste *screening* inicial foram consideradas ativas as amostras que obtiveram um percentual de inibição do crescimento celular maior, ou igual a 90%, em pelo menos uma das linhagens testadas.

Em seguida, as amostras selecionadas foram testadas em um painel de linhagens celulares de diferentes origens (**tabela 2**), para determinação de suas  $\text{CI}_{50}$  (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular), como descrito a seguir.

As células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, para células em suspensão (HL-60 e K-562), e  $0,1 \times 10^6$  (SF-295), ou  $0,7 \times 10^5$  células/mL (HCT-8), para células aderidas. Após 24h de incubação, os estéres (0,09 a 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dissolvidos em DMSO foram adicionados a cada poço, utilizando o HTS (high-throughput screening), e as placas incubadas por 72 horas. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,003 a 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O controle negativo

recebeu a mesma quantidade de DMSO. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (15 G/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio RPMI 1640) e a placa reincubada por 3 horas, em estufa a 37 °C e a 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (30 G/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuscitado em 150 µL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorvâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm (MOSSMAN *et al.*, 1983).

### **Análise dos dados**

Os compostos foram testados em diluição seriada, em triplicata. Foi registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinadas suas CI<sub>50</sub> e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando, o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

3.2.4 Avaliação da atividade antiproliferativa em células mononucleares de sangue humano periférico (CMSP) – ensaio do alamar blue.

### **Princípio do Teste**

Com o objetivo de estudar a atividade dos compostos sobre a proliferação de células normais, o ensaio do alamar blue foi realizado com célula mononucleares de sangue periférico (CMSP), que inclui linfócitos e monócitos. O alamar blue, recentemente identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.*, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico, onde em sua forma oxidada apresenta uma coloração azul (não fluorescente/célula não viável) e em sua forma reduzida uma coloração rósea (fluorescente/célula viável). Assim como o MTT, o alamar blue reduz-se em células viáveis, e assim pode ser quantificado e utilizado para avaliar a viabilidade celular (AHMED *et al* 1994).

### **Procedimento Experimental**

As células mononucleares foram isolados a partir de uma amostra de cerca de 5 mL de sangue periférico de voluntários sadios, acrescida de 5 mL de PBS. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3 mL de Ficoll, seguida por 30 minutos de centrifugação a 1500rpm, e feita aspiração das células mononucleares presentes na região intermediária entre as hemácias e o soro (“nuvem de linfócitos”). A suspensão de linfócitos foi transferida para um outro tubo ao qual foi acrescido PBS até o volume de 11 mL, sendo centrifugado por 20 min a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet de linfócitos foi ressuscitado em 2 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina para uma concentração final de final  $3 \times 10^5$  células/mL. Fitohemaglutinina (3%) foi adicionada para induzir a proliferação dos linfócitos. Após 24 horas de incubação das células, as substâncias em estudo foram adicionadas em concentrações seriadas (0,009 - 5 µg/mL) juntamente com 10 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade. A doxorrubicina (0,009 - 5 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Após o período de incubação as absorbâncias foram medidas no espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado).

### **Análise dos Dados**

A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % proliferação =  $A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$ . Onde,  $A_{LW}$  e  $A_{HW}$  são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O  $R_0$  foi calculado utilizando a seguinte fórmula:  $R_0 = AO_{LW} / AO_{HW}$ . Onde,  $AO_{LW}$  e  $AO_{HW}$  são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. A absorbância foi medida usando um leitor de multiplacas (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Califórnia, EUA). O efeito da droga foi quantificado como a porcentagem da absorbância controle a 570 nm e a 595 nm. Os compostos foram testados em diluição seriada, em duplicata ou triplicata, e suas  $CI_{50}$  (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram determinados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad Software).

### 3.2.5 Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos swiss (*mus musculus*)

#### **Princípio do teste**

Segundo Costa-Lotufo *et al.* (2002), este ensaio permite avaliar o potencial dos compostos testes em causar danos à membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total da mesma.

#### **Procedimento experimental**

O sangue foi coletado de camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) por via orbital e diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl<sub>2</sub> 10mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm / 5 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para se obter uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Esses experimentos foram realizados em multiplacas com 96 poços, com a concentração dos compostos testes variando de 1,56 a 200 µg/mL. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 80µL da solução salina e 20 µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 180µL de solução salina e 20 µL da substância teste em solução (1mg/mL). Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µl da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de triton X-100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações sejam sempre diluídas pela metade. Em seguida, 100µL da suspensão de eritrócitos 2% foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 h sob agitação constante à temperatura ambiente (26 ± 2°C), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/ 3min) e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro de placa a 540 nm.

#### **Análise dos dados**

A atividade da substância foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo. Foi registrada a porcentagem do efeito x log da concentração e

determinadas suas  $CE_{50}$  (concentração média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

### 3.2.6 Estudo do padrão de morte celular e do efeito sobre a progressão do ciclo celular

Nesta etapa do estudo, células de leucemia promielocítica humana (HL-60) foram utilizadas como modelo, tendo em vista a maior sensibilidade desta linhagem ao análogo testado. Em cada experimento, as células foram plaqueadas na densidade de  $0,3 \times 10^6$  células/mL e incubadas com o composto triterpênico em diferentes concentrações (1,5  $\mu$ M, 3,0  $\mu$ M e 6,0  $\mu$ M) por 24h. As concentrações testadas foram determinadas a partir da  $CI_{50}$  obtida pelo teste do MTT em células HL-60. A doxorrubicina (0,3  $\mu$ g/mL) foi usada como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 1%

#### 3.2.6.1 Determinação da viabilidade celular - teste do azul de tripan

##### **Princípio do teste**

O teste do azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis e as não viáveis após a incubação com os compostos testes. O teste baseia-se na capacidade que o corante azul de tripan tem de penetrar em todas as células. Entretanto, apenas as células viáveis conseguem bombear o corante para fora, sendo possível, observar uma marcação azulada para as células não viáveis, que perderam essa capacidade. (PERES & CURI, 2005).

O teste do azul de tripan foi realizado antes de cada experimento desta etapa do estudo para verificar a viabilidade celular.

##### **Procedimento Experimental**

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 24 h. Após a incubação, 10  $\mu$ L do azul de tripan foram adicionados a 90  $\mu$ L da suspensão de células em tubo eppendorf. As células viáveis e não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer.

### **Análise dos dados**

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de  $n$  experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnett, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 3.2.6.2 Análise morfológica - coloração por may-grunwald-giemsa

### **Princípio do teste**

A coloração utilizada nesse experimento se baseia em interações eletrostáticas entre os corantes e moléculas-alvo. Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. Essa técnica é bastante indicada para estudo do padrão de morte celular (apoptose/necrose).

### **Procedimento Experimental**

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com **3a/3b** (1,5, 3,0 e 6,0  $\mu\text{M}$ ) por 24 h. A doxorrubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 0,1%.

Após a incubação, as células foram examinadas ao microscópio de inversão. Para observar a morfologia, 50 $\mu\text{L}$  da suspensão de células foram adicionadas à centrífuga de lâmina (cytospin). Após a adesão das células na lâmina, a fixação foi feita com metanol por 1 minuto e a coloração por May-Grunwald, por 10 segundos, seguida pelo Giemsa por mais 10 segundos.

### **Análise dos Dados**

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia em microscopia óptica.

### 3.2.6.3 Análise morfológica - coloração diferencial por brometo de etídio/laranja de acridina

#### **Princípio do teste**

O método de coloração pelo brometo de etídio/laranja de acridina (MCGAHON *et al.*, 1995) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose. Este método baseia-se na revelação diferencial das células por fluorescência. A laranja de acridina (LA) é capaz de atravessar membranas intactas e intercala-se ao DNA celular conferindo aparência verde ao núcleo. O brometo de etídio (BE), por sua vez, só consegue intercalar ao DNA e marcar o núcleo em vermelho se a membrana celular estiver danificada. Dessa maneira, as células viáveis, que tem a membrana íntegra, apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. As células em apoptose (membrana ainda íntegra) apresentam manchas verdes brilhantes (condensação da cromatina e fragmentação nuclear) e não são marcadas por BE. Na apoptose, observam-se, também, alterações na membrana celular em decorrência da formação de corpos apoptóticos. O BE é incorporado majoritariamente por células necróticas (membrana danificada) e apresentam, portanto, núcleo corado de vermelho (KUMMAR *et. al.* 2004).

#### **Procedimento Experimental**

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 24 h. Após a incubação, a suspensão de células foi transferida para tubo eppendorf e centrifugada por 5 min em baixa rotação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 µL de solução de PBS. Em seguida, 1 µL da solução de BE:LA foi adicionado ao tubo, e uma alíquota dessas células foi transferida para uma lâmina. A lâmina foi montada com lamínula para contagem em microscópio de fluorescência. Foram contadas 300 células de cada amostra para a quantificação percentual dos eventos celulares (viáveis, apoptóticas e necróticas). As lâminas foram fotografadas para o registro visual dos efeitos.

## **Análise dos Dados**

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

### **3.2.6.4 Determinação da peroxidação lipídica pela medição de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS)**

#### **Princípio do teste**

A peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) (DRAPER & HADLEY., 1990). A peroxidação lipídica é uma das mais importantes expressões orgânicas do estresse oxidativo induzido pela reatividade dos radicais livres de oxigênio. O método mais empregado para determinação do MDA (malonil di-aldeído) em amostras biológicas é baseado na sua reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBA reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um pigmento róseo, que tem absorvância máxima em solução ácida em 532 a 535 nm.

#### **Procedimento experimental**

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas **3a/3b** (1,5, 3,9 e 6,0  $\mu\text{M}$ ) por 24 h. O peróxido de hidrogênio, por duas horas de exposição, (10  $\mu\text{M}$ ) foi usado como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 0,5%.

Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram lisadas com 1mL de Triton X 100. Então, 250 $\mu\text{L}$  do homogenato foi adicionado a tubos de vidro, e incubados em banho-maria a 37 °C por 1 h, seguido por adição de 400  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 35% para precipitar proteínas. A mistura foi centrifugada a 1400 g por 10 min e 600 $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionado à 200 $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido tiobarbitúrico a 1,2%. A

mistura foi levada a banho-maria e aquecida a 95 °C por 30 min. Após resfriada, a absorvância foi medida em um leitor de microplacas a 535 nm.

### **Análise de dados**

A análise estatística foi feita utilizando o programa Graph Pad prism 5.0 Para comparação entre as médias foi feita uma análise de variância (ANOVA) seguida de Dunnett, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,01$ . Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM.

#### 3.2.6.5 Testes utilizando citometria de fluxo

##### **a) Determinação da integridade de membrana e viabilidade celular**

### **Princípio do teste**

A análise da integridade da membrana plasmática é uma importante ferramenta para estudar o tipo de morte celular, visto que, apenas na necrose, a membrana plasmática está precocemente alterada. O teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo (IP), que é hidrofílico, de penetrar apenas em células cuja membrana esteja rompida. Após a ligação ao DNA, o IP emite alta fluorescência quando é excitado pelo laser de argônio (488 nm). A célula com membrana íntegra emite, portanto, baixa fluorescência.

Neste experimento, também é possível avaliar aspectos morfológicos como tamanho e granulosidade, que foram utilizados como parâmetros na determinação da viabilidade celular (MACKLIS & MADISON, 1990).

### **Procedimento experimental**

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 24 h. Uma alíquota de 100  $\mu$ L foi recolhida da suspensão de células e diluída com a solução de IP (2  $\mu$ g/mL em PBS). Após 5 minutos na ausência de luz a 37 °C, as células (cinco mil eventos) foram analisadas por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006).

## **Análise dos dados**

Os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### **b) Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula**

#### **Princípio do teste**

Este ensaio foi realizado com o intuito de determinar o conteúdo de DNA nuclear das células. O teste baseia-se na capacidade do corante IP em ligar-se ao DNA celular e emitir fluorescência vermelha em intensidade proporcional ao seu conteúdo. Assim, as diferentes fases do ciclo celular ( $G_0/G_1$ , S e  $G_2/M$ ) podem ser determinadas a partir do seu conteúdo de DNA. Quando a célula apresenta cromatina condensada e/ou DNA fragmentado (sub- $G_1$ ), a quantidade de IP incorporada é menor, e, portanto emitirá baixa fluorescência.

#### **Procedimento experimental**

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 24 h. Uma alíquota de 100  $\mu$ L foi recolhida da suspensão de células e diluída com a solução de lise contendo IP (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de triton X-100 e 2  $\mu$ g/mL iodeto de propídeo em PBS). Após 30 minutos na ausência de luz e a 37 °C, o material (cinco mil eventos) foi analisado por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006).

## **Análise dos dados**

Os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### **c) Determinação da Externalização da Fosfatidilserina – Anexina V**

#### **Princípio do Teste**

Um dos principais processos que ocorrem na apoptose é a perda da assimetria da membrana fosfolipídica com a translocação da fosfatidilserina da membrana interna da bicamada lipídica para superfície celular. A externalização da PS ainda continua como um processo não totalmente conhecido, mas sabe-se que a externalização da fosfatidilserina funciona como um sinal da célula para que os macrófagos as fagocitem, antes da perda da integridade da membrana celular (VERMES *et al.*, 1995).

#### **Procedimento Experimental**

A externalização da fosfatidilserina foi analisada por citometria de fluxo após coloração da fosfatidilserina com a anexina V (VERMES *et al.*, 1995). Foi utilizado o kit Guava Nexin para determinar apoptose inicial e tardia. Células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas em 135  $\mu\text{L}$  de PBS com 5  $\mu\text{L}$  de 7-amino-actinomicina (7AAD) e 10  $\mu\text{L}$  de anexina V conjugada com ficoeritrina (PE). As células foram gentilmente agitadas e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente (20–25°C) no escuro. Posteriormente, as células foram analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte/Guava Technologies). Anexina V é uma proteína ligada a um fosfolípido que tem alta afinidade por PS. 7AAD, é um corante hidrofílico impermeável em células intactas, e é utilizado como um indicador da integridade da membrana celular. A fluorescência da anexina V conjugada com a ficoeritrina foi mensurada por fluorescência amarela-583nm e o 7AAD na fluorescência vermelha a 680nm. A percentagem de células viáveis e de células apoptóticas inicial e tardia foi calculada.

#### **Análise dos Dados**

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 2 experimentos realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### **d) Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio intracelulares**

##### **Princípio do Teste**

As espécies reativas de oxigênio intracelulares foram monitoradas utilizando o diacetato de 2'7'-diclorohidrofluoresceína (H<sub>2</sub>-DCF-DA), que é convertido em um produto altamente fluorescente denominado de diclorofluoresceína (DCF) na presença de espécies reativas de oxigênio intracelulares (LEBEL *et al.*, 1992).

##### **Procedimento Experimental**

No final do tratamento de 1 e 3 horas com as amostras teste, as células foram incubadas a 20 µM de H<sub>2</sub>-DCF-DA e mantidas a 37°C por 30 minutos no escuro. Após terminar o período total de incubação as células foram centrifugadas por duas vezes, lavadas e ressuspensas em tampão PBS e analisadas imediatamente utilizando citometria de fluxo com comprimento de onda de excitação e emissão de 490 e 530 nm, respectivamente. O peróxido de hidrogênio a 100 µM foi utilizado como controle positivo.

##### **Análise dos dados**

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### **e) Determinação da ativação de caspases iniciadoras (-8 e -9) e efetoras (-3 e -7) em células HL-60**

##### **Princípio do teste**

As caspases pertencem a família de proteases cisteínas, podendo ser divididas em caspases inflamatórias e caspases apoptóticas, as quais podem ser incluídas nos grupos de

caspases iniciadoras (como no caso da apoptose as caspases-8 e -9) e efetoras (como no caso da apoptose as caspases-3 e -7). As caspases iniciadoras possuem a função de, quando ativadas, promover a clivagem das caspases efetoras -3 e -7; e estas, uma vez ativas, possuem um papel central no mecanismo de apoptose. As efetoras são as responsáveis pela clivagem de vários componentes celulares relacionados ao reparo e controle do DNA. Assim, a quantificação de caspases ativadas permite o estudo de mecanismos apoptóticos (MEHMET, 2002).

### **Procedimento experimental**

A detecção das caspases iniciadoras -8 e -9, e efetoras, -3 e -7 ativadas foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o kit Guava Caspases 3/7 FAM (Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, EUA). As células (HL-60) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com o composto **3a/3b** (1,5, 3,0 e 6,0 $\mu$ M) durante 24 horas.

Após os tratamentos, as células foram incubadas por 1 hora na ausência de luz e a 37 °C com FLICA<sup>TM</sup> (fluorocromo inibidor de caspases que se liga covalentemente as caspases-3 e -7 ativadas). Posteriormente, 80  $\mu$ L do tampão de lavagem (fabricante) foram adicionados aos tubos e, então, centrifugados (2000 rpm/5 min). Em seguida, as células foram ressuspensas em uma solução composta de IP e tampão de lavagem e analisadas por citometria de fluxo. A doxorrubicina (0,3 $\mu$ g/mL) foi utilizada como controle positivo e o DMSO (0,1 %) serviu como controle. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

O percentual de células viáveis, apoptóticas iniciais e tardias foi mensurado através da utilização do corante 7-AAD e um inibidor fluorescente de caspases (FLICA<sup>TM</sup>) o qual identifica as caspases ativadas. O reagente FLICA se liga covalentemente às caspases ativadas ficando retidas nas células, enquanto que as moléculas de FLICA<sup>TM</sup> não ligadas são difundidas para fora das células. Células com a coloração negativa para FLICA<sup>TM</sup> e 7-AAD (FLICA<sup>TM</sup> (-) e 7-AAD (-)) são consideradas viáveis, células FLICA<sup>TM</sup> (+) e 7-AAD (-) são apoptóticas iniciais, células FLICA<sup>TM</sup> (+) e 7-AAD (+) são apoptóticas tardias e FLICA<sup>TM</sup> (-) e 7-AAD (+) são células necróticas.

### **Análise dos dados**

Os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.7 Avaliação do potencial genotóxico - ensaio cometa

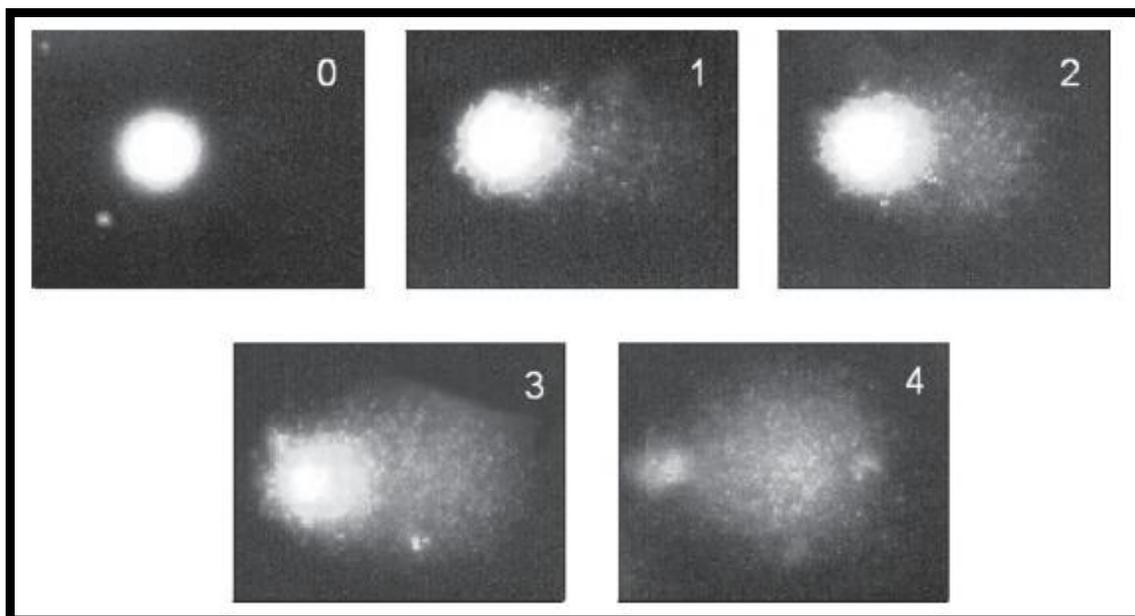
#### **Princípio do teste**

O ensaio cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) foi desenvolvido por Singh e colaboradores (1988) para detectar quebra simples e dupla na molécula de DNA induzida por compostos com potencial genotóxico, tais como agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Este ensaio é muito utilizado em estudos de genética toxicológica como biomonitoramento ambiental e populacional. Entretanto, seus resultados são utilizados como um indicativo e não como um teste mutagênico. O teste pode ser realizado com células animais ou vegetais, tanto *in vitro* como *in vivo* (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; ANDERSON *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2003).

#### **Procedimento Experimental**

Inicialmente, células de sangue periférico humano ( $3 \times 10^6$  células/mL) foram incubadas por 3 h, em tubos falcon, com os derivados amirínicos em diferentes concentrações (1,5  $\mu$ M, 3,0  $\mu$ M e 6,0  $\mu$ M). Em seguida, 20  $\mu$ L da suspensão de células ( $\sim 10^6$  células/mL) foram dissolvidos em 0,75 % de agarose de baixo ponto de fusão e imediatamente espalhada sobre uma lâmina pré-tratada com 1,5 % de agarose de ponto de fusão normal. As células foram, então, colocadas em solução de lise por pelo menos 1 h a 4 °C. Em seguida, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com tampão de corrida em pH  $\sim 13$  (HARTMANN & SPEIT, 1997.). A eletroforese foi conduzida em baixa luminosidade por 20 minutos, usando 14 V e uma corrente de 12 mA (0,5 V/cm). Após a corrida eletroforética, as lâminas foram retiradas e mergulhadas na solução de neutralização por 5 minutos. As células foram contadas em microscópio de fluorescência após coloração com brometo de etídeo. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (BURLINSON *et*

*al.*, 2007; HARTMANN & SPEIT, 1997; TICE *et al.*, 2000). Foram contados 50 cometas/lâmina e classificados, de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, de acordo com a **figura 11**. Onde, 0 = sem danos (<5%), 1 = baixo nível de danos (5-20%), 2 = médio nível de danos (20-40%), 3 = alto nível de danos (40-95%) e 4 = dano total (95%). A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 1%.



**Figura 11** - Padrão de dano ao DNA para o ensaio cometa. Fonte: Collins (2004).

### **Análise dos dados**

Foram calculados o índice (ID) e a frequência (FD) de danos no DNA. O ID foi obtido pela seguinte fórmula:  $ID = 400 - \sum \text{Escores}$ . A FD representa a porcentagem de células que sofreram dano no DNA. Os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da atividade citotóxica e hemolítica dos compostos triterpênicos

A avaliação citotóxica inicial dos compostos triterpênicos envolveu quatro linhagens tumorais humanas (HL-60, HCT-8, MDAMB-435 e SF-295) e duas linhagens normais, as células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH) e j744. Sendo a citotoxicidade determinada pelo teste do MTT, após 72h de incubação. As células foram incubadas com concentrações que variaram entre 0,08 a 5 µg/mL, a fim de determinar a CI<sub>50</sub>.

A análise da ação citotóxica das amostras testadas (**Tabela 3**) mostrou que apenas o composto **3a/3b** apresentou uma elevada citotoxicidade frente às linhagens tumorais de diferentes tipos histológicos, com valores de CI<sub>50</sub> menores que 2 µg/mL para as linhagens tumorais e para a linhagem normal (CMSPH) foi >5 µg/mL. Outras linhagens tumorais foram analisadas pelo ensaio do MTT, acima descrito, dentre elas a K-562. Cujo resultado mostra que esse composto apresenta uma certa seletividade para as linhagens leucêmicas, com valores de CI<sub>50</sub> variando de 0,72-1,22 µg/mL e 0,64-1,32 µg/mL para HL-60 e K-562, respectivamente. Enquanto a doxorubicina, usada como controle positivo, apresentou elevada citotoxicidade em todas as linhagens testadas, com valores de CI<sub>50</sub> menor que 1 µg/mL.

A **Tabela 3** também mostra os resultados dos ensaios de citotoxicidade em células normais. Todos os triterpenos apresentaram uma CI<sub>50</sub> > 5 µg/mL para células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH), e o composto **3a/3b** apresentou uma CI<sub>50</sub> entre 1,60 e 1,88 µg/mL para a linhagem de macrófagos J-774. A CI<sub>50</sub> da doxorubicina, usada como controle positivo, para CMSPH ficou entre 0,52 e 1,80 µg/mL e para a linhagem J-774 variou de 0,04 a 0,07 µg/mL.

Em relação ao teste hemolítico utilizando eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus*), os análogos da α/β-amirina selecionados não foram capazes de induzir lise das hemácias. A ausência de atividade hemolítica (CE<sub>50</sub> > 50 µg/mL) sugere que o efeito citotóxico das amostras testadas independe de um dano específico à membrana plasmática da célula.

A partir dos dados de citotoxicidade em células de câncer humano, escolheu-se trabalhar com a linhagem HL-60 (leucemia humana) por ter apresentado notável sensibilidade frente ao composto testado. As concentrações de trabalho (1,5 µM, 3,0 µM e 6,0 µM) do

análogo **3a/3b** para os demais experimentos foram determinadas com base na  $CI_{50}$  em HL-60. Por sua vez, o controle positivo foi testado na concentração de 0,3  $\mu\text{g/mL}$ , também escolhida com base em sua  $CI_{50}$  em HL-60.

**Tabela 3** - Atividade citotóxica dos compostos triterpênicos (**1a/1b**, **2a/2b**, **3a/3b**, **4a/4b**) em linhagens celulares de câncer e normais. A doxorrubicina foi usada como controle positivo.

<b>Linhagens</b>	<b>1a/1b</b>	<b>2a/2b</b>	<b>3a/3b</b>	<b>4a/4b</b>	<b>DOX</b>
<b>Tumorais</b>					
HL-60	>5	>5	0,94 (1,8) 0,72-1,22	>5	0,02(0,03) 0,01-0,02
K-562	Nd*	Nd*	0,92 (1,76) 0,64-1,32	Nd*	0,14 (0,24) 0,09-0,22
HCT-8	>5	>5	1,58 (3,0) 1,33-1,88	>5	0,04 (0,07) 0,03-0,05
SF-295	>5	>5	1,84 (3,5) 1,53-2,21	>5	0,16 (0,27) 0,13-0,23
MDAMB-435	>5	>5	1,52 (2,9) 1,33-1,73	>5	0,47 (0,81) 0,34-0,65
<b>Normais</b>					
CMSPH	>5	>5	>5 (9,5)	>5	0,97 (1,78) 0,52-1,80
J-774	Nd*	Nd*	1,73 (3,31) 1,60-1,88	Nd*	0,05 (0,01) 0,04-0,07
Eritrócitos	>200	>200	>200	>200	Nd*

A tabela apresenta os valores de  $CI_{50}$  (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) ( $\mu\text{g/mL}$  [ $\mu\text{M}$ ]) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) realizado pelo teste do MTT, após 72 h de incubação obtidos por regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism. \* n.d. = não determinado.

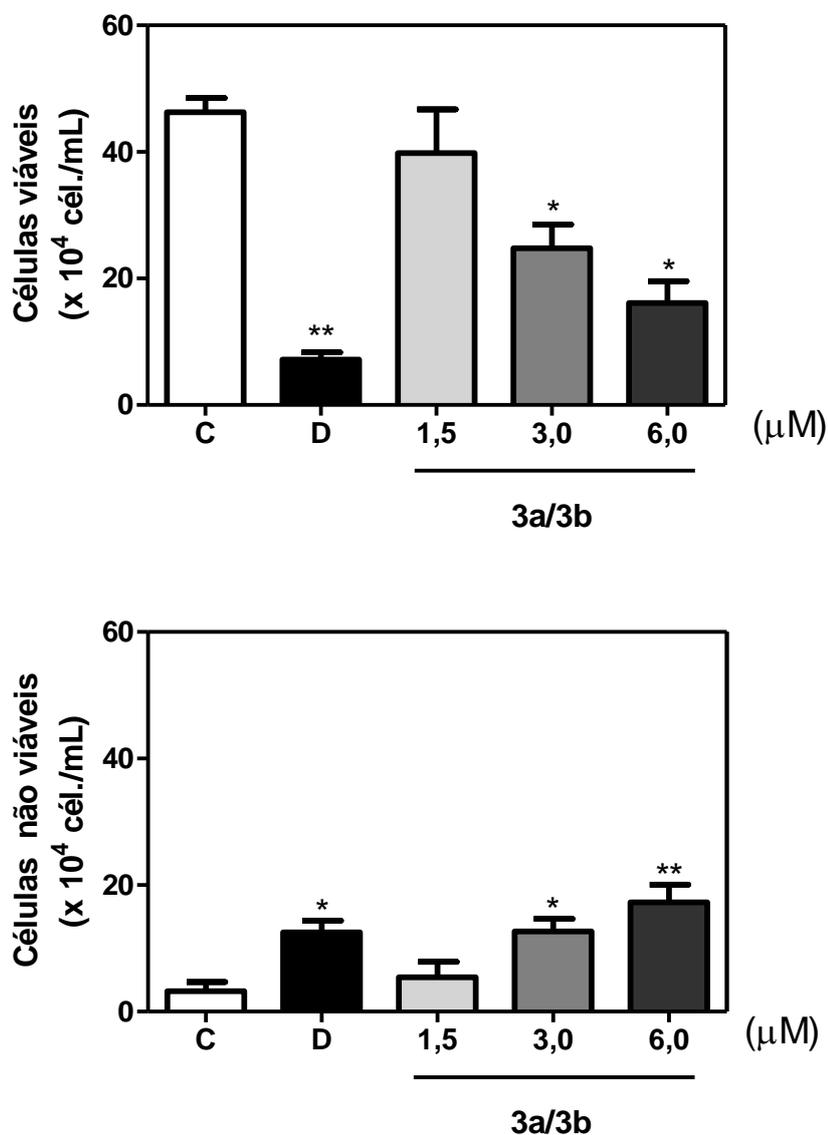
#### 4.2 Avaliação da viabilidade de células HL-60 após tratamento com o composto 3a/3b

A viabilidade celular (número de células viáveis e integridade da membrana citoplasmática) foi avaliada pelo teste do azul de tripan e por citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo (IP) como agente fluorogênico. A doxorrubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o

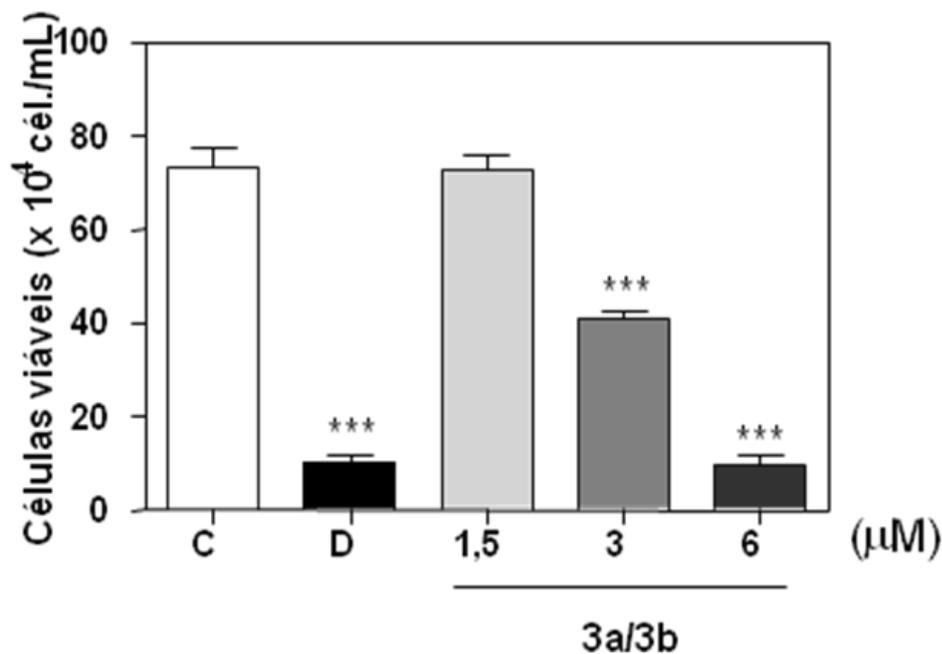
veículo (DMSO) usado para dissolver as substâncias. A amostra **3a/3b** - nas concentrações (1,5  $\mu\text{M}$ , 3,0  $\mu\text{M}$  e 6,0  $\mu\text{M}$ ) - foi analisada após 24 h de incubação.

A análise da **figura 12-A** mostrou que, na concentração de 1,5  $\mu\text{M}$  ( $\text{CI}_{50}$ ), o análogo amirínico **3a/3b** não apresentou uma redução na viabilidade celular. A porcentagem de células viáveis foi reduzida significativamente na concentração de 3,0  $\mu\text{M}$ ,  $51,03 \pm 7,73\%$  ( $p < 0,05$ ) de células viáveis. Enquanto na concentração de 6,0  $\mu\text{M}$  este valor caiu para  $33,22 \pm 7,14\%$  ( $p < 0,05$ ); já no grupo de células tratadas com doxorubicina, a porcentagem foi de  $14,78 \pm 2,40\%$  ( $p < 0,001$ ). O número de células não viáveis, mostrado na **figura 12-B** cresceu de maneira dependente da concentração; na menor concentração 1,5  $\mu\text{M}$  não houve aumento de células não viáveis; este aumento aconteceu de maneira significativa nas concentrações de 3,0 e 6,0  $\mu\text{M}$ , com um  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. A doxorubicina teve um expressivo aumento do número de células não viáveis, correspondente a  $56,82 \pm 8,6\%$  ( $p < 0,05$ ).

A análise da viabilidade celular por citometria de fluxo ratifica o resultado anterior. Como observado na **figura 13**, houve redução, dependente da concentração, do número de células viáveis, significativo ( $p < 0,0001$ ) a partir da concentração de 3,0  $\mu\text{M}$ , na qual a porcentagem de células viáveis foi de  $50,49 \pm 1,67\%$  e  $11,78 \pm 2,47\%$  na concentração de 6,0  $\mu\text{M}$ . No grupo tratado com doxorubicina a porcentagem de células viáveis foi de  $12,43 \pm 2,14\%$  ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 12.** Efeito do composto **3a/3b** sobre a viabilidade de células da linhagem HL-60 determinado pelo teste do azul de tripan após 24 h de incubação. (A) Células viáveis e (B) células não viáveis. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (0,5 μM) foi usada como controle positivo (D). As barras representam a média ± EPM de três experimentos independentes. \* p < 0,05; \*\* p < 0,001 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.



**Figura 13:** Efeito do composto **3a/3b** sobre a concentração de células viáveis da linhagem HL-60, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,5 µM) foi utilizada como controle positivo (D). As barras representam a média ± E.P.M. de três experimentes independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*\*\* p < 0,0001 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

#### 4.3 Avaliação da morfologia de células HL-60 após tratamento com o composto 3a/3b

A morfologia das células HL-60 foi avaliada por métodos de coloração (May-Grünwald-Giemsa) e por citometria de fluxo, após 24h de incubação com o composto **3a/3b**.

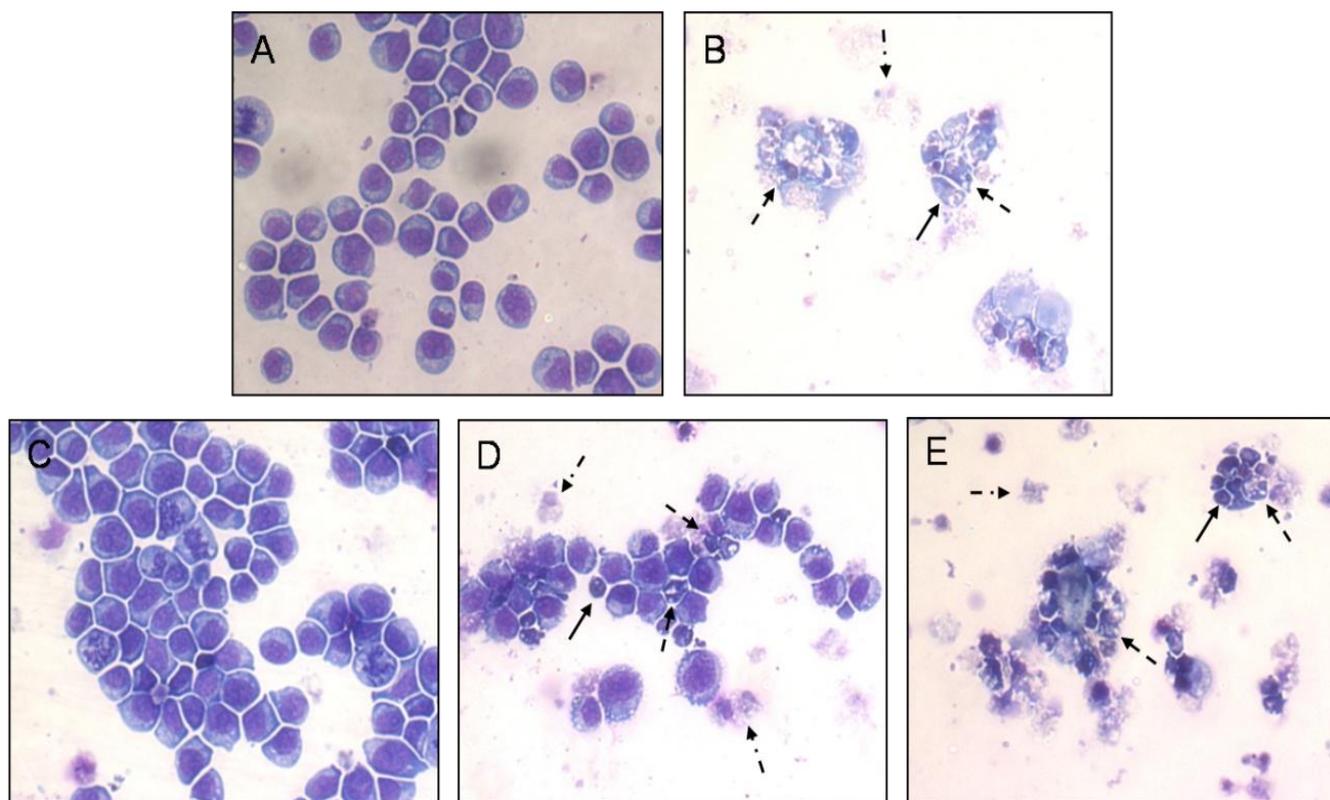
A análise por microscopia de luz das células HL-60 coradas com May-Grünwald-Giemsa revelou diversas alterações morfológicas induzidas pelas substâncias testadas. Após 24 horas em cultura, as células HL-60 do grupo controle negativo (não-tratadas) exibiram uma morfologia típica de células não aderidas, tais como, membrana íntegra, células pleomórficas e nítida visualização tanto das delimitações das membranas plasmática e nuclear (**Figura 14-A**). As células tratadas com **3a/3b** não apresentaram nenhuma alteração

morfológica, em relação ao controle negativo, na concentração de 1,5  $\mu\text{M}$  (**Figura 14-C**). Nas concentrações de 3,0 e 6,0  $\mu\text{M}$  (**Figura 14-D e 14-E**, respectivamente) as células apresentaram morfologia consistente com células em processo de apoptose, incluindo redução do volume celular, fragmentação nuclear e restos celulares. Na maior concentração testada (6,0  $\mu\text{M}$ ), foi observado o aparecimento de características de necrose, como eosinofilia e perda da integridade de membrana (**Figura 14-E**). A doxorubicina (0,5 $\mu\text{M}$ ), induziu redução do volume celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear em células de HL-60, todas as características condizentes com apoptose (**Figura 14-B**).

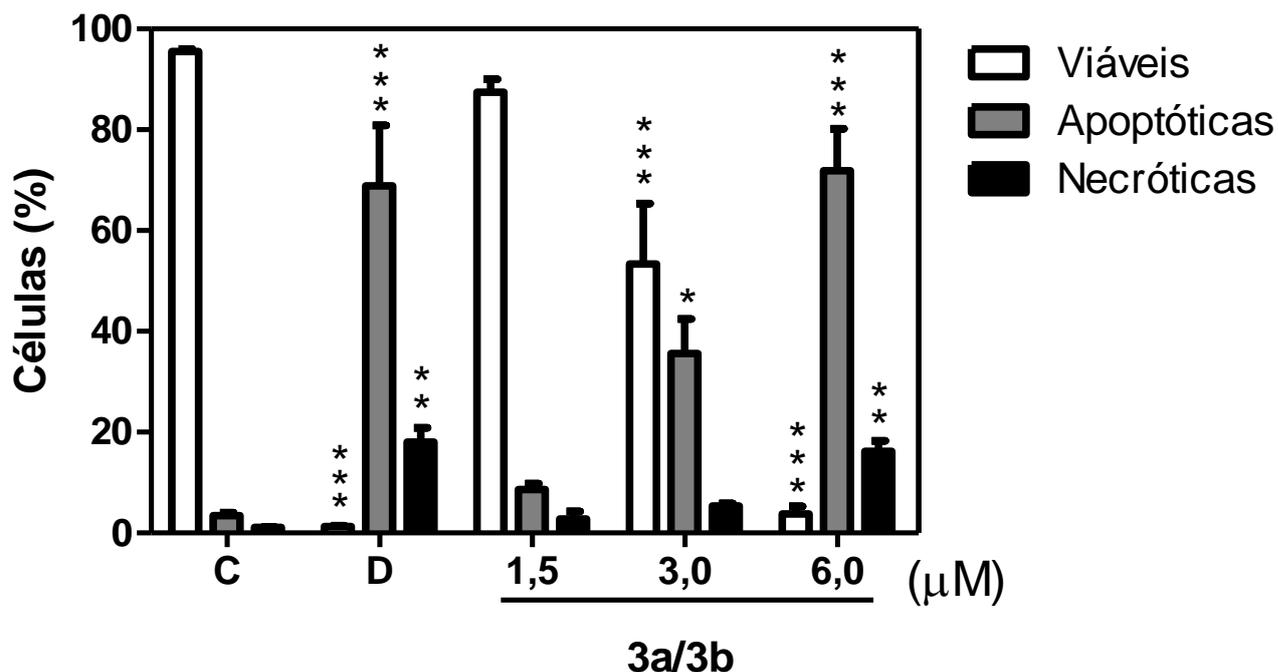
Para confirmar se a atividade antiproliferativa do composto **3a/3b** relaciona-se com a indução de apoptose ou necrose, a análise morfológica das células tratadas com a substância teste foi investigada utilizando a coloração diferencial de laranja de acridina e brometo de etídio (LA/BE) por microscopia de fluorescência, conforme os dados mostrados na **figura 15**. O percentual de células viáveis, apoptóticas e necróticas foi então calculado. Células viáveis, com coloração verde uniforme e morfologia normal, foram observadas em células HL-60 do grupo controle negativo, atingindo uma média de  $95,5 \pm 0,5\%$  das células contadas. Nos grupos de células HL-60 tratadas, foi observado que na concentração de 1,5  $\mu\text{M}$  o percentual médio de células viáveis foi de  $87,44 \pm 2,60\%$ , não havendo uma diferença significativa com o controle; já na concentração de 3,0  $\mu\text{M}$ , houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do percentual de células com morfologia típica de apoptose,  $35,59 \pm 6,88\%$ . Na concentração de 6,0  $\mu\text{M}$  o perfil morfológico de células apoptóticas atingiu um percentual de  $71,84 \pm 8,34\%$  ( $p < 0,0001$ ), com um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) do percentual de células com características morfológicas de necrose, equivalente a  $16,22 \pm 2,11\%$  do número de células. A doxorubicina causou  $68,87 \pm 11,99\%$  de apoptose e  $18,10 \pm 2,84\%$  de necrose, diminuindo drasticamente o percentual de células viáveis.

Na análise da integridade de membrana por citometria de fluxo (**figura 16**), o percentual de células HL-60 com membrana íntegra, pertencentes ao grupo controle negativo, foi de  $97,22 \pm 0,5\%$ . A análise dos grupos teste mostrou que nas concentrações de 1,5 e 3,0  $\mu\text{M}$  não foi observado dano à membrana celular. Já a concentração de 6,0  $\mu\text{M}$  foi capaz de causar um dano significativo à membrana ( $p < 0,0001$ ), tendo em vista o percentual de  $60,16 \pm 6,43\%$ , comparado ao controle negativo. A doxorubicina, causou um dano significativo ( $p < 0,001$ ) à membrana, reduzindo o percentual de células com membrana íntegra para  $74,13 \pm 3,09\%$ .

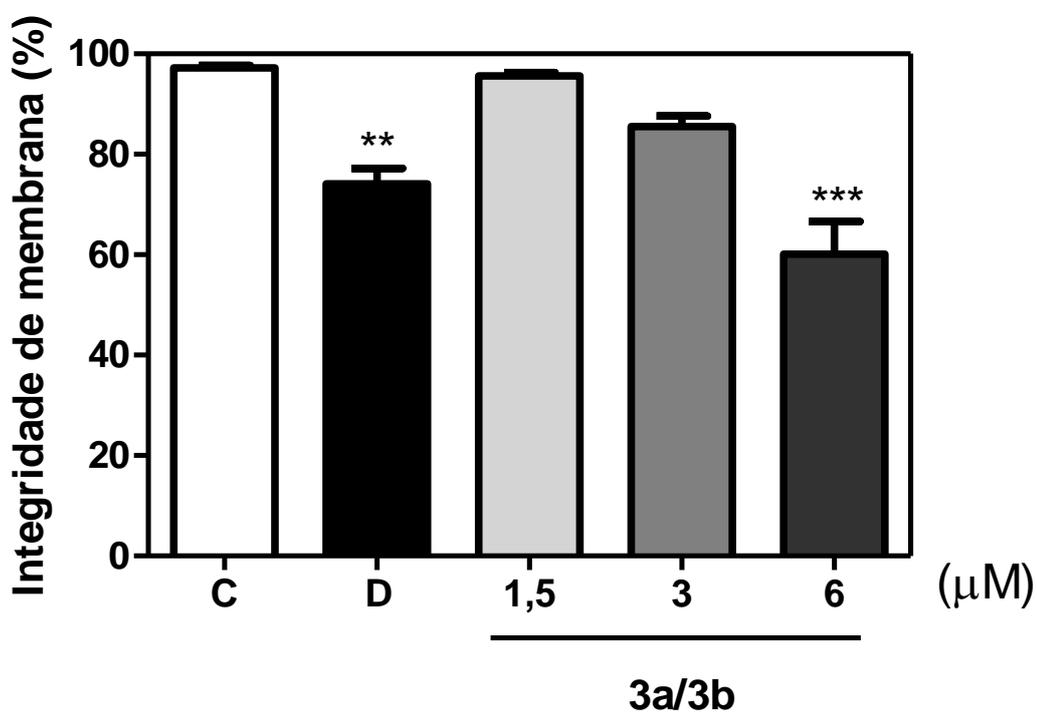
A complementação do estudo morfológico foi estabelecida pela análise do volume e granulosidade celular por citometria de fluxo. Análise qualitativa do resultado foi feita através de gráficos de dispersão representativos dos eventos celulares. Após 24h de incubação em diferentes concentrações (1,5; 3,0 e 6,0  $\mu\text{M}$ ) foi observado um aumento gradual do número de células com padrão apoptótico, a partir da concentração de 3,0  $\mu\text{M}$ , conforme observado nos gráficos (**Figura 17-C, 17-D, 17-E**) - menor volume, FSC; e menor granulosidade, SSC - quando comparado com o controle negativo (**Figura 17-A**). O tratamento com doxorubicina, também apresentou padrão celular típico de apoptose (**Figura 17-B**)



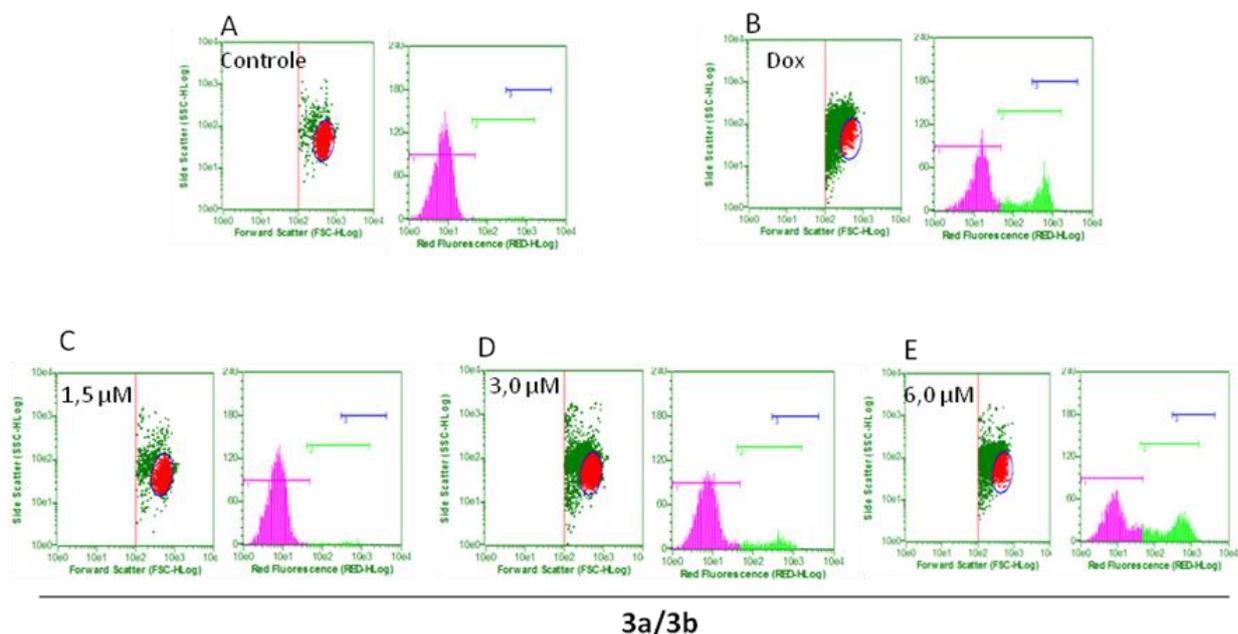
**Figura 14.** Análise morfológica de células da linhagem HL-60 após 24 h de incubação, coradas com May-Grünwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica. (A): controle negativo tratado apenas com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. (B): controle positivo tratado com doxorrubicina ( $0,5\mu\text{M}$ ). (C), (D) e (E): células tratadas com o composto **3a/3b** nas concentrações de  $1,5\ \mu\text{M}$ ;  $3,0\ \mu\text{M}$  e  $6,0\ \mu\text{M}$ , respectivamente. As setas indicam os aspectos apoptóticos observados: redução do volume ( $\rightarrow$ ), fragmentação nuclear ( $- \rightarrow$ ) e restos celulares ( $- \cdot \rightarrow$ ).



**Figura 15.** Efeito do composto **3a/3b** sobre a viabilidade de células da linhagem HL-60 coradas com Brometo de etídeo/Laranja de acridina determinado por microscopia de fluorescência após 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (0,5μM) foi utilizada como controle positivo (D). As barras representam a média ± EPM de três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.



**Figura 16:** Efeito do composto **3a/3b** sobre a integridade de membrana de células da linhagem HL-60, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo (D). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.



**Figura 17:** Efeito da amostra **3a/3b** (1,5  $\mu\text{M}$ , C - 3,0  $\mu\text{M}$ , D e 6,0  $\mu\text{M}$ , E) sobre a morfologia de células HL-60 determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* – desvio da luz para frente) e SSC (*Side scatter* – desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da células e granulosidade, ou complexidade interna, da célula, respectivamente, após 24h de incubação.

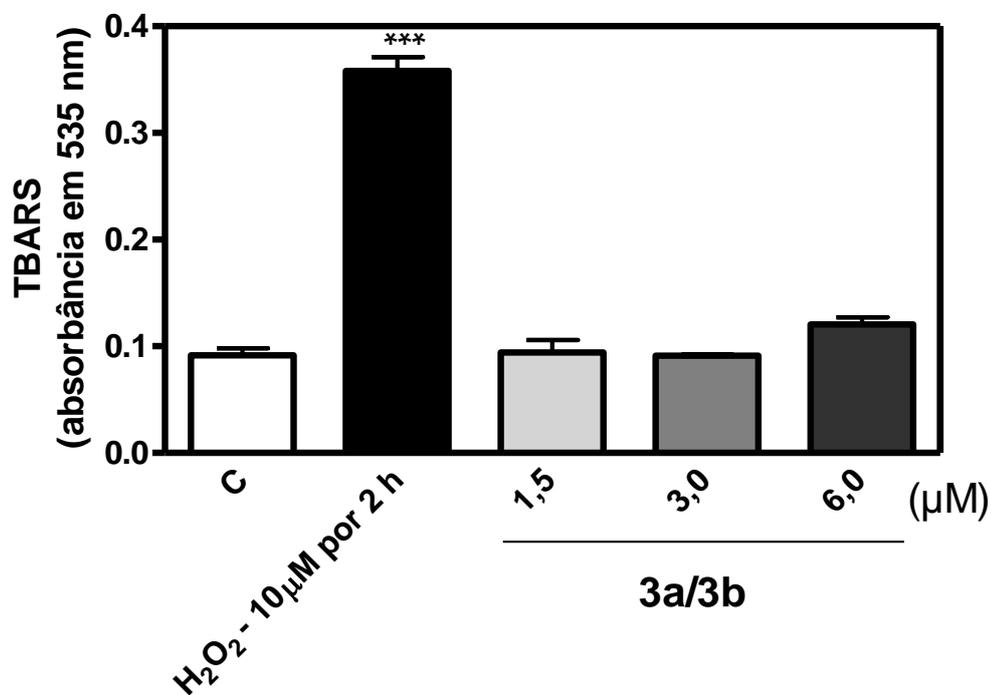
O histograma apresentado ao lado de cada *dot plot* representa as células com membrana íntegra (marcação avermelhada) e células com membrana danificada (marcação em verde), o que significa o aumento da fluorescência vermelha, devido à absorção e incorporação, pela célula, do iodeto de propídeo.

#### 4.4 Determinação da peroxidação lipídica pela medição de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS)

A determinação dos níveis de peroxidação lipídica foi realizada através do método colorimétrico TBARS.

A **figura 18** mostra que a exposição das células HL-60 ao composto **3a/3b** não interferiu na peroxidação lipídica pelo aumento de TBARS. A absorbância do TBARS para o controle negativo foi de 0,092; enquanto que nas concentrações de 1,5, 3,0 e 6,0  $\mu\text{M}$  as absorbâncias foram de 0,094, 0,091 e 0,12, respectivamente. O que não representou um

aumento significativo. A análise do peróxido de hidrogênio mostrou aumento significativo, com uma absorbância de 0,36.



**Figura 18.** Efeito do composto **3a/3b** sobre a peroxidação lipídica em células leucêmicas HL-60, analisado pelo método colorimétrico do TBARS, após 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. O peróxido de hidrogênio (10 μM) foi utilizado como controle positivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. \* $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

#### 4.5 Avaliação do efeito do composto 3a/3b sobre o conteúdo de dna nuclear de células HL-60

O conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliado por citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo como agente fluorogênico. A doxorrubicina (0,3 μg/mL) foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância. As células foram analisadas 24 h após a incubação com o composto **3a/3b**.

Nesta avaliação, os resultados, apresentados na **tabela 4**, mostram que todas as concentrações testadas foram capazes de aumentar significativamente o DNA sub-G1 (DNA fragmentado ou condensado). Para a concentração de 1,5  $\mu\text{M}$  esse percentual foi de  $17,57 \pm 1,17\%$  ( $p < 0,001$ ), para as concentrações de 3,0 e 6,0  $\mu\text{M}$  o percentual foi de  $61,54 \pm 0,52\%$  e  $84,24 \pm 1,16\%$ , respectivamente ( $p < 0,0001$ ). A doxorrubicina mostrou uma fragmentação de  $77,67 \pm 2,41\%$  nas células.

Quanto à progressão do ciclo celular (**Tabela 4**), a menor concentração (1,5  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de diminuir de forma estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) o conteúdo de DNA na fase G<sub>2</sub>/M ( $7,41 \pm 0,62\%$ ); na concentração de 3,0  $\mu\text{M}$  esta redução foi ainda mais significativa ( $p < 0,001$ ) com um percentual de  $4,57 \pm 1,29\%$ ; já a maior concentração (6,0  $\mu\text{M}$ ) alterou o conteúdo de DNA de todas as fases do ciclo celular. A doxorrubicina reduziu a porcentagem de células em G<sub>2</sub>/M.

**Tabela 4:** Efeito do composto **3a/3b** sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.

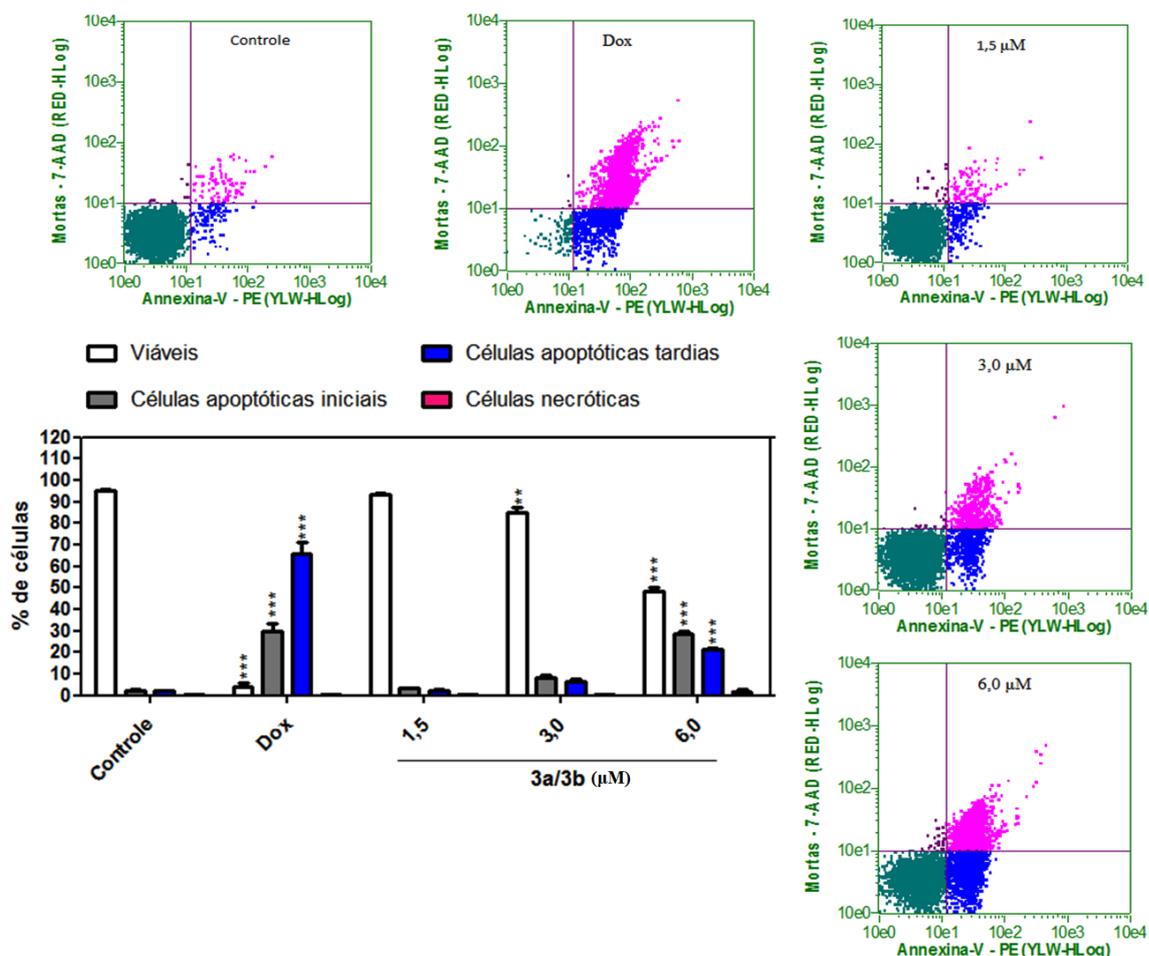
Substância	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	DNA (%)			
		Sub-G <sub>1</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Controle	-	$8,25 \pm 0,15$	$22,07 \pm 0,43$	$67,13 \pm 1,09$	$11,83 \pm 1,08$
Doxorrubicina	0,5	$77,67 \pm 2,41^{***}$	$19,67 \pm 3,72$	$78,91 \pm 4,84$	$1,41 \pm 1,11^{***}$
3a/3b	1,5	$17,57 \pm 1,17^{**}$	$25,17 \pm 2,92$	$67,41 \pm 3,27$	$7,41 \pm 0,62^*$
	3,0	$61,54 \pm 0,52^{***}$	$30,52 \pm 2,66$	$64,92 \pm 1,95$	$4,57 \pm 1,29^{**}$
	6,0	$84,24 \pm 1,16^{***}$	$7,11 \pm 0,56^{**}$	$88,63 \pm 3,65^{**}$	$0,04 \pm 0,04^{***}$

A tabela apresenta os valores correspondentes à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido pelo teste de Dunnett. Doxorrubicina foi usada como controle positivo.

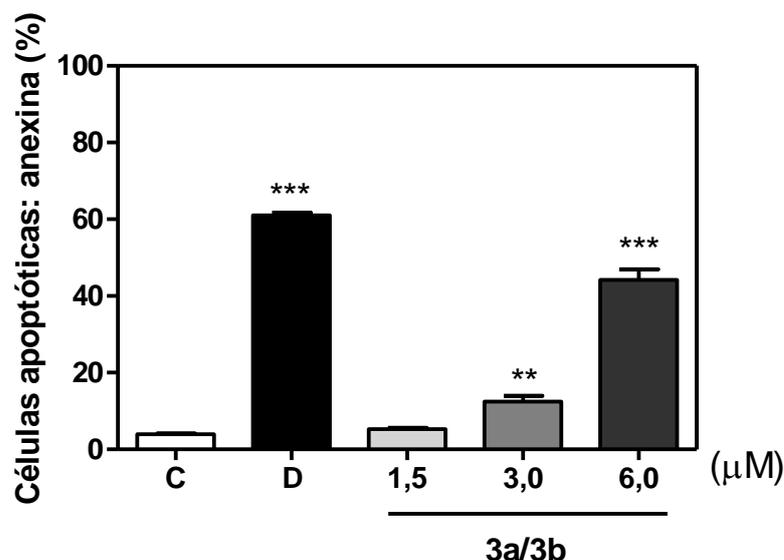
#### 4.6 Determinação da externalização da fosfatidilserina

A externalização da fosfatidilserina (PS) é considerada um marco importante nas fases iniciais da ativação do processo apoptótico (MARTIN *et al.*, 1995). Logo, as células tratadas com os compostos durante 24 horas e os controles (DMSO, 0,1%) foram incubadas com anexina V (proteína com alta afinidade por PS) com o objetivo de avaliar a porcentagem de células com PS externalizado sobre a superfície da membrana celular.

A análise da **figura19** mostra que a média da porcentagem de células HL-60 viáveis no grupo controle negativo foi de  $95,07 \pm 0,44\%$  e após exposição à amostra **3a/3b**, na menor concentração ( $1,5 \mu\text{M}$ ), não reduziu o número de células viáveis e não induziu significativamente a externalização da PS. A concentração de  $3,0 \mu\text{M}$  reduziu ( $p < 0,001$ ) o número de células viáveis  $85,00 \pm 2,58\%$ , e induziu de forma significativa ( $p < 0,01$ ) a externalização da PS, ao ser analisada a soma do percentual de células em apoptose inicial  $8,27 \pm 1,32\%$  com o percentual de células em apoptose tardia  $6,24 \pm 1,40\%$ , como apresentado na **figura 20**. Na maior concentração ( $6,0 \mu\text{M}$ ), foi observado o aumento significativo ( $p < 0,0001$ ) de células em apoptose inicial  $28,31 \pm 1,69\%$  e tardia  $21,35 \pm 0,53\%$ , com uma consequente redução do percentual de células viáveis para  $48,48 \pm 1,77\%$ . A doxorrubicina apresentou aumento significativo na porcentagem de células em apoptose inicial e tardia ( $29,72 \pm 3,49\%$  e  $65,96 \pm 5,15\%$ , respectivamente).



**Figura 19:** Efeito do composto **3a/3b** sobre a externalização da fosfatidilserina em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,3μg/mL) foi utilizada como controle positivo (DOX). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

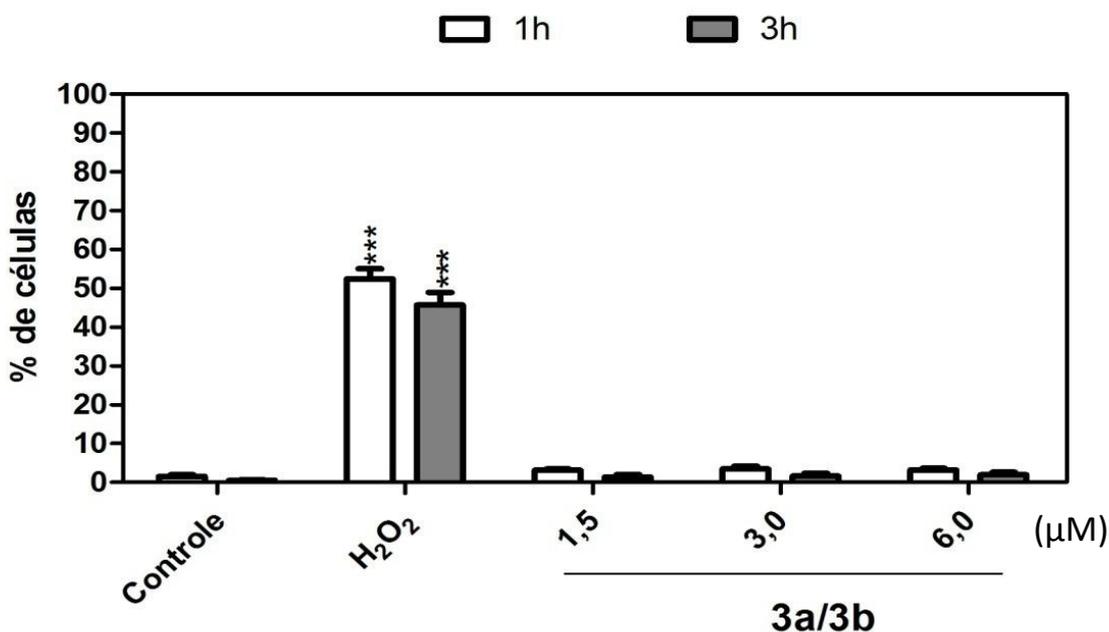


**Figura 20:** Efeito do composto **3a/3b** sobre a externalização da fosfatidilserina em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação. Análise da apoptose O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (0,3μg/mL) foi utilizada como controle positivo (DOX). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

#### 4.7 Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) possuem um papel fundamental na via intrínseca de sinalização da apoptose, pois medeiam dano ao DNA, sendo o DNA mitocondrial particularmente vulnerável, devido a cadeia transportadora de elétrons (FRUEHAUF & MEYSKENS, Jr.; 2007).

Na análise da **figura 21**, observou-se que nenhuma das concentrações testadas foi capaz de gerar EROs. O peróxido de hidrogênio, na concentração 1,0 μM, foi capaz de gerar, significativamente ( $p < 0,0001$ ), nos dois tempos, EROs.



**Figura 21:** Efeito da amostra **3a/3b** sobre a geração de EROs em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando H<sub>2</sub>-DCF-DA, após 1 e 3 horas de incubação. O controle negativo (Controle) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 1,0 µM foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*\*\*,  $p < 0,0001$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

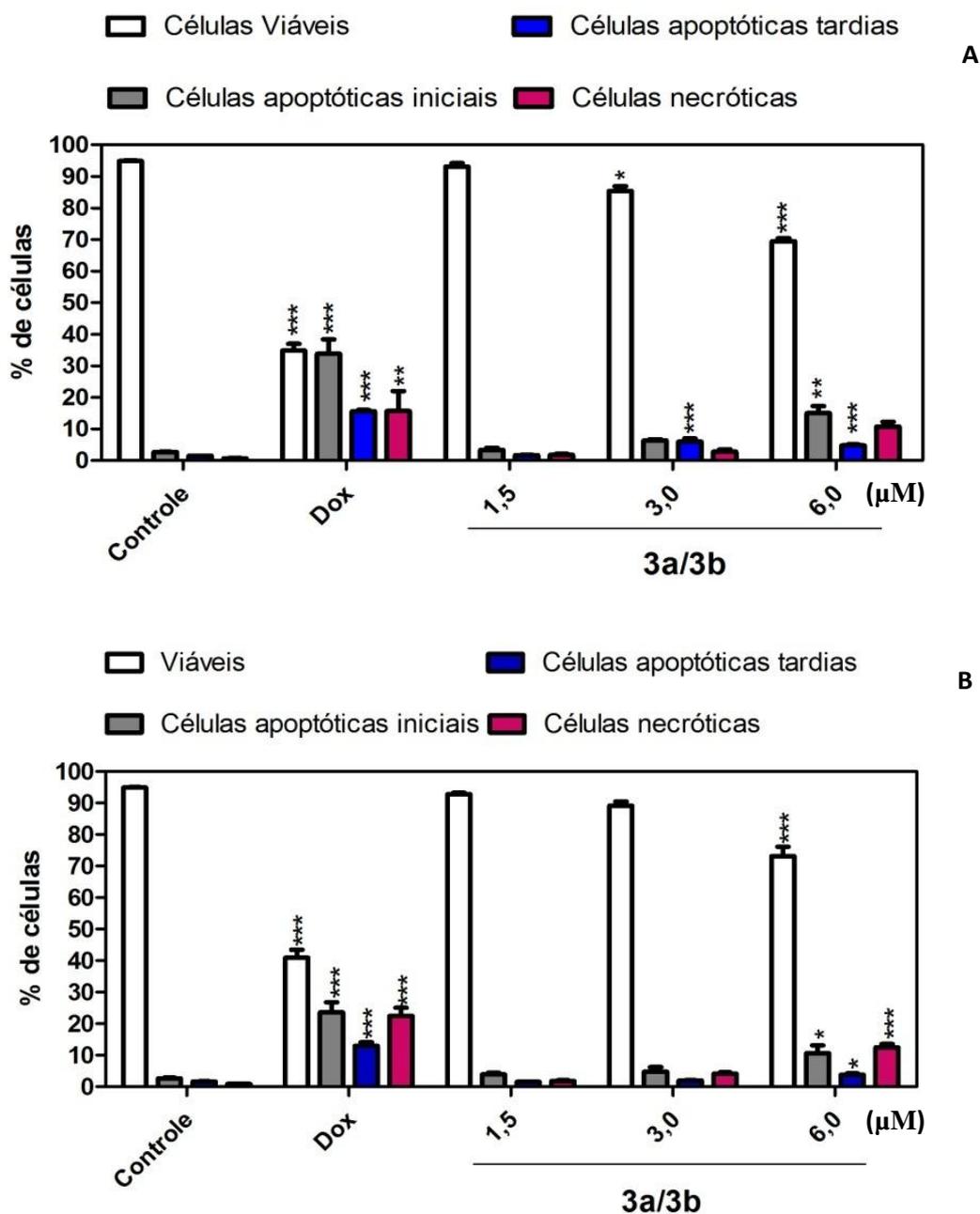
#### 4.8 Efeitos da amostra **3a/3b** sobre a ativação das caspases iniciadoras 8 e 9 em células HL-60

Há duas principais vias de sinalização para ativação das caspases: a via extrínseca, que é iniciada por receptor de morte, na qual está envolvida a caspase 8; e a via intrínseca, conhecida como via mitocondrial, na qual está envolvida a caspase 9. A ativação destas proteases leva à ativação de caspases executoras que vão desencadear o processo de apoptose (CHOWDHURY, I; *et al*; 2008)

Após 24h de incubação, foi observado (**Figura 22-A**) que houve ativação significativa da caspase iniciadora 8, apenas, nas concentrações de 3,0 e 6,0 µM ( $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente). Na concentração de 3,0 µM o percentual de células em apoptose inicial foi

de  $6,35 \pm 0,43\%$  e em apoptose tardia este percentual foi de  $6,04 \pm 0,97\%$ . Já na concentração de  $6,0 \mu\text{M}$  o percentual para células em apoptose inicial foi de  $14,98 \pm 2,28\%$  e de  $4,81 \pm 0,28\%$  para as células em apoptose tardia. Nenhuma das concentrações testadas aumentou de forma significativa o número de células em necrose. A doxorubicina aumentou, significativamente, tanto o número de células em apoptose  $49,49 \pm 4,19\%$  ( $p < 0,0001$ ), como em necrose  $15,67 \pm 6,32\%$  ( $p < 0,001$ ).

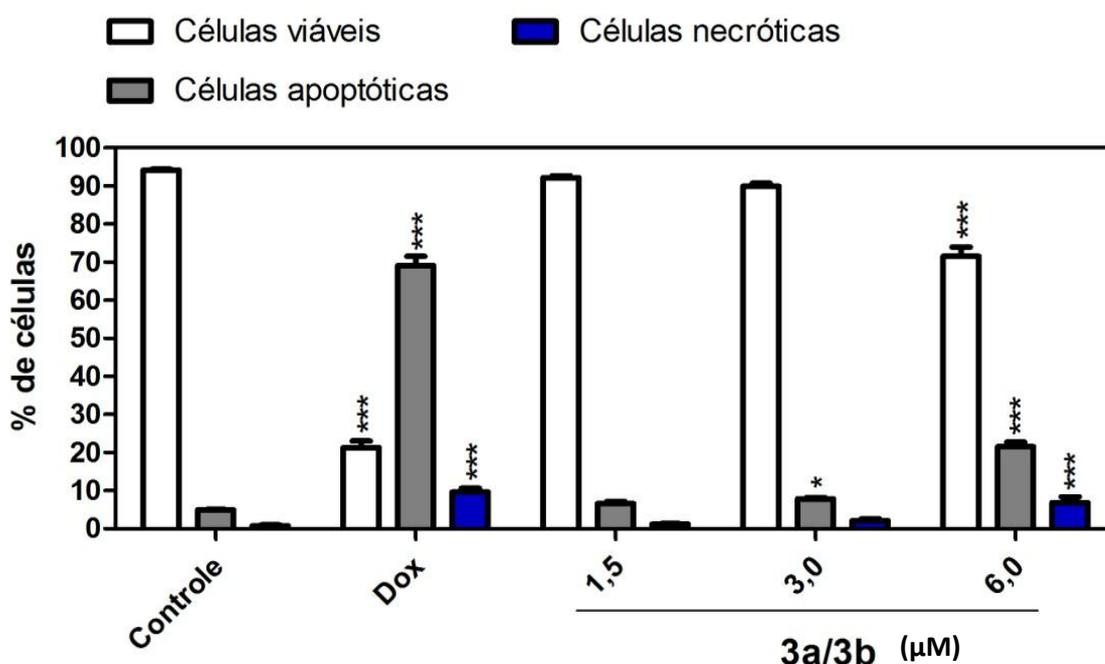
Na análise da **figura 22-B**, foi observado que houve ativação significativa da caspase iniciadora 9, apenas, na maior concentração ( $6,0 \mu\text{M}$ ), cujo percentual de células em apoptose inicial foi de  $10,65 \pm 2,48\%$  ( $p < 0,05$ ) e de  $3,81 \pm 0,42\%$  células em apoptose tardia ( $p < 0,05$ ). Houve um aumento significativo ( $p < 0,0001$ ) de células em necrose, cujo percentual foi de  $12,42 \pm 1,12\%$ . A doxorubicina aumentou significativamente ( $p < 0,0001$ ) o percentual de células em apoptose, inicial ( $23,66 \pm 3,01\%$ ) e tardia ( $12,96 \pm 1,16\%$ ), e o percentual de células em necrose ( $22,46 \pm 2,61\%$ ).



**Figura 22:** Efeito do composto **3a/3b** sobre a ativação de caspase iniciadora 8 (**A**) e caspase iniciadora 9 (**B**) em células leucêmicas de HL-60 determinado por citometria de fluxo utilizando FLICA e FAM (verde), após 24 horas de incubação. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,3μg/mL) foi utilizada como controle positivo (DOX). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

#### 4.9 Efeitos da amostra 3a/3b sobre a ativação das caspases efetoras 3 e 7 em células HL-60

Após as 24h de incubação foi observada a ativação significativa das caspases efetoras 3 e 7, nas concentrações de 3,0 e 6,0  $\mu\text{M}$ , conforme mostra a **figura 23**. O percentual de células em apoptose na concentração de 3,0  $\mu\text{M}$  foi de  $7,90 \pm 0,35\%$  ( $p < 0,05$ ), enquanto que na concentração de 6,0  $\mu\text{M}$  este valor foi de  $21,58 \pm 1,16\%$  ( $p < 0,0001$ ), para células em apoptose, e de  $6,92 \pm 1,45\%$  ( $p < 0,0001$ ), para células em necrose. A doxorubicina aumentou para  $65,81 \pm 0,50\%$  ( $p < 0,0001$ ) o percentual de células em apoptose e para  $9,60 \pm 1,01\%$  ( $p < 0,0001$ ) o percentual de células em necrose.



**Figura 23:** Efeito da amostra **3a/3b** sobre a ativação de caspases efetoras 3 e 7 em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando FLICA e FAM (verde), após 24 horas de incubação. O controle negativo (controle) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina ( $0,3\mu\text{g/mL}$ ) foi utilizada como controle positivo (DOX). Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ ; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

#### 4.10 Avaliação do potencial genotóxico em células mononucleadas de sangue periférico (CMSP)

A avaliação do potencial genotóxico em células mononucleares do sangue periférico humano (CMSPH), tratadas com o composto **3a/3b**, foi realizada pelo ensaio do cometa em condições alcalinas. A **tabela 5** mostra que o composto testado (**3a/3b**) não foi capaz de induzir dano à fita de DNA, portanto não foi genotóxico em CMSPH. Já a doxorrubicina induziu um dano de  $236,8 \pm 2,17$  nas células,  $p < 0,0001$ .

**Tabela 5.** Avaliação do potencial genotóxico do composto **3a/3b** em CMSPH (células mononucleares do sangue periférico humano) pelo ensaio do cometa, após 24 h de incubação.

Substâncias	Concentração	Índice de Dano (ID)
Controle	-	$11,5 \pm 2,17$
Doxorrubicina	0,3 µg/mL	$236,8 \pm 1,22^{***}$
3a/3b	1,5 µM	$9,5 \pm 1,15$
	3,0 µM	$9,0 \pm 0,52$
	6,0 µM	$13,83 \pm 0,65$

A tabela apresenta os valores correspondentes à média  $\pm$  E.P.M. de dois experimentos independentes realizados em duplicata, obtidos a partir da contagem de 400 células por experimento. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.  $^{***}$ ,  $p < 0,0001$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

## 5 DISCUSSÃO

Historicamente, a maioria das novas drogas surge a partir de algum produto natural (metabólitos secundários) (NEWMAN & CRAGG, 2007; BAKER *et al*, 2007; LI & VEDERAS, 2009), os quais têm sido a base para produção de muitas drogas clinicamente bem sucedidas (ZHOU *et al*, 2008). Há muito tempo foi reconhecido que as estruturas de produtos naturais possuem as características de diversidade química, bioquímica e especificidade, além de outras propriedades moleculares que os fazem favoráveis como estruturas de ligação para a descoberta de novas drogas (NEWMAN, *et al*, 2003; KOEHN & CARTER, 2005). A química medicinal faz o aproveitamento do esqueleto ativo destas moléculas, modificando, através de modelagem molecular ou outras técnicas de síntese, pequenos radicais, que podem ser adicionados ou retirados da estrutura, a fim de melhorar as propriedades farmacológicas do composto, aumentando sua eficácia e segurança, diminuindo os efeitos colaterais (QIAN, *et al*, 2007; ORTHOLAND & GANESAN, 2004).

Neste contexto, os triterpenóides são compostos que nos últimos anos têm despertados grande interesse em razão de sua diversidade estrutural e da descoberta de um amplo espectro de atividades farmacológicas, tais como: antiinflamatório (KO *et al*, 2007), gastoprotetor (MELO *et al*, 2010), antimicrobial (SINGH & DUBEY, 2001), antinociceptivo (LIMA-JÚNIOR *et al*, 2006), antioxidante (RAMACHANDRAN & PRASAD, 2008), anticancerígeno (YANG & DOU, 2010), e antidepressivo (ZHOU *et al*, 2010). Nos últimos dez anos um grande número de derivados sintéticos de triterpenóides naturais tem contribuído significativamente para o estudo farmacológico destes compostos (BANDEIRA *et al*, 2007; BARROS *et al*, 2010). Laszczyk (2009), em seu trabalho, descreve que as novas estratégias, na terapia do câncer, incluem o tratamento do meio ambiente tumoral, evitar a angiogênese e modular a resposta imune ou a inflamação crônica. Neste sentido, devido às várias propriedades farmacológicas dos triterpenos, em especial as classes ursano e oleano (triterpenos pentacíclicos), que ainda incluem propriedades antiangiogênicas e a capacidade de induzir diferenciação celular, colocam estes compostos como promissores candidatos a drogas que estão dentro das novas estratégias de tratamento do câncer. Além de poderem atuar como agentes quimiopreventivos na promoção do câncer (CHATURVEDI, *et al*, 2008; OVESNA, *et al*, 2004).

Neste aspecto os triterpenos pentacíclicos  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina, de ocorrência natural em várias espécies, especialmente na resina de espécies, do gênero *Protium*, são possuidoras de

atividades antiinflamatória, gastoprotetora, antinociceptiva, antidepressiva, antiplaquetária, analgésica e anticâncer (OLIVEIRA *et al* 2004; ARAGÃO *et al*, 2007; ARAGÃO *et al*, 2006; SOLDI *et al*, 2008; LASZCZYK, 2009). A sua similaridade estrutural com as drogas esteroidais pode justificar sua ampla atividade farmacológica (ARAGÃO *et al*, 2007) Essa similaridade proporciona o desenvolvimento de muitos análogos estruturais, tomando como base, principalmente, a estrutura básica da  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina; pois são moléculas amplamente estudadas, com várias descrições na literatura de suas propriedades farmacológicas.

Apesar de não existir nenhuma publicação de ensaio clínico usando triterpenos pentacíclicos na terapia do câncer, provavelmente devido à insolubilidade destes compostos em água e a sua baixa atividade citotóxica *in vitro*, este grupo de substâncias possui um alto potencial na moderna terapia do câncer (LASZCZYK *et al*, 2006; JÄGER *et al*, 2007). Os problemas de ordem galênica podem ser resolvidos por derivatização, complexação (GUO *et al*, 2003; STRÜH *et al*, 2008) ou formulação lipossomal (KANG *et al*, 2007); já a moderada citotoxicidade *in vitro* é um desafio a síntese química, que pode melhorar as características farmacológicas destes compostos.

Sendo assim, diversos grupos de pesquisa têm mostrado o interesse na classe dos triterpenos, publicando resultados que relatam a citotoxicidade e o potencial antitumoral de triterpenos pentacíclicos isolados de plantas, ou de análogos sintetizados a partir dos metabólitos naturais. Sánchez *et al* (2010) isolaram da *Nardophyllum bryoides* uma série de compostos terpenóides, dentre os quais estavam seis estruturas da série  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina; e os testes de citotoxicidade em duas linhagens tumorais, LM3 (adenocarcinoma de murino) e PANC1 (carcinoma do ducto pancreático humano), mostraram que, apenas, um composto apresentou elevada atividade citotóxica em LM3, com uma  $CI_{50}$  de 0,8  $\mu$ M. Um novo composto triterpenóide foi isolado da *Panax stipuleanatus* e sua atividade citotóxica frente a células HL-60 (leucemia humana) correspondeu a uma  $CI_{50}$  de 4,44  $\mu$ M e de 0,63  $\mu$ M em células HCT-116 (carcinoma colorretal humano) (LIANG *et al*, 2010). Ukiya *et al* (2010) sintetizaram a partir da resina de *Shorea javanica* K. & V. (Dipterocarpaceae) 14 derivados triterpenóicos, dos quais, quatro apresentaram potente atividade citotóxica ( $CI_{50}$  4,7 – 9,3  $\mu$ M) contra células HL-60 e 12 deles apresentaram uma elevada citotoxicidade (7,5 – 21,7  $\mu$ M) contra células de melanoma, CRL1579; este potencial citotóxico foi comparado a cisplatina, que apresentou citotoxicidade de 1,9  $\mu$ M contra células HL-60 e 21,1  $\mu$ M contra células CRL1579. Por outro lado, nossos resultados de citotoxicidade (**Tabela 3**) realizados pelo teste do MTT dos análogos triterpenóides de  $\alpha$ -/ $\beta$ -amirina, **1a/1b**, **2a/2b**, **3a/3b**, **4a/4b**, mostraram

que apenas a amostra **3a/3b** exibiu elevado potencial citotóxico. Enquanto os outros análogos apresentaram uma  $CI_{50}$  acima de 5  $\mu\text{g/mL}$ , o composto **3a/3b** exibiu uma  $CI_{50}$  de 0,94  $\mu\text{g/mL}$  (1,8  $\mu\text{M}$ ) na linhagem HL-60 (leucemia humana), já em linhagens de tumores sólidos a  $CI_{50}$  foi de 1,58  $\mu\text{g/mL}$  (3,0  $\mu\text{M}$ ) para células HCT-8 (carcinoma de cólon humano), 1,84  $\mu\text{g/mL}$  (3,5  $\mu\text{M}$ ) nas células SF-295 (glioblastoma humano) e de 1,52  $\mu\text{g/mL}$  (2,9  $\mu\text{M}$ ) em células MDAMB-435 (carcinoma de mama). Além disso, o derivado amirínico **3a/3b** foi testado em K-562, outra linhagem leucêmica, por ter apresentado uma moderada especificidade neste tipo histológico; nesta linhagem a  $CI_{50}$  foi de 0,92  $\mu\text{g/mL}$  (1,76  $\mu\text{M}$ ), praticamente o mesmo valor em HL-60 e relevante diante de outros compostos do mesmo grupo testados contra esta linhagem (LIANG *et al*, 2010; Ukiya *et al*, 2010).

Estes dados reforçam aqueles encontrados por Thao *et al* (2010), que isolou da fração etil-acetato de *Camellia japonica* três novos triterpenóides e sete outros conhecidos, dentre eles a  $\beta$ -amirina. Testados contra HL-60, A549 (adenocarcinoma alveolar) e MCF-7 (carcinoma de mama), apresentaram  $CI_{50}$  variando entre 17,1 – 65,4  $\mu\text{M}$  para a linhagem HL-60 e um fraco potencial nas linhagens de tumores sólidos.

Do ponto de vista da estrutura-atividade, a alta citotoxicidade do análogo **3a/3b** pode ser atribuído a presença da dupla ligação no grupo maleinato ligado ao carbono 3 do anel A, que está ausente nos outros análogos, cuja citotoxicidade foi inferior àquela apresentada pela amostra **3a/3b**. Quimicamente, a presença desta dupla ligação entre os carbonos C-1' e C-2' no grupo acil deste derivado gera um centro rico em elétrons, que pode interagir com centros de baixa densidade eletrônica. Ademais, esta dupla ligação está em um sistema conjugado suscetível à ressonância, podendo criar centros positivamente e negativamente carregados capazes de promover interações químicas com grupos eletrófilos e nucleófilos, o que não pode ser observado no grupo acil dos outros derivados (sem atividade citotóxica significativa). Na realidade, muitos estudos têm mostrado a relação positiva entre a insaturação na estrutura do composto e o potencial no efeito citotóxico (AMSLINGER, 2010; ROH *et al*, 2010; BARROS *et al*, 2010). Cavalcanti *et al* (2009) demonstraram a importância da dupla ligação exocíclica, em ácido Carenóico, como responsável por indução de danos ao DNA e subsequente apoptose de células HL-60. Somado a isso, o ácido Carenóico foi capaz de interagir com o DNA celular e interferir na atividade da enzima topoisomerase I.

Estes resultados confirmam que pequenas mudanças na molécula podem significar alteração do efeito biológico de um composto, sendo favorável, portanto, a produção de derivados por técnicas químicas de semi-síntese na pesquisa de novas drogas, inclusive para

drogas anticâncer (LEE, 2010). Cragg *et al* (2009) têm relatado que compostos de origem natural possuem alto potencial anticâncer, porém é necessário otimizar as estruturas por remoção, modificação, introdução de grupos funcionais e estereocentros, melhorando as propriedades dos compostos. Métodos de biossíntese combinatória ainda são limitados, contudo, há muitos exemplos incluindo taxanos, camptotecina e combretastatinas (COSERI, 2009; KINGSTON, 2008)

Apesar do aumento dramático do gasto global em descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, a taxa de aprovação está em declínio, principalmente devido aos efeitos colaterais, indesejáveis e toxicidade (MORROW *et al*, 2010). O maior desafio na descoberta de drogas no combate ao câncer passa por este dilema, desenvolver uma molécula potencialmente tóxica às células tumorais e inerte às normais (ANAZETTI *et al.*, 2003). Desta maneira o estudo do potencial citotóxico de uma substância, é de fundamental importância à utilização de células normais, tais como os linfócitos, para avaliar a seletividade da droga teste para células normais ou tumorais (ZUCO *et al.*, 2002; ANAZETTI *et al.*, 2003).

O efeito citotóxico da amostra **3a/3b** em células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP) foi analisado através do teste Alamar blue, no qual se obteve uma  $CI_{50}$  de 9,5  $\mu$ M, mais de cinco vezes superior a  $CI_{50}$  em células HL-60. Foi determinado, também, a citotoxicidade em uma linhagem de macrófagos (J774), cuja  $CI_{50}$  foi de 3,31  $\mu$ M, quase duas vezes a  $CI_{50}$  em células HL-60, representando uma janela terapêutica um pouco menor. Dentre os triterpenos, o ácido betulínico (um triterpeno pentacíclico de estrutura semelhante a  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina), têm sido muito estudado como opção terapêutica ao câncer, pois apresentou citotoxicidade seletiva contra linhagens de melanomas (PISHA *et al*, 1995), e dentre os ensaios com células não-transformadas, podendo-se citar fibroblastos, melanócitos, células neuronais e células mononucleares do sangue periférico, houve maior resistências aos efeitos do ácido, quando comparados aos efeitos citotóxicos em linhagens de câncer (ZUCO *et al*, 2002; FULDA *et al*, 1999a; FULDA *et al*, 1999b; SELZER *et al*, 2000).

Acrescentado a esse fato, a amostra estudada não causa lise das hemácias de camundongos, sugerindo que o mecanismo de ação citotóxico dos compostos não é devido a um dano direto sobre a membrana plasmática da célula. Relacionando-se a um mecanismo de morte mais específico (COSTA *et al*, 2008).

Depois de encontrar parâmetros, relativamente seguros de citotoxicidade em linfócitos, macrófagos e eritrócitos, foi dado continuidade aos ensaios a fim de esclarecer o

tipo de morte celular provocado pela amostra **3a/3b** e seu mecanismo de ação na linhagem leucêmica HL-60. Para tanto foram utilizadas as concentrações de 1,5  $\mu\text{M}$ , 3,0  $\mu\text{M}$  e 6,0  $\mu\text{M}$ ; estes valores foram determinados com base na  $\text{CI}_{50}$  do composto na linhagem selecionada.

O surgimento de um tumor pode ser conseqüência de vários fatores, dentre os quais estão a herança genética e os fatores ambientais (raios UV, poluição, alimentação, estresse etc.) que podem desencadear um acúmulo de alterações gênicas que não conseguiram ser reparadas e agregam a célula características moleculares próprias de um câncer (desdiferenciação, alto grau de mitose e, dentre outros, mecanismos de proteção contra a morte celular programada, apoptose (DANIAL, 2007; BUCHAKJIAN & KORNBLUTH, 2010). Portanto, a importância do desenvolvimento de fármacos que consigam ativar este mecanismo de morte celular. Diversas alterações morfológicas da célula podem ser sugestivas de apoptose: redução do volume celular, condensação da cromatina e fragmentação internucleosomal do DNA, formação de “*blebbings*” na membrana plasmática e, finalmente, fragmentação celular, formando os corpos apoptóticos (REED, 2000; NAGANE *et al.*, 2001; REED, 2001; GREEN & KROEMER, 2005; KROEMER *et al.*, 2005; RICCI & ZONG, 2006; ELMORE, 2007; MELLIER *et al.*, 2010).

As células em apoptose mantêm suas membranas íntegras durante quase todo o processo até a sua morte, diferentemente das necróticas, que, morfológicamente, apresentam perda da integridade da membrana, a célula fica túrgida e o DNA é degradado aleatoriamente (CHO *et al.*, 2010; HENRIQUEZ *et al.*, 2008). O que pode ser identificado nos resultados obtidos com azul de tripan, mostrados na **figura 12-A**, na qual o composto **3a/3b** reduziu o número de células viáveis, de forma significativa, a partir da concentração de 3,0  $\mu\text{M}$ , aumentando o número de células não-viáveis (**Figura 12-B**) de maneira concentração-dependente.

A análise da morfologia de células HL-60 tratadas com a mostra **3a/3b**, usando microscopia óptica, e coradas com May Grünwald – Giemsa, confirmou os resultados anteriores. Depois de 24h de incubação, células do controle negativo exibiram morfologia de típica de células suspensas com vacuolização (**Figura 14-A**). A condensação da cromatina e a fragmentação nuclear e celular foram observadas na presença da doxorubicina a 0,5  $\mu\text{M}$  (**Figura 14-B**), características de apoptose. As células tratadas com o análogo amirínico, na concentração de 1,5  $\mu\text{M}$ , não apresentaram mudanças morfológicas significativas (**Figura 14-C**). Por outro lado, as concentrações de 3,0 e 6,0  $\mu\text{M}$ , induziram mudanças típicas de apoptose (**Figuras 14-D e 14-E**, respectivamente), incluindo redução do volume celular, núcleo

picnótico e cromatólise, sendo mais pronunciadas na maior concentração. Ademais, como pode ser observado nas **figuras 14-D** e **14-E**, há um aumento no número de células com o volume reduzido e membrana íntegra.

Para reforçar os achados da microscopia óptica, foi realizada a análise morfológica das células tratadas com o composto **3a/3b** através da coloração diferencial com laranja de acridina e brometo de etídio (LA/BE). A análise das células foi feita por microscopia de fluorescência e as percentagens de células viáveis, apoptóticas e necróticas foram calculadas. Depois de 24h de incubação as células HL-60 exibiram redução na viabilidade somente nas concentrações de 3,0 e 6,0  $\mu\text{M}$ . Nestas concentrações o número de células apoptóticas aumentou significativamente, já o número de células em processo de necrose teve um pequeno aumento, apenas na maior concentração (**Figura 15**), o que corrobora com os resultados descritos anteriormente.

O estudo da integridade da membrana foi feito por citometria de fluxo. As células HL-60 foram incubadas com a amostra e após 24h procedeu-se a análise no citômetro, mostrando uma redução no tamanho celular e na granulosidade em um padrão concentração-dependente. Este resultado pode ser observado na **figura 16**, onde se destaca a redução do número de células HL-60 com morfologia normal. Percebe-se ainda a manutenção da integridade de membrana nas menores concentrações (1,5 e 3,0  $\mu\text{M}$ ), quando observados os histogramas das **figuras 17-C**, **17-D** e **17-E**, além da análise da **figura 16**, que mostra uma alteração de integridade, apenas, na maior concentração, como dito anteriormente.

Os resultados de proliferação celular e morfológicos verificados até agora mostram que o composto **3a/3b** pode estar envolvido no desencadeamento da apoptose, na linhagem leucêmica HL-60.

Semelhante a estes resultados, Urech *et al* (2005), no estudo do extrato lipofílico de *Viscum album* L., conseguiu isolar o ácido betulínico, oleanólico e ursólico (a beta-amirina é outro constituinte importante do extrato lipofílico desta planta), cuja citotoxicidade em células leucêmicas foi significativa e as mudanças morfológicas, na redução da granulosidade e do tamanho das células, foram causadas dentro de um padrão concentração-dependente.

Uma característica bioquímica importante na detecção da apoptose é a externalização da fosfatidilserina, presente na região interna da bicamada lipídica (BRATON *et al*, 1997). O uso de anexina V, uma proteína recombinante que interage forte e especificamente com os resíduos de fosfatidilserina, pode ser usada na identificação deste evento (ARUR *et al*, 2003).

A utilização do teste da anexina V, mostrado nas **figuras 19 e 20**, foi realizado a fim de caracterizar bioquimicamente a indução da apoptose. Os resultados apresentados na **figura 20** revelam que a externalização da fostatidilserina ocorre de maneira concentração-dependente, sendo significativa, apenas, a partir da concentração de 3,0  $\mu\text{M}$ . Assim como no trabalho de Urech *et al* (2005).

A ativação de endonucleases está associada ao processo de apoptose e resulta na extensa clivagem (quebra) do DNA (VERMES *et al.*, 2000), que pode ser detectada por citometria de fluxo, utilizando o corante iodeto de propídio. A análise da fragmentação do DNA, provocada por todas as concentrações de **3a/3b**, mostrou a produção de níveis significativos de DNA/sub-G1 (DNA fragmentado ou condensado). Sendo que na concentração de 3,0  $\mu\text{M}$  houve uma pequena redução na concentração de DNA em fase G2/M, tal como ocorreu com o controle positivo, doxorrubicina.

Em estudos com o análogo estrutural da  $\alpha$ -amirina, AKBA, na linhagem HL-60, Hoernlein *et al* (1999) evidenciaram a degradação do DNA nas células tratadas com a amostra, os histogramas mostraram o aparecimento de um pico na fase sub-G1. Aliando este resultado às mudanças morfológicas das células detectadas por microscopia de luz e citometria de fluxo, eles concluíram que a amostra AKBA induz apoptose.

Alguns tratamentos que induzem apoptose podem ser ciclo-específico ou não, mas todos podem de alguma forma influenciar este processo (ORMEROD, 2002). Apesar de provocar intensa fragmentação de DNA, que pode prejudicar o ciclo celular não se pode afirmar que a molécula **3a/3b** cause interferência no ciclo celular, mesmo a que a concentração de 3,0  $\mu\text{M}$  tenha causado uma pequena redução na concentração de DNA em G2/M. Alguns trabalhos descrevem a ação de triterpenos pentacíclicos, com núcleo ursólico, no ciclo celular, induzindo apoptose; é o caso do triterpeno isolado da planta *Astilbe chinensis* (Maxim.), cuja ação interferiu na proliferação celular associada a parada do ciclo na fase G0/G1 (ZHENG *et al.*, 2006). Como a amostra **3a/3b** é uma mistura isomérica de  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina, então o efeito pode ser atribuído, parcialmente a cada componente, pois como foi visto no trabalho de Hoernlein *et al* (1999), o composto AKBA, análogo da  $\alpha$ -amirina, não apresentou intervenção no ciclo celular; entretanto o triterpeno isolado por ZHENG *et al* (2006) provocou parada do ciclo em G0/G1.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) têm surgido como moléculas críticas na sinalização celular (KAMATA & HIRATA, 1999; UEDA *et al.*, 2002; HALLIWELL, 1991; KIERAN *et al.*, 2003; HARRIS, 2002; INOUE *et al.*, 2003; POUYSSEGUR *et al.*, 2006;

LINNANE & EASTWOOD, 2006). O metabolismo do oxigênio mitocondrial gera, constantemente, EROs, as quais acabam interferindo na integridade mitocondrial, conseqüentemente na sinalização celular; residindo aí a importância de sistemas de limpeza que controlam os níveis de EROs no meio intracelular (LINNANE & EASTWOOD, 2006; KINNULAVL & CRAPO, 2004). O balanço oxi-redox na célula é uma importante ferramenta na regulação de sinais, incluindo quinases, ativação de fosfatases e a expressão de genes através da modulação da função do fator de transcrição (THANNICKAL & FANBURG, 2000; SEN, 2000; BISWAS *et al*, 2006). O balanço redox é comandado por vários sistemas enzimáticos dentre eles: a superóxido dismutase (SOD), glutathiona (GSH) e a tioredoxina ligada a tioredoxina redutase, além da glutaredoxina, que usa a GSH como substrato.

Os danos ao DNA causados pelas EROs, têm um papel importante na iniciação da carcinogênese e transformação em células malignas (VALKO *et al*, 2006). Ademais, a produção excessiva de EROs pode atingir diferentes alvos, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucléicos, a fim de causar lesões celulares suficientes para estimular moléculas pró-apoptóticas, ou, até mesmo, acionar a cascata apoptótica mitocondrial (BRENNER & GRIMM, 2006). Células transformadas, comumente, possuem falhas ou bloqueios nos *checkpoints* do ciclo celular e superexpressam oncogenes de fatores de crescimento, desta forma seus receptores desencadeiam a proliferação celular e hipóxia crônica (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Alguns trabalhos têm descrito a ativação de muitos dos receptores de tirosina quinase por uma via de sinalização EROs dependente (SUNDARESAN *et al*, 1995; BAEYS *et al*, 1997).

Diante destes dados, duas possibilidades terapêuticas são discutidas. Uma delas ataca a célula transformada através do uso de drogas capazes de atuarem como seqüestradoras de EROs, atenuando, assim, a sinalização pela via  $H_2O_2$  e deprimindo o crescimento do tumor. E a outra atua de forma oposta, usando moléculas que interferem no sequestro de EROs, resultando num excesso de EROs, causando danos em vários componentes celulares, entre eles os lipídios de membrana, ocasionando um processo chamado de peroxidação lipídica, que pode desencadear o processo de apoptose (FLEURY *et al*, 2002; LE BRAS *et al*, 2005; MEYSKENS *et al* 2001). A primeira estratégia terapêutica tem sido aplicada, em testes, como uma quimioprevenção em fases iniciais do processo de transformação, poucos estudos mostram o sucesso deste tratamento em pacientes com a doença avançada (MEYSKENS & SZABO, 2005). Sendo pouco provável que o bloqueio da sinalização das EROs afete os

resultados do paciente devido a complexidade dos caminhos redundantes que sustentam o crescimento do câncer (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

O composto **3a/3b**, no ensaio para determinação da geração de EROs, não foi capaz de gerar aumento na produção destas espécies, em nenhuma das concentrações testadas, permanecendo em níveis semelhantes ao controle, assim como não foi capaz de formar produtos de peroxidação lipídica. Entretanto, os triterpenos, particularmente o lupeol, mas também o ácido betulínico e ursólico, são conhecidos por seu potencial antioxidativo (PRASAD *et al*, 2008; RAMACHANDRAN & PRASAD, 2008; SUDHAHAR *et al*, 2008; SUDHARSAN *et al*, 2005; SULTANA *et al*, 2003; MALINI *et al*, 2000). Eles ativam o sistema enzimático pelo aumento da atividade da SOD, assim como da catalase (CAT) e glutatona S-transferase e glutatona peroxidase. (MALINI *et al*, 2000; VIDYA *et al*, 2000; ). Com estas informações e os dados da geração de EROs, pode-se supor que a molécula **3a/3b** poderia atuar na estimulação do processo redox, impedindo a proliferação celular, reportada pelos dados anteriores.

Com isso, deu-se prosseguimento ao estudo do mecanismo de morte celular induzido pelo composto **3a/3b** através da marcação de caspases ativas. Como visto anteriormente, os resultados indicam a ativação de mecanismos apoptóticos, cujas características bioquímicas fundamentais são a fragmentação do DNA, ativação aspartato-específico proteases (caspases) e a externalização de resíduos de fosfatidilserina (HENGARTNER, 2000; MONTENEGRO *et al*, 2010).

As caspases, inicialmente sintetizadas sobre a forma de zimogênios, são uma família, altamente conservada, de cisteíno-proteases, cuja ativação em proteases ativas depende da regulação de sinais (CHOWDHURY *et al*, 2008). São divididas em duas sub-famílias: caspases inflamatórias e apoptóticas. Estas últimas dividem-se ainda em caspases iniciadoras e efetoras (CHOWDHURY *et al*, 2008, MONTENEGRO *et al*, 2010). Existem duas vias mediadas por caspases para ativação da apoptose, a via extrínseca e a intrínseca. A primeira delas, também chamada de via mediada por receptor de morte, desempenha um importante papel na homeostase tecidual, especialmente na resposta imune e é iniciada pela ativação da caspase iniciadora 8, enquanto que a outra, também conhecida como via dependente da mitocôndria é usada extensivamente na resposta a agravos intracelulares, tais como danos ao DNA e é induzida pela ativação da caspase iniciadora 9 (DANIAL & KORSMEYER, 2004). O resultado da ativação de uma ou de outra via vai ser o mesmo, acionando as caspases

efetoras (3, 6 e 7), que darão início a clivagem de substratos celulares relacionados a apoptose.

Por conseguinte, a análise dos testes realizados em citometria de fluxo para verificação da participação de caspases iniciadoras, 8 e 9 (**Figura 22-A e 22-B**, respectivamente), revelaram que, após 24h de incubação com a amostra **3a/3b**, a concentração de células HL-60 em processo apoptótico, relativa a cascata da via extrínseca desencadeada pela caspase iniciadora 8, aumentou significativamente nas concentrações de 3,0 e 6,0  $\mu\text{M}$ ; e a ativação da caspase iniciadora 9, responsável pela via intrínseca, foi verificada, apenas, na maior concentração (6,0  $\mu\text{M}$ ), o que é plausível devido ao efeito acentuado dessa concentração, que interferiu positivamente em praticamente todos os testes. Além disso, a sinalização desencadeada pela caspase iniciadora 8 foi mais significativa a partir da menor concentração (3,0  $\mu\text{M}$ ), na qual não foi observado o aumento de células em necrose, apesar do aumento significativo ter sido em células em apoptose tardia.

Yan *et al* (2010) estudaram o mecanismo de ação envolvido na citotoxicidade dos ácidos oleanólico e ursólico (o análogo **3a/3b** da alfa-/beta-amirina derivam, respectivamente, destes ácidos) em linhagens de câncer de fígado. Perceberam que as duas moléculas ativam a caspase iniciadora 8, ou seja, a via extrínseca da apoptose, com a conseqüente ativação da caspase efetora 3. O ácido ursólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxi-urs-12-en-28-oico) é o maior componente ativo da *Corni fructus* e foi avaliado quanto ao seu potencial citotóxico, mostrando uma ação na ativação da cascata de caspases, acionando tanto a via extrínseca (caspase iniciadora 8), como a via intrínseca (caspase iniciadora 9), além da ativação final na caspase efetora 3, que irá clivar substratos que farão surgir as características morfológicas e bioquímicas da apoptose (KWON *et al*, 2010).

Tendo conhecimento da ativação da caspase 8 proporcionado pela amostra **3a/3b**, as caspases efetoras 3 e 7 foram ativadas (**Figura 23**), a partir da concentração de 3,0  $\mu\text{M}$ , e como conseqüência muitos dos eventos apoptóticos foram identificados, tais como a fragmentação de DNA, redução do volume celular e aumento da granulosidade, além da externalização da fosfatidilserina. Importante observar que na concentração de 3,0  $\mu\text{M}$  não houve aumento do número de células necróticas, o que reforça o resultado da citometria para a caspase 8. Kim *et al* (2009) obteve resultados semelhantes com um composto oleanólico em linhagem leucêmicas, HL-60.

Os resultados até agora discutidos mostram o potencial anticâncer do triterpeno **3a/3b**, porém muitos agentes anti-neoplásicos que estão hoje na clínica são genotóxicos

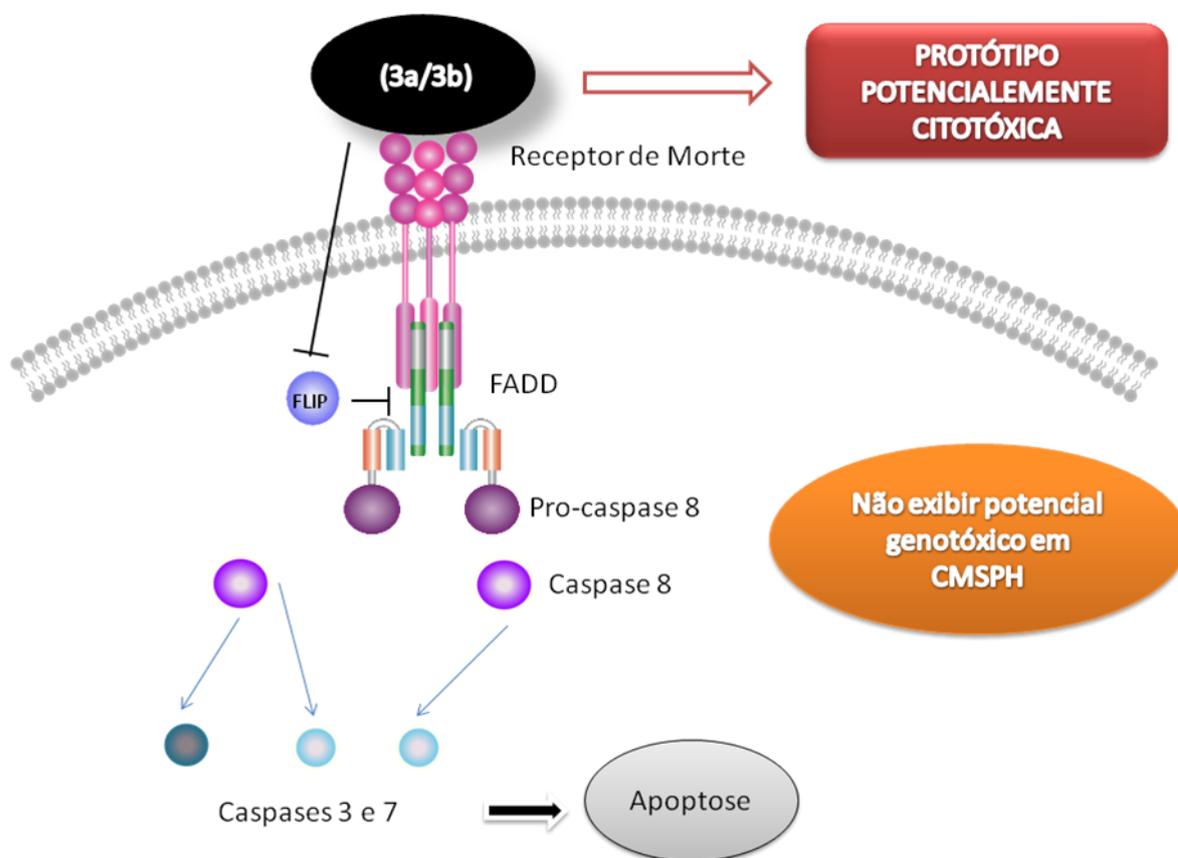
(ANDERSON & BERGER, 1994; DE MESA *et al.*, 2002), por isso a necessidade de desenvolver novos fármacos menos tóxicos, que podem substituir agentes mais genotóxicos nos esquemas de quimioterapia. Embora seja grande o risco que esses fármacos trazem, o benefício resultante da remissão ou cura da neoplasia é considerado. Com isso, a avaliação sistemática do potencial genotóxico de um composto citotóxico permite a identificação e o desenvolvimento de novos agentes.

Desta forma o ensaio do cometa, em sua versão alcalina, cumpre bem o papel de determinar o potencial genotóxico de um agente, ao detectar tanto quebras de fita simple, quanto de fita dupla de DNA (CAVALCANTI *et al.*, 2006). As quebras de dupla fita da molécula de DNA são lesões difíceis de serem reparadas, podendo culminar na morte celular ou em mutações deletérias, além disso, as quebras de fitas simples podem ser convertidas em quebras duplas durante o progresso da forquilha de replicação (KHANNA; JACKSON, 2001; KUZMINOV, 2001). Devido à importância das quebras de dupla fita sobre a citotoxicidade, conduzimos a análise do ensaio do cometa em sua versão neutra de modo a detectar esse tipo de lesão. Após o ensaio não foram observados danos significativos ao DNA, causados pela amostra **3a/3b**. Um resultado importante, visto que um dos maiores problemas na terapia do câncer são os efeitos colaterais causados pela atividade destes fármacos em células normais do organismo

Informações a cerca do mecanismo de ação molecular das drogas é essencial para o desenvolvimento de qualquer quimioterápico em potencial. Neste contexto muitas drogas anticâncer tem se mostrado como indutoras de apoptose em células tumorais (HU & KAVANAGH, 2003). Os triterpenos, biossintetizados nas plantas pela ciclização do esqualeno, tem sido destacados em estudos recentes por sua ação anticâncer (KIM *et al.*, 2009). Desse modo, estes triterpenóides e seus derivados são também efetivos na inibição da angiogênese, da invasão tumoral e das metástases; em particular os ácidos oleanólicos e ursólicos, além de seus derivados, tendo sido relatados como importantes agentes na indução de apoptose em células de leucemia mielóide aguda (OVESNA *et al.*, 2004), o que determina o potencial citotóxico da molécula **3a/3b**.

## 6 CONCLUSÃO

O composto 3-O-Carboximaleinato (**3a/3b**), derivado da mistura triterpênica  $\alpha$ -,  $\beta$ -amirina, apresentou potente atividade citotóxica e indutora de apoptose decorrente da indução da via extrínseca da apoptose, devido a ativação da caspase iniciadora 8. Além de não exibir potencial genotóxico em CMSPH. Sendo por isso uma molécula potencialmente anticâncer, com seletividade para as células tumorais.



**Figura 24.** Conclusão dos resultados alcançados com o protótipo **3a/3b**.

## 7 REFERÊNCIAS

AHMED, S.A., GOGAL J.R., R.M., WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **J Immunol Methods**. V. 170: 211-224, 1994.

AMSLINGER S; The tunable functionality of alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds enables their differential application in biological systems. **ChemMedChem**; v. 5(3):351-6. 2010.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v.188, p.261-274, 2003.

ANDERSON, D.; YU,T.W.; PHILLIPS, B.J.; SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. **Mutation Research**, 307, 261 - 271, 1994.

ANDERSON, R.D.; BERGER, N.A. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. **Mutation Research**, v.309, p.109–142, 1994.

ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M. V.; JUNIOR, A. P. F.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B.; A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.85, 827. 2006.

ARAGÃO, G. F.; CRISTHIANY, C. P.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B.; Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) march. **J. Herbal Pharmacother.**, v. 7 (2), 31. 2007.

ARENDS JW. Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. **J Pathol**; v.190:412–6. 2000.

ARUR S, UCHE UE, REZAUL K, FONG M, SCRANTON V, COWAN AE, MOHLER W, HAN DK. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Dev Cell**. V. 4(4):587-98. 2003.

BAEHRECKE EH. Autophagy: dual roles in life and death? **Nat Rev Mol Cell Biol.** V.6: 505–510. 2005.

BAEYS, KANG SW, SEO MS, et al. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. **J Biol Chem.** V. 272:217 – 21. 1997.

BAILLY C. Ready for a comeback of natural products in oncology. **Biochem Pharmacol.** V. 77(9):1447-57. 2009.

BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V.; The value of natural products to future pharmaceutical discovery; **Nat. Prod. Rep.**, v. 24, p. 1225-1244; 2005.

BALDUCCI, L. Molecular insight in cancer treatment and prevention. **The Intern. Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p. 1329-1336, 2007.

BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; COSTA, S. M. O.; SANTOS, H. S.; Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **J. Braz. Pharmacog.**, v. 17 (2), 204. 2007.

BARROS, F.W.A., BANDEIRA, P.N., LIMA, D.J.B., MEIRA, A.S., FARIAS, S.S., ALBUQUERQUE, M.R.J.R., SANTOS, H.S., LEMOS, T.L.G., MORAIS, M.O., COSTA-LOTUFO, L.V., PESSOA, C. Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. **Bioorg. Med. Chem.** doi: 10.1016/j.bmc.2010.12.016. 2010.

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

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; ALVES, A. P.; PESSOA, O. D.; CHAVES, J. H.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the Piper species. **J. Appl. Toxicol.**, v. 28, p. 599-607, 2008.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antiproliferative Effects of Two Amides, Piperine and Piplartine, from Piper Species. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 60, p. 539-543, 2005.

BISWAS S, CHIDA AS, RAHMAN I. Redoxmodifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. **Biochem Pharmacol.**; v. 71:551 – 64. 2006.

BORNER C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol Immunol.**;39:615-47. 2003.

BRATTON DL, FADOK VA, RICHTER DA, KAILEY JM, GUTHRIE LA, HENSON PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. **J Biol Chem.** V.17;272(42):26159-65. 1997.

BRENNER C, GRIMM S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. **Oncogene**; v. 25:4744-56. 2006.

BRENNER DE, GESCHER AJ. Cancer chemoprevention: lessons learned and future directions. **Br J Cancer**; 93: 735–739. 2005.

BRÖKER LE, KRUYT FAE, GIACCONE G. Cell death independent of caspases: a review. **Clin Cancer Res.**;11:3155-162. 2005.

BROWN, J.M.; ATTARDI, L.D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nat Rev Cancer.** V. 5(3):231-237. 2005.

BUCHAKJIAN, M.R.; KORNBLUTH, S.; The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. **Nat Rev Mol Cell Biol.** V. 11(10):715-27. 2010.

BUDIARDJO I, OLIVER H, LUTTER M, LUO X, WANG X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol.**;15:269-90. 1999.

BURLINSON, B.; TICE, R. R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S. Y.; COLLINS, A. R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T. S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y. F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. **Mutat. Res.**, v. 627, p. 31-35, 2007.

BUTLER MS. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Nat Prod Rep.** v. (3):475-516. 2008.

CAVALCANTI BC, BEZERRA DP, MAGALHÃES HI, MORAES MO, LIMA MA, SILVEIRA ER, CÂMARA CA, RAO VS, PESSOA C, COSTA-LOTUFO LV; Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells. **J Appl Toxicol.**; v. 7:560-8. 2009.

CAVALCANTI, B.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BURBANO, R.R.; SILVEIRA, E.R.; CUNHA, K.M.A.; RAO, V.S.N.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; HENRIQUES, J.A.P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 388-392, 2006.

CHATURVEDI PK, BHUI K, SHUKLA Y. Lupeol: connotations for chemoprevention. **Cancer Lett**; 263: 1–13, 2008.

CHO YS, PARK SY, SHIN HS, CHAN FK. Physiological consequences of programmed necrosis, an alternative form of cell demise. **Mol Cells**. V.29(4):327-32. 2010.

CHOWDHURY, I.; THARAKAN, B.; BHAT, G. K.; Caspases — An update; Comparative Biochemistry and Physiology Part B: **Biochemistry and Molecular Biology**; v. 151, p. 10-27, 2008.

CLARKE PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anat Embryol (Berl)**; 181: 195–213. 1990.

COHEN GM. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem J**; 326 (Part 1): 1–16. 1997.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. **Mol. Biotechnol.**, v. 26, p. 249-261, 2004.

CONNOLLY JD, HILL RA. Triterpenoids. **Nat Prod Rep**; 25:794–830. 2008.

COSERI, S.; Natural products and their analogues as efficient anticancer drugs. **Mini Rev Med Chem**; v. 9(5):560-71. 2009.

COSTA, P. M.; FERREIRA,P.M.;BOLZANI,V.D.;FURLAN,M.; SANTOSV.A.; CORSINO, J.; DE MORAES, M. O.; COSTALOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicol.Vitro**,v.22,p.854-863,2008.

COSTA-LOTUFO, L. V.; ARAÚJO, E. C. C.; LIMA, M. A. S.; MORAES, M. E. A.; PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; MORAES, M. O. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). **Pharmazie**, v. 58, p. 78-79, 2004.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M.; FARIAS, P. M.; VIANA, G. S.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. Gramosa, N. V.; Rao, V .S. N. The cytotoxic and embriotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffi* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231-1234, 2002.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J.; Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chem Rev**;, v.109(7): 3012-43. 2009.

DANIAL NN, KORSMEYER SJ. Cell death: critical control points. **Cell**. V.116: 205–19. 2004.

DANIAL NN.; BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. **Clin Cancer Res**. V.13(24):7254-63. 2007.

DAVID, A.R.; ZIMMERMAN, M.R.; Cancer: an old disease, a new disease or something in between? **Nat Rev Cancer**. V. 10:728-733. 2010.

DENECKER, G., VERCAMMEN, D., STEEMANS, M., VAN DEN BERGHE, T., BROUCKAERT, G., VAN LOO, G., ZHIVOTOVSKY, B., FIERS, W., GROOTEN, J., DECLERCQ, W., VANDENABEELE, P. Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: Differential role of caspases and mitochondria. **Cell Death Differ**. 8: 829–840, 2001.

DONEPUDI, M. MAC SWEENEY, A. BRIAND, C. GRÜTTER, M. G. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. **Mol Cell** 11: 543–549, 2003.

DRAPER, H.H., HADLEY, M. Malondial dehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol** 186:421-431, 1990.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicology Pathology**, v.35, p.495-516, 2007.

FADEEL B, ORRENIUS S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. **J Intern Med**. (6):479-517. 2005.

FADOK V.A., VOELKER D.R., CAMPBELL P.A., COHEN J.J., BRATTON D.L., HENSON P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J. Immunol.** 148: 2207-2216, 1992.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The Comet Assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, 339, 37 - 59, 1995.

FLEURY C, MIGNOTTE B, VAYSSIÈRE JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. **Biochimie**; v. 84:131 - 41. 2002.

FOLKMAN J, KALLURI R. Cancer without disease. **Nature**. V. 427:787. 2004.

FRUEHAUF, J. P.; MEYSKENS, Jr., F. L.; Reactive Oxygen Species: A Breath of Life or Death?; **Clinical Cancer Research** February; v. 13; 789; 2007.

FUKUDA Y, SAKAI K, MATSUNAGA S, TOKUDA H, TANAKA R. Cancer chemopreventive effect of orally administered lupane-type triterpenoid on ultraviolet light B induced photocarcinogenesis of hairless mouse. **Cancer Lett**; 240:94–101. 2006.

FULDA, S. & K.M. DEBATIN. Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. **Biochim Biophys Acta** 1705: 27-41, 2004.

FULDA, S., JEREMIAS, I., PIETSCH, T., DEBATIN, K. M., Betulinic acid: A new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors, **Klin. Padiatr.**, 211, 319–322, 1999a.

FULDA, S., JEREMIAS, I., STEINER, H. H., PIETSCH, T., DEBATIN, K.M., Betulinic acid: A new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells, **Int. J. Cancer**, 82, 435 – 441, 1999b.

GALLUZZI L, JOZA N, TASDEMIR E, MAIURI MC, HENGARTNER M, ABRAMS JM, TAVERNARAKIS N, PENNINGER J, MADEO F, KROEMER G.. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. **Cell Death Differ**; 15: 1113–1123. 2008.

GARRIDO C, KROEMER G. Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. **Curr Opin Cell Biol**; 16: 639–646. 2004.

GERSHENZON J, DUDAREVA N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nat Chem Biol**; 3:408–414. 2007.

GOLDMAN R, SHIELDS PG. Food mutagens. **J Nutr**. v.133:965S–73S. 2003.

GOTTLIEB RA. Mitochondrial and apoptosis. **Biol Signals Recept.**;10:147-61. 2001.

GREEN DR, KROEMER G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**; 305: 626–629. 2004.

GREEN, D.R.; KROEMER, G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? **The Journal of Clinical Investigation**, v.115, p.2610-2617, 2005.

GRIVICICH I, REGNER A., DA ROCHA A.B.; Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**; 53(3): 335-343. 2007.

GUIMARÃES C.A., LINDEN R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. **Eur J Biochem**. 271(9):1638-50. 2004.

GUO M, ZHANG S, SONG F, WANG D, LIU Z, LIU S. Studies on the non-covalent complexes between oleanolic acid and cyclodextrins using electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J Mass Spectrom**; v. 38: 723–731. 2003.

GUPTA S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Int J Oncol.**;22:15-20. 2003.

GUTIÉRREZ JB AND SALSAMENDI AL.. **Fundamentos de ciência toxicológica**. Diaz de Santos, Madrid, p.155–177. 2001.

HALLIWELL B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role inhuman disease. **AmJMed**; v.91:14-22S. 1991.

HANAHAN D,WEINBERG RA. **The hallmarks of cancer**. Cell; v.100:57-70. 2000.

HARRIS AL. HypoxiaFa key regulatory factor intumour growth. **Nat Rev Cancer**; v. 2:38-47. 2002.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet assay). **Toxicol. Lett.**, v. 90, p. 183-188, 1997.

HARVEY AL. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? **Trends Pharmacol Sci.** v. 20(5):196-8. 1999.

HARVEY AL. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today.** V. (19-20):894-901. 2008.

HECHT SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. **J Natl Cancer Inst.** V. 91:1194–2210. 1999.

HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature.**;407:770-76. 2000.

HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature**; v. 407: 770–6. 2000.

HENRIQUEZ M, ARMISÉN R, STUTZIN A, QUEST AF. Cell death by necrosis, a regulated way to go. **Curr Mol Med.** V.8(3):187-206. 2008.

HOERNLEIN RF, ORLIKOWSKY T, ZEHRER C, NIETHAMMER D, SAILER ER, SIMMET T, DANNECKER GE, AMMON HP. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I. **J Pharmacol Exp Ther.** V. 288(2):613-9. 1999.

HU W., KAVANAGH J. J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. **Lancet Oncol.**, v. 4, 721—729 2003.

INOUE M, SATO EF, NISHIKAWA M, et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Curr Med Chem**; v. 10:2495 - 505. 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2010 – Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 98p., 2009.

JÄGER S, WINKLER K, PFÜLLER U, SCHEFFLER A. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L. **Planta Med**; v.73: 157–162. 2007.

KAMATA H, HIRATA H. Redox regulation of cellular signalling. **Cell Signal**; v. 11:1 - 14. 1999.

KANG HS, PARK JE, LEE YJ, CHANG IS, CHUNG YI, TAE G. Preparation of liposomes containing oleanolic acid via micelle-to-vesicle transition. **J Nanosci Nanotechnol**; v. 7: 3944–3948. 2007.

KERR, JF, WYLLIE, AH, CURRIE, AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**. 26: 239-257, 1972.

KHANNA, K.K.; JACKSON, S.P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nat. Genet.**, v. 27, p. 247–254, 2001.

KIERAN MW, FOLKMAN J, HEYMACH J. Angiogenesis inhibitors and hypoxia. **NatMed**;v. 9:822-3. 2003.

KIM SS, WON SJ, KIM NJ, YOO JK, BAE K, LEE KT. 3-Oxoolean-12-en-27-oic acid isolated from *Aceriphyllum rossii* induces caspase-8-dependent apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Biol Pharm Bull**. V. 32(1):91-8. 2009.

KINGSTON, D. G. A natural love of natural products.. **J. Org. Chem.**, v. 73, 3975. 2008.

KINNULAVL, CRAPO JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. **Free Radic Biol Med.**; v. 36:718-44. 2004.

KNOWLES & SELBY. **Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer**, 4<sup>th</sup> ed., Oxford University Press Inc., New York, 532p., 2005.

KO, H.-H; HUNG, C.-F.; WANG, J.-P; LIN, C.-N. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*; **Phytochemistry**; 2007.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T.; The Evolving Role of Natural Products in Drug Discovery; **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, No. 3. p. 206-220. 2005.

KROEMER G, GALLUZZI L, VANDENABEELE P, ABRAMS J, ALNEMRI ES, BAEHRECKE EH, BLAGOSKLONNY MV, EL-DEIRY WS, GOLSTEIN P, GREEN DR, HENGARTNER M, KNIGHT RA, KUMAR S, LIPTON SA, MALORNI W, NUÑEZ G, PETER ME, TSCHOPP J, YUAN J, PIACENTINI M, ZHIVOTOVSKY B, MELINO G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**. V. 1:3-11. 2009.

KROEMER G. & REED J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nat. Med**. 6: 513–519, 2000.

KROEMER, G.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M.E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKLONNY, M.V.; MALORNI, W.;

KNIGHT, R.A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death and Differentiation**, v.12, p. 1463-1467, 2005.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. **Cancer Cell**, v. 13, p. 472-482, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Pathology Basis of Disease**, 7<sup>th</sup> edn., WB Saunders, China, 1552p., 2004.

KUZMINOV, A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 8241-8246, 2001.

KWON SH, PARK HY, KIM JY, JEONG IY, LEE MK, SEO KI. Apoptotic action of ursolic acid isolated from Corni fructus in RC-58T/h/SA#4 primary human prostate cancer cells. **Bioorg Med Chem Lett**. V.20(22):6435-8. 2010.

LASZCZYK M, JÄGER S, SIMON-HAARHAUS B, SCHEFFLER A, SCHEMPF CM. Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (betulae cortex). **Planta Med**; v. 72: 1389–1395. 2006.

LASZCZYK, M.N.; Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy. **Planta Med**; v. 75(15), p. 1549-1560. 2009.

LE BRAS M., CLEMENTMV, PERVAIZ S, BRENNER C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. **Histol Histopathol.**; v .20:205-19. 2005.

LEBEL, C. P., ISCHIROPOULOS, H., BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.** 5: 227-231, 1992.

LEE, K. H.; Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. **J. Nat. Prod.**, v. 73(3), 500. 2010.

LI, J. W. –H.; VEDERAS, J. C.; Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier?; **Science**, v. 325, p.161-165, 2009.

LIANG C, DING Y, NGUYEN HT, KIM JA, BOO HJ, KANG HK, NGUYEN MC, KIM YH. Oleanane-type triterpenoids from *Panax stipuleanatus* and their anticancer activities. **Bioorg Med Chem Lett.** V. 1;20(23):7110-5. 2010

LIBY KT, YORE MM, SPORN MB. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. **Nat Rev Cancer**; 7:357–369. 2007.

LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; OLIVEIRA, F.A; GURGEL, L.A.; CAVALVANTE, I.J.M.; SANTOS, K.A; CAMPOS D.A.; VALE, C.A.L.; SILVA, R.M.; CHAVES, M.H.; RAO, V.S.N.; SANTOS, F.A.; Attenuation of Visceral Nociception by  $\alpha$ - and  $\beta$ -Amyrin, a Triterpenoid Mixture Isolated from the Resin of *Protium heptaphyllum*, in Mice. **Planta Med.** V.72(1), p. 34-39, 2006.

LINNANE AW, EASTWOOD H. Cellular redox regulation and prooxidant signaling systems: a new perspective on the free radical theory of aging. **Ann N Y Acad Sci**;v.1067:47-55. 2006.

LOEFFLER M, KREMER G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Exp Cellular Res.**;256:19-26. 2000.

LOURO, I.D., LLERENA JR, J.C., VIEIRA DE MELO, M.S., ASHTON-PROLLA, P., CONFORTI-FRÓES, N. **Genética Molecular do Câncer**. 1ª. ed.. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

LUO, J.; SOLIMINI, L.; ELLEDGE, S.J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, v.136, p. 823-837, 2009.

MACKLIS, J. D.; MADISON R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **J. Neurosci. Methods**, v. 31, p. 43-46, 1990.

MALINI MM, LENIN M, VARALAKSHMI P. Protective effect of triterpenes on calcium oxalate crystal-induced peroxidative changes in experimental urolithiasis. **Pharmacol Res.** V. 41: 413–418. 2000.

MARTELLI AM, ZWEYER M, OCHS RL, TAZZARI PL, TABELLINI G, NARDUCCI P, BORTUL R. Nuclear apoptotic changes: an overview. **J Cell Biochem.**;82(4):634-46. 2001.

MARTIN, S.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; MCGAHON, A.J.; RADER, J.A.; VAN SCHIE, R.C.A.A.; LAFACE, D.M.; GREEN, D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and abl. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 1545-1556, 1995.

MATSUMURA Y, ANANTHASWAMY HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicol Appl Pharmacol.** V.195:298–308. 2004.

MEHMET, H. Apoptosis: caspase Wnds a new place to hide. **Nature**, v. 403, p. 29 – 30, 2002.

MELINO G. The Sirens' song. **Nature**; 412: 23. 2001

MELLIER, G.; HUANG, S.; SHENOY, K.; PERVAIZ, S. TRAILing death in cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v.31, p.93-102, 2010.

MELO, C.M.; CARVALHO, K.M.M.B.; NEVES, J.C.S.; MORAIS, T.C. RAO, V.S.N.; SANTOS, F.A.; BRITO, G.A.C.; CHAVES, M.H.  $\alpha,\beta$ -amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. **World J Gastroenterol.** V.16(34), p. 4272-4280, 2010.

MERLO LM, PEPPER JW, REID BJ, MALEY CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nat Rev Cancer.** V. 6(12):924-35. 2006.

MEYSKENS FL, JR., FARMER P, FRUEHAUFJP. Redox regulation in human melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Res**;v. 14:148-54. 2001.

MEYSKENS FL, SZABO E. Diet and cancer: the disconnect between epidemiology and randomized clinical trials.**CancerEpidemiolBiomarkersPrev.** v. 14:1366-9. 2005.

MILITAO, G. C. G.; DANTAS, I. N. F.; PESSOA, C.; FALCÃO, M. J. C.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; CURI, R.; LIMA, T.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Induction of apoptosis by pterocarpan from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sci.**, v. 78, p. 2409-2417, 2006.

MONTENEGRO RC, ARAÚJO AJ, MOLINA MT, MARINHO FILHO JD, ROCHA DD, LOPÉZ-MONTERO E, GOULART MO, BENTO ES, ALVES AP, PESSOA C, DE MORAES MO, COSTA-LOTUFO LV. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special

emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. **Chemico-Biological Interactions** v.184 p:439–448. 2010.

MORROW JK, TIAN L, ZHANG S; Molecular networks in drug discovery. **Crit Rev Biomed Eng.** V. 38(2):143-56; 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983.

NAGANE, M.; HUANG, H.-J.S.; CAVENEE, W.K. The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. **Apoptosis**, v.6, p.191-197, 2001.

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

NEWMAN, D.; CRAGG, G.; KINGSTON, D. *In: The Practice of Medicinal Chemistry* (ed. Wermuth, C. G.) 91–109 Academic, London, 2003.

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

O'CONNOR R, CLYNES M, DOWLING P, O'DONOVAN N, O'DRISCOLL L. Drug resistance in cancer - searching for mechanisms, markers and therapeutic agents. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.** V. (6):805-17. 2007.

OLIVEIRA, A.P.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ P. L.F.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. **An Acad Bras Cienc** 79 (4). 2007.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JR, H. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORÊNCIO, M. G.; LIMA-JR, R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N.; Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacol. Res.**, v. 49, 105. 2004.

ORMEROD, M. G. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v.265, p.73–80, 2002.

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

OVESNA Z, VACHALKOVA A, HORVATHOVA K, TOTHOVA D. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. **Minireview. Neoplasma**; 51: 327–333, 2004.

OVESNA Z., VACHALKOVA A., HORVATHOVA K., TOTHOVA D., Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. Minireview. **Neoplasma**, v. 51,327—333. 2004.

PATHAK AK, BHUTANI M, NAIR AS, AHN KS, CHAKRABORTY A, KADARA H, GUHA S, SETHI G, AGGARWAL BB.. Ursolic acid inhibits STAT3 activation pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human multiple myeloma cells. **Mol Cancer Res**; 5:943–955. 2007.

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

PESSOA,C.; SILVEIRA,E.R.; LEMOS,T.L.; WETMORE,L.A.; MORAES,M.O.; LEYVA, A. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil. **Phytother.Res.**,v.14,p.187191,2000.

PETROS AM, OLEJNICZAK ET, FESIK SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim Biophys Acta.**;1644:83-94. 2004.

PISHA, E., CHAI, H., LEE, I. S., CHAGWEDERA, T. E. et al., Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis, **Nat. Medc**, 1, 1046–1051, 1995.

POUYSSSEGUR J, DAYAN F, MAZURE NM. Hypoxia signaling in cancer and approaches to enforce tumour regression. **Nature**; v. 441:437-43. 2006.

PRASAD S, KALRA N, SINGH M, SHUKLA Y. Protective effects of lupeol and mango extract against androgen induced oxidative stress in Swiss albino mice. **Asian J Androl.**; v. 10: 313–318. 2008.

PROSKURYAKOV, S.Y., KONOPLYANNIKOV A.G., GABAI, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Exp. Cell Res.** 283: 1-16, 2003.

QIAN, K., NAKAGAWA-GOTO, K., YU, D., MORRIS-NATSCHKE, S. L., NITZ, T. J., KILGORE, N., ALLAWAY, G. P. AND LEE, K. H. Anti-AIDS agents 73: structure-activity

relationship study and asymmetric synthesis of 3-O-monomethylsuccinyl-betulinic acid derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** V.17, 6553– 6557, 2007.

RAMACHANDRAN S, PRASAD NR. Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. **Chem Biol Interact.**; v. 176: 99–107. 2008.

RAMACHANDRAN, S.; PRASAD, N.R.; Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 176, p. 99-107, 2008.

REED, J.C. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. **TRENDS in Molecular Medicine**, v.7, p.314-319, 2001.

REED, J.C. Mechanisms of Apoptosis. **American Journal of Pathology**, v.157, p.1415-1430, 2000.

RICCI, M.S.; ZONG, W.X. Chemotherapeutic for Targeting Cell Death Pathways. **The Oncologist**, v.11, p.342-357, 2006.

RIEGER, P.T. The Biology of Cancer Genetics. **Seminars in Oncology Nursing**, v.20, p.145-154, 2004.

ROH, E.M.; JIN, Q.; JIN, H.G.; SHIN, J.E; CHOI, E.J.; MOON, Y.H.; WOO, E.R.; Structural implication in cytotoxic effects of sterols from *Sellaginella tamariscina*. **Arch Pharm Res**; v. 33(9):1347-53. 2010;.

SALEEM M, AFAQ F, ADHAMI VM, MUKHTAR H. Lupeol modulates NF-kappaB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. **Oncogene**; 23:5203–5214. 2004.

SALGALLER, M.L. & LODGER, P.A. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. **J Surg Oncol.** N. 68: 122-138, 1998.

SÁNCHEZ M, MAZZUCA M, VELOSO MJ, FERNÁNDEZ LR, SILESS G, PURICELLI L, PALERMO JA. Cytotoxic terpenoids from *Nardophyllum bryoides*. **Phytochemistry**. V.71(11-12):1395-9. 2010.

SELZER, E., PIMENTEL, E., WACHECK, V., SCHLEGEL, W., et al. Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells, **J. Invest. Dermatol.**, 114, 935–940, 2000.

SEN CK. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. **CurrTop Cell Regul.** V. 36:1-30. 2000.

SETZER WN, SETZER MC. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. **Mini Rev Med Chem**; 3:540–556. 2003.

SHANG, T.; TAN, D. S.; Advancing chemistry and biology through diversity-oriented synthesis of natural product-like libraries; **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p.248-258, 2005.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; **Genética Toxicologia**. Porto Alegre, Alcance, 422p., 2003.

SINGH, B.; DUBEY, M. M.; Estimation of Triterpenoids from *Heliotropium marifolium* Koen. ex Retz. *In vivo* and *In vitro*. I. Antimicrobial Screening. **Phytotherapy Research**; v. 15, p.231-234. 2001.

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

SOLDI C, PIZZOLATTI MG, LUIZ AP, MARCON R, MEOTTI FC, MIOTO LA, SANTOS AR. Synthetic derivatives of the alpha- and beta-amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. **Bioorg Med Chem.** V. 16(6):3377-86. 2008.

SOUZA, M.V.N.; PINHEIRO, A.C.; FERREIRA, M.L.; GONÇALVES, R.S.B.; LIMA, C.H.C. Natural Products in Advance Clinical Trials Applied to Câncer. **Revista Fitos** 3: 25-41, 2007.

STRÜH C, JÄGER S, SCHEMPP CM, SCHEFFLER A, MARTIN SF. Solubilized triterpenes from mistletoe show anti-tumor effects on skin-derived celllines. **Planta Med**; v. 74: 1130. 2008.

SUDHAHAR V, ASHOK KUMAR S, VARALAKSHMI P, SUJATHA V. Protective effect of lupeol and lupeol linoleate in hypercholesterolemia associated renal damage. **Mol Cell Biochem**; v. 317: 11–20. 2008.

SUDHARSAN PT, MYTHILI Y, SELVAKUMAR E, VARALAKSHMI P. Cardioprotective effect of pentacyclic triterpene, lupeol and its ester on cyclophosphamide-induced oxidative stress. **Hum Exp Toxicol**; v. 24: 313–318. 2005.

SULTANA S, SALEEM M, SHARMA S, KHAN N. Lupeol, a triterpene, prevents free radical mediated macromolecular damage and alleviates benzoyl peroxide induced biochemical alterations in murine skin. **Indian J Exp Biol**; 41: 827–831. 2003.

SUNDARESAN M, YU ZX, FERRANS VJ, IRANI K, FINKEL T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. **Science**. V. 270 :296 - 9. 1995.

THANNICKAL VJ, FANBURG BL. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. V. 279:L1005-28. 2000.

THAO NT, HUNG TM, LEE MK, KIM JC, MIN BS, BAE K. Triterpenoids from *Camellia japonica* and their cytotoxic activity. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**. V. 58(1):121-4. 2010.

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

TROSKO JE. The role of stem cells and gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biomed Pharmacother**; v. 59. (Suppl. 2): 326–331. 2005.

UEDA S, MASUTANI H, NAKAMURA H, TANAKA T, UENOM, YODOI J. Redox control of cell death. **Antioxid Redox Signal**; v. 4:405-14. 2002.

UKIYA M, KIKUCHI T, TOKUDA H, TABATA K, KIMURA Y, ARAI T, EZAKI Y, OSETO O, SUZUKI T, AKIHISA T. Antitumor-promoting effects and cytotoxic activities of dammar resin triterpenoids and their derivatives. **Chem Biodivers**. V. 7(8):1871-84. 2010.

URECH K, SCHER JM, HOSTANSKA K, BECKER H. Apoptosis inducing activity of viscin, a lipophilic extract from *Viscum album* L. **J Pharm Pharmacol**. V.57(1):101-9. 2005.

VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M, MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact.** v.160: 1 - 40. Epub 2006.

VAN LOO G., DEMOL H., VAN GURP M., HOORELBEKE B., SCHOTTE P., BEYAERT R., ZHIVOTOVSKY B., GEVAERT K., DECLERCQ W., VAND J. A matrix-assisted laser desorption ionization post-source decay (MALDI-PSD) analysis of proteins released from isolated liver mitochondria treated with recombinant truncated Bid. **Cell Death Diff.** 9: 301-308, 2002.

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

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **J. Immunol. Methods**, v.243, p.167-190, 2000.

VIDYA L, MALINI MM, VARALAKSHMI P. Effect of pentacyclic triterpenes on oxalate-induced changes in rat erythrocytes. **Pharmacol Res;** v. 42: 313–316. 2000.

VINEIS P, SCHATZKIN A, POTTER JD. Models of carcinogenesis: an overview. **Carcinogenesis.** V. 31(10):1703-9. 2010.

WEINBERG, R.A. **A Biologia do Câncer.** Artmed, Porto Alegre, 864p., 2008.

WETZEL EB, GREEN DR. Apoptosis: chekpoint at the mitochondria frontier. **Mut Res.**;434:243-51. 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Up to 40% of cancer cases could be prevented.** Information for the media Disponível em: < <http://www.euro.who.int/en/>>. Acesso em: 21 de Nov. 2010.

YAN SL, HUANG CY, WU ST, YIN MC. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. **Toxicol In Vitro.**v. 24(3):842-8. 2010.

YANG MY, CHUANG H, CHEN RF, YANG KD. Reversible phosphatidylserine expression on blood granulocytes related to membrane perturbation but not DNA strand breaks. **J Leukoc Biol;** 71: 231–237. 2002.

YANG, H.; DOU Q.P. Targeting apoptosis pathway with natural terpenoids: implications for treatment of breast and prostate cancer. **Curr Drug Targets**. V.1;11(6):733-44, 2010.

ZHENG QF, SUN HX, HE QJ, YE YP. Induction of apoptosis in HeLa cells by 3beta-hydroxyurs-12-en-27-oic acid. **Chem Biodivers**. V.(7):742-53. 2006.

ZHOU D, JIN H, LIN HB, YANG XM, CHENG YF, DENG FJ, XU JP. Antidepressant effect of the extracts from Fructus Akebiae. **Pharmacol Biochem Behav.**; v.94(3):488-95, 2010.

ZHOU, H., XIE, X., TANG, Y. Engineering Natural Products Using Combinatorial Biosynthesis and Biocatalysis. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 19, 590-596, 2008.

ZIMMERMANN K.C.; BONZON C.; GREEN DR. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics** 92: 57-70, 2001.

ZONG, W.X. & THOMPSON, C.B. Necrotic death as a cell fate. **GenesDev**. 20: 1-15, 2006.

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

## **8 ANEXOS**

### **8.1 ANEXO I – ARTIGO: AMYRIN ESTERS INDUCE CELL DEATH BY APOPTOSIS IN HL-60 LEUKEMIA CELLS**



Contents lists available at ScienceDirect

## Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bmc](http://www.elsevier.com/locate/bmc)

## Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells

Francisco W. A. Barros<sup>a</sup>, Paulo N. Bandeira<sup>b</sup>, Daisy J. B. Lima<sup>a</sup>, Assuero S. Meira<sup>a</sup>, Silvana S. de Farias<sup>b</sup>, Maria Rose J. R. Albuquerque<sup>b</sup>, Hécio S. dos Santos<sup>b</sup>, Telma L. G. Lemos<sup>c</sup>, Manoel Odorico de Morais<sup>a</sup>, Letícia Veras Costa-Lotufo<sup>a</sup>, Claudia do Ó Pessoa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará 60430-270, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Organic Chemistry, State University Vale do Acaraú, Sobral, Ceará 62040-370, Brazil

<sup>c</sup> Department of Organic and Inorganic Chemistry, Ceara Federal University, Fortaleza, Ceará 60431-970, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 September 2010

Revised 29 November 2010

Accepted 4 December 2010

Available online 9 December 2010

#### Keywords:

*Protium heptaphyllum*

Derivatives of  $\alpha,\beta$ -amyrin

Cytotoxic activity

Apoptosis

### ABSTRACT

Four derivatives of an  $\alpha,\beta$ -amyrin mixture were synthesized by acylation with appropriate anhydrides. The structures of the compounds were confirmed by means of IR and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR. The compounds were screened for cytotoxic activity using four human tumor cell lines (HL-60, MDAMB-435, SF-295 and HCT-8) and normal peripheral blood mononuclear cells (PBMC). 3-O-Carboxymaleinate of  $\alpha,\beta$ -amyrin (**3a/3b**) were found to be the only active compounds of the series (high cytotoxicity), showing IC<sub>50</sub> values ranging from 1.8 to 3  $\mu$ M. In PBMC, **3a/3b** were not toxic, suggesting selectivity for tumor cells. To better understand the mechanism of action involved in the cytotoxicity of **3a/3b**, HL-60 cells treated with **3a/3b** were examined for morphological changes, DNA fragmentation, cell cycle perturbation, externalization of phosphatidylserine and activation of caspases 3/7, with doxorubicin serving as the positive control. The results indicate that the cytotoxicity of **3a/3b** involves the induction of cell death by apoptosis.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Triterpenoids are compounds that have attracted much interest because of their structural diversity and the discovery of a broad spectrum of pharmacological activities, such as anti-inflammatory, gastroprotective, antimicrobial, antinociceptive, antioxidant, analgesic, anticancerogenic, cytotoxic and antidepressive effects.<sup>1–11</sup> In the last ten years, a large number of synthetic derivatives of natural triterpenoids have contributed significantly to the pharmacological study of these compounds.<sup>12,13</sup>

In this respect, the pentacyclic triterpenes  $\alpha,\beta$ -amyrin, naturally occurring in many species, especially in the resin of species of *Protium*, possess anti-inflammatory, gastroprotective, antinociceptive, antidepressant, antiplatelet and analgesic activities.<sup>6,9,10,14</sup> Studies on *Protium heptaphyllum* resin showed that it also has anti-inflammatory, gastroprotective, anti-allergic and antinociceptive properties. These and other biological effects have been attributed to the presence of pentacyclic triterpenes, especially  $\alpha,\beta$ -amyrin.<sup>14,15</sup>

The triterpenoid mixture known as  $\alpha,\beta$ -amyrin has a basic skeleton of the ursan and olean type, respectively. Whose main difference is in the position of the methyl group in the E ring located at C-20. Its structural similarity with steroidal drugs may explain its broad pharmacological activity.<sup>14</sup> Although the pentacyclic

triterpenes  $\alpha,\beta$ -amyrin have weak anticancer activity, many other triterpene compounds, in contrast, have shown strong cytotoxic effects against various human tumor cells.<sup>11</sup> Investigations of the cytotoxic effects of these compounds have been conducted, and studies show that this effect is related to the induction of apoptosis.<sup>11,16,17</sup>

Taking into account that small changes in a molecule can significantly alter its pharmacological activity,<sup>18</sup> the objective of this work was the synthesis of new derivatives of  $\alpha,\beta$ -amyrin, specifically esters modified at C-3 of the A ring, and evaluation of their cytotoxic activities against four human cancer cell lines and mononuclear cells from human peripheral blood (PBMC), used as a model of normal cells

### 2. Results and discussion

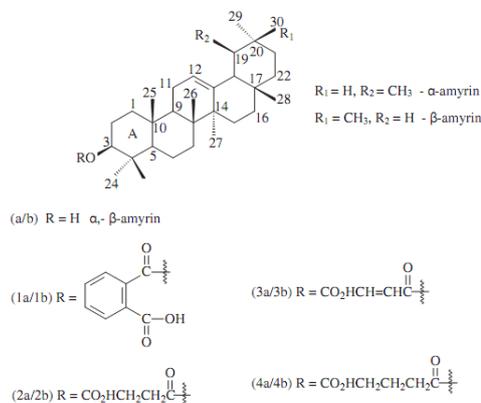
#### 2.1. Chemistry

In order, to obtain derivatives **1a/1b**, **2a/2b**, **3a/3b** and **4a/4b**, the  $\alpha,\beta$ -amyrin (**a/b**) mixture was isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*.<sup>19</sup> The synthesis of the derivatives is outlined in Figure 1.

#### 2.1.1. Isolation and structural elucidation of the mixture of $\alpha$ - and $\beta$ -amyrin (**a/b**)

The mixture of triterpenoid  $\alpha,\beta$ -amyrin (**a/b**) was isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*<sup>19</sup> and analyzed by <sup>1</sup>H NMR,

\* Corresponding author at present address: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, PO Box 3157, 60430-270 Fortaleza, Ceará, Brazil. Tel.: +55 85 3366 8341; fax: +55 85 3366 8333. E-mail address: [cpessoa@ufc.br](mailto:cpessoa@ufc.br) (Claudia do Ó Pessoa).



**Figure 1.** Derivatives of  $\alpha,\beta$ -amyrin: (1a/1b) phthalic anhydride, py, reflux (50 °C), ethyl ether, 8 h. (2a/2b) succinic anhydride, DMAP, reflux (50 °C),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 8 h. (3a/3b) maleic anhydride, reflux (50 °C),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 8 h. (4a/4b) glutaric anhydride, DMAP, reflux (50 °C),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 8 h.

enabling the determination of a 2:1 ratio, respectively. The structure elucidation was based on spectral data (IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR). The IR spectra showed mainly absorptions bands at  $3307\text{ cm}^{-1}$  assigned to hydroxyl group (OH) and  $1460$ – $1383\text{ cm}^{-1}$  characteristics of  $\text{C}=\text{C}$ . In the  $^1\text{H}$  NMR spectra of **a/b**,  $\delta$  0.80–2.10 ppm (characteristic profile of the  $\alpha,\beta$ -amyrin). H-3 appears as a double–doublet at  $\delta = 3.22$  ppm with  $^3J = 10.4$  and 5.0 Hz of the  $\alpha$ -amyrin and as a double–doublet at  $\delta = 3.23$  with  $^3J = 10.4$  and 5.0 Hz of the  $\beta$ -amyrin. H-12 appears as a triplet at  $\delta = 5.10$  ppm with  $^3J = 3.6$  Hz of the  $\alpha$ -amyrin and  $\delta = 5.10$  ppm with  $^3J = 3.6$  Hz of the  $\beta$ -amyrin. In the  $^{13}\text{C}$  NMR, the signal for C-3 is at  $\delta = 79.1$  ppm, while C-12 appears at  $\delta = 124.4$  ppm of the  $\alpha$ -amyrin and  $\delta = 21.7$  ppm of the  $\beta$ -amyrin and C-13 appears at  $\delta = 139.6$  ppm of the  $\alpha$ -amyrin and  $\delta = 145.2$  ppm of the  $\beta$ -amyrin.

### 2.1.2. Structural elucidation of the $\alpha,\beta$ -amyrin derivatives

The IR spectra of the mixture **1a/1b** showed one absorption band at  $1701\text{ cm}^{-1}$  assigned to ( $\text{C}=\text{O}$ ) of esters, typical absorption band of (OH) of acids, and absorption bands between  $1583$  and  $1404\text{ cm}^{-1}$  of ( $\text{C}=\text{C}$ ) of the aromatic ring.

In the  $^1\text{H}$  NMR spectra of **1a/1b**,  $\delta$  0.80–2.10 ppm (characteristic profile of the substrate), H-3 appears as a double–doublet at  $\delta = 4.77$  ppm with  $^3J = 8.1$  and 3.5 Hz and H-12 as a triplet at  $\delta = 5.13$  ppm of the  $\alpha$ -amyrin derivative and  $\delta = 5.19$  ppm of the  $\beta$ -amyrin derivative with  $^3J = 3.6$  Hz. Signals for aromatic hydrogen were identified at  $\delta$  7.27–7.88. In the  $^{13}\text{C}$  NMR, the signal for C-3 is at  $\delta = 83.3$  ppm, while C-12 appears at  $\delta = 124.5$  ppm of the  $\alpha$ -amyrin derivative and  $\delta = 121.9$  ppm of the  $\beta$ -amyrin derivative, C-13 appears at  $\delta = 139.8$  ppm of the  $\alpha$ -amyrin derivative and  $\delta = 145.4$  of the  $\beta$ -amyrin derivative. Signals for aromatic carbon are in the range of  $\delta$  129.1–133.4 ppm. The  $\text{C}=\text{O}$  carbon atoms appear at  $\delta = 168.1$  ppm for esters and  $\delta = 172.1$  for acids. MS (70 eV)  $m/z$  (%) 574 (37,  $\text{M}^+$ ), 573.39 (100).

Analysis of the IR spectra of **2a/2b** allowed absorption bands for ( $\text{C}=\text{O}$ ) of esters at  $1715\text{ cm}^{-1}$  and for ( $\text{C}=\text{O}$ ) of acids at  $1731\text{ cm}^{-1}$ , one absorption band at  $2925\text{ cm}^{-1}$  identified as the (OH) of acids and absorption bands between  $1633$  and  $1376\text{ cm}^{-1}$  of ( $\text{C}=\text{C}$ ), characteristic of alkenes.

In the  $^1\text{H}$  NMR spectra of **2a/2b**,  $\delta$  0.80–2.10 ppm (characteristic profile of the substrate), H-3 appears as a double–doublet at  $\delta = 4.54$  ppm and H-12 as a triplet at  $\delta = 5.13$  ppm of the  $\alpha$ -amyrin

derivative and  $\delta = 5.21$  ppm of the  $\beta$ -amyrin derivative. Signal for H-1' is at  $\delta = 2.69$  ppm as doublet with  $^3J = 5.65$  Hz and H-2' at  $\delta = 2.64$  ppm as doublet with  $^3J = 5.85$  Hz. In the  $^{13}\text{C}$  NMR, the signal for C-3 is at  $\delta = 81.8$  ppm, while C-12 appears at  $\delta = 124.5$  ppm of the  $\alpha$ -amyrin derivative and  $\delta = 121.8$  ppm of the  $\beta$ -amyrin derivative, C-13 appears at  $\delta = 139.9$  ppm of the  $\alpha$ -amyrin derivative and  $\delta = 145.4$  ppm of the  $\beta$ -amyrin derivative. Signal for H-1' is at  $\delta = 2.69$  ppm as doublet with  $^3J = 5.65$  Hz and H-2' at  $\delta = 2.64$  ppm as doublet with  $^3J = 5.85$  Hz. The  $\text{C}=\text{O}$  carbon atoms appear at  $\delta = 172.0$  ppm for esters and  $\delta = 168.1$  ppm for acids. MS (70 eV)  $m/z$  (%) 526 (44,  $\text{M}^+$ ), 525.39 (100), 325.19 (12).

In the  $^1\text{H}$  NMR spectra of **3a/3b**,  $\delta$  0.80–2.10 ppm (characteristic profile of the substrate), H-3 appears as a double–doublet at  $\delta = 4.69$  ppm and H-12 as a triplet at  $\delta = 5.14$  ppm of the  $\alpha$ -amyrin derivative and  $\delta = 5.20$  ppm of the  $\beta$ -amyrin derivative. H-1' appear as a doublet at  $\delta = 6.39$  ppm with  $^3J = 12.8$  Hz and H-2' as a doublet at  $\delta = 6.46$  ppm with  $^3J = 12.8$  Hz, which agrees with a *trans*-configuration. In the  $^{13}\text{C}$  NMR, the signal for C-3 is at  $\delta = \delta = 85.3$  ppm, while C-12 appears at  $\delta = 124.3$  ppm of the  $\alpha$ -amyrin derivative and  $\delta = 121.7$  ppm of the  $\beta$ -amyrin derivative, C-13 at  $\delta = 139.9$  ppm of the  $\alpha$ -amyrin derivative and  $\delta = 145.5$  ppm of the  $\beta$ -amyrin derivative. The signal for C-1' is at  $\delta = 136.9$  ppm and for C-2' at  $\delta = 129.9$  ppm. The  $\text{C}=\text{O}$  carbon atoms appear at  $\delta = 164.6$  ppm for esters and  $\delta = 167.9$  for acids. MS (70 eV)  $m/z$  (%) 524 (37,  $\text{M}^+$ ), 523.37 (100).

The IR spectra of **4a/4b** showed the expected absorption band for ( $\text{C}=\text{O}$ ) of esters at  $1727\text{ cm}^{-1}$ , and also showed an absorption band at  $3461\text{ cm}^{-1}$  corresponding to (OH) of acids. In the  $^1\text{H}$  NMR spectra of **4a/4b**,  $\delta$  0.80–2.10 ppm (characteristic profile of the substrate), H-3 appears as a double–doublet at  $\delta = 4.52$  ppm and H-12 as a triplet at  $\delta = 5.13$  ppm of the  $\alpha$ -amyrin derivative and  $\delta = 5.21$  ppm of the  $\beta$ -amyrin derivative. The signals of H-1' and H-3' appear as a double–triplet at  $\delta = 2.44$  and 2.41 ppm with  $^3J = 7.40$  Hz and 7.45 Hz respectively and H-2' as multiplet at  $\delta = 1.98$  ppm. In the  $^{13}\text{C}$  NMR, the signal for C-3 is at  $\delta = 81.4$  ppm, while C-12 appears at  $\delta = 124.5$  of the  $\alpha$ -amyrin derivative and  $\delta = 121.8$  ppm of the  $\beta$ -amyrin derivative, C-13 at  $\delta = 139.8$  ppm of the  $\alpha$ -amyrin derivative and  $\delta = 145.4$  ppm of the  $\beta$ -amyrin derivative. Signals for C-1', C-2' and C-3' are at  $\delta = 33.2$ , 20.2 and 33.87 ppm, respectively. The  $\text{C}=\text{O}$  carbon atoms appear at  $\delta = 172.9$  ppm for esters and  $\delta = 178.7$  ppm for acids. MS (70 eV)  $m/z$  (%) 540.41 (37,  $\text{M}^+$ ), 539.41 (100), 339.19 (12). Analysis of DEPT -  $135^\circ$  and 2D-heteronuclear NMR spectra (HSQC and HMBC) provided the final structural elucidation of compounds **1a/1b**, **2a/2b**, **3a/3b** and **4a/4b**.

### 2.2. Cytotoxic activity of $\alpha,\beta$ -amyrin derivatives

The cytotoxic activity of  $\alpha,\beta$ -amyrin derivatives was determined by the MTT assay using four human tumor cell lines (HL-60, MDAMB-435, SF-295 and HCT-8). The results after 72 h of incubation (Table 1) show that only the derivatives **3a/3b** were cytotoxic against the cell lines used. The derivatives **3a/3b** showed  $\text{IC}_{50}$  values ranging from 0.94 (1.8  $\mu\text{M}$ ) to 1.84  $\mu\text{g/mL}$  (3.0  $\mu\text{M}$ ). From a structure–activity point of view, the high cytotoxicity of **3a/3b** can be attributed to the presence of the double bond in the maleinate group attached to carbon 3 of the A ring, which is absent in the other derivatives lacking cytotoxicity. Chemically, the presence of the double bond between carbons C-1' and C-2' in the acyl group of the derivatives **3a/3b** generates an electron-rich center likely to interact with centers of low electron density. Furthermore, this double bond is in a conjugated system susceptible to resonance that can create positive and negative centers partially able to promote chemical interactions with centers rich or deficient in electrons, which is not observed in the acyl groups of other derivatives (without activity). In fact, many studies have shown a

**Table 1**  
Cytotoxic effect of derivatives of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin on human tumor cell lines and peripheral blood mononuclear cells

Compound	IC <sub>50</sub> $\mu\text{g}/\text{mL}^{\text{a}}$ ( $\mu\text{M}$ )				
	HL-60	MDAMB-435	SF-295	HCT-8	PBMC
<b>1a/1b</b>	>5 (8.5)	>5	>5	>5	>5
<b>2a/2b</b>	>5 (9.2)	>5	>5	>5	>5
<b>3a/3b</b>	0.94 (1.8) 0.72–1.22	1.52 (2.9) 1.33–1.73	1.84 (3.5) 1.53–2.21	1.58 (3.0) 1.33–1.88	>5 (9.5)
<b>4a/4b</b>	>5 (9.2)	>5	>5	>5	>5
Dox <sup>b</sup>	0.02 (0.03) 0.01–0.02	0.48 (0.8) 0.34–0.66	0.24 (0.4) 0.17–0.36	0.01 (0.02) 0.01–0.02	0.97 (1.7) 0.52–1.80

<sup>a</sup> Concentration able to inhibit 50% of cell growth.

<sup>b</sup> Positive control, doxorubicin.

positive relationship between the presence of double bond (unsaturation) in the structure of the compound and the potential cytotoxic effect.<sup>20,21</sup> Cavalcanti et al. demonstrated the importance of the exocyclic double bond in karen-19-oic acid in the induction of DNA damage and subsequent apoptosis of HL-60 cells. Also in this work, karen-19-oic acid was able to interact with cellular DNA and interfere with the catalytic activity of the enzyme topoisomerase I.<sup>22</sup> Alternatively, the presence of the double bond between carbons C-1' and C-2' in the derivatives **3a/3b** may be related to ROS production. Its oxidation leads to the production of lipid hydroperoxides and non-radical intermediates. These by-products can interact with DNA and altered gene expression, resulting in cell death.<sup>23</sup>

These results confirm that small changes in the molecule can significantly alter the biological effect of a compound, being valid, thus, the production of derived by chemical techniques for semi-synthesis in the search for new drugs, including anticancer.<sup>18</sup> Cragg et al. have been reported that compounds from natural sources have high anticancer potential, they need to be optimized for removal, modification, introduction of functional groups and stereocenters to improve its properties.<sup>24</sup> Combinatorial biosynthetic methods are limited, however, there are numerous examples including the taxanes, camptothecins and combretastatins.<sup>25–27</sup>

Interestingly, in the Alamar Blue assay using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC, normal cells), the derivatives **3a/3b** were not cytotoxic at the concentrations tested (>5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), suggesting selectivity for tumor cells. Additionally, none of the derivatives tested showed hemolytic activity (>50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) using mouse erythrocytes, which makes us suspect the activation of a more specific cell death which does not involve the immediate lysis of the cell membrane.

The cytotoxicity results for the derivatives **3a/3b** are interesting because the prototype molecule is devoid of anticancer effect, but has instead gastroprotective and antioxidant properties.<sup>11</sup> Therefore, the following experiments were carried out aimed at understanding the mechanism of action of the cytotoxic derivatives **3a/3b** in the HL-60 cell line.

### 2.3. Morphological changes typical of apoptosis induced by **3a/3b**

All experiments to investigate the mechanism of action of derivatives **3a/3b** in HL-60 cells were accompanied by the trypan blue test to verify cell viability and ensure that the compounds tested maintained their activity. As seen in Figure 2 **3a/3b** reduced the number of viable cells and increased the number of non-viable cells in a concentration-dependent manner.

Light microscopy was used to verify the morphology of HL-60 cells untreated or treated with **3a/3b** and stained with May Grünwald-Giemsa. After 24 h incubation, cells from the negative control exhibited typical non-adherent and round morphology with vacuolization (Fig. 3A). Chromatin condensation and nuclear and cellular fragmentation were observed in the presence of 0.5  $\mu\text{M}$  doxorubicin

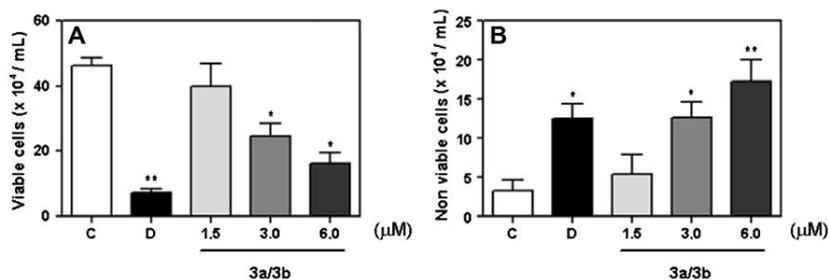
(Fig. 3B), characteristic of apoptosis. The cells treated with **3a/3b** at a concentration of 1.5  $\mu\text{M}$  showed no striking morphological changes (Fig. 3C). On the other hand, at 3 and 6  $\mu\text{M}$ , **3a/3b** induced changes typical of apoptosis, including reduction in cell volume, pyknotic nuclei and chromatolysis,<sup>23</sup> which was more intense at the higher concentration. Moreover, there was an increase in the number of small cells with an intact cell membrane (Fig. 3D and E).

To confirm the light microscopy findings, we performed a morphological analysis of cells treated with **3a/3b** by staining with AO/EB and examining cells by fluorescence microscopy. The percentages of viable, apoptotic and necrotic cells were calculated. After 24 h, HL-60 cells treated with **3a/3b** showed a reduction in cell viability only at concentrations of 3 and 6  $\mu\text{M}$ . At these concentrations, the number of apoptotic cells significantly increased, corroborating the results described above (Fig. 4). The compounds **3a/3b** reduced the number of viable cells by 46.61% and 96.17% at concentrations of 3 and 6  $\mu\text{M}$ , respectively. In parallel, the percentage of apoptotic cells at 3 and 6  $\mu\text{M}$  was 35.59% and 71.84%, respectively. With respect to necrosis, a slight increase in number was observed at a concentration of 6  $\mu\text{M}$  (16.22%).

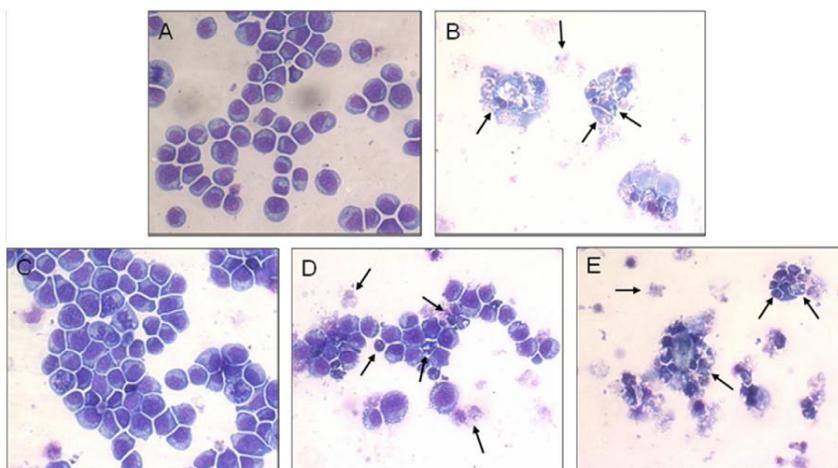
In flow cytometry, treatment of HL-60 cells for 24 h with **3a/3b** showed a reduction in cell size and granularity in a concentration-dependent manner. This may be seen in Figure 5 and corroborated by the reduced number of cells with viable normal morphology (note the panel A gates and panel B). Additionally, membrane integrity was essentially preserved (Fig. 5, panel C), supporting the results indicative of cell death by apoptosis. At a concentration of 6  $\mu\text{M}$ , **3a/3b** caused disruption of membrane integrity, which may be indicative of cells in the final process of death or secondary necrosis as observed in microscopic analysis.<sup>28</sup> Similarly, 0.5  $\mu\text{M}$  doxorubicin caused a reduction in cell viability and increased number of apoptotic cells.

### 2.4. DNA fragmentation, phosphatidylserine (PS) externalization and activation of caspases 3/7 induced by **3a/3b**

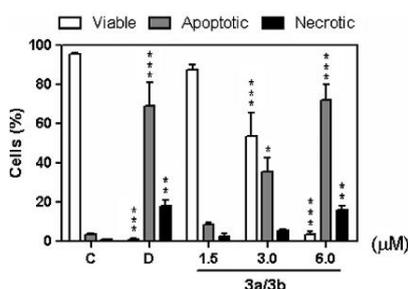
Morphological analysis of HL-60 cells indicated that the probable process of cell death induced by **3a/3b** occurs by induction of apoptosis. We therefore proceeded with the determination of DNA fragmentation, cell cycle changes, PS externalization and the activity of the effector caspases 3/7 by flow cytometry, which are also considered marker events of apoptosis.<sup>28,29</sup> After 24 h, DNA fragmentation of HL-60 cells was significantly increased by compounds **3a/3b** in a concentration-dependent manner (Table 2). The positive control, doxorubicin (0.5  $\mu\text{M}$ ), induced 77.67% ( $p < 0.0001$ ) DNA fragmentation, comparable to the data for the compounds **3a/3b** at 3 and 6  $\mu\text{M}$  (61.54% and 84.24%, respectively). Regarding cell cycle analysis, **3a/3b** caused the accumulation of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase at 3  $\mu\text{M}$  (30.52%) ( $p < 0.05$ ) and in S phase at 6  $\mu\text{M}$  (88.63%) ( $p < 0.001$ ). Cell cycle arrest could be related to an attempt by the cell to repair the DNA damage caused by **3a/3b**. Since the damage appears to be very intense, repair does not occur and apoptosis is triggered.<sup>28</sup>



**Figure 2.** Effect of **3a/3b** on HL-60 cell viability determined by trypan blue exclusion after 24 h of incubation. Negative control (C) was treated with the vehicle used for diluting the test compound. Doxorubicin (0.5 μM) was used as the positive control (D). (A) Number of viable cells. (B) Number of non viable cells. Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM) for multiple independent experiments. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.001 compared to control by ANOVA followed by Dunnett's test.



**Figure 3.** Microscopic analysis (May Grünwald/Giemsa-stained) of effect of **3a/3b** on HL-60 cell after 24 h of incubation. Cells untreated (A) or treated with **3a/3b** (1.5 μM, C; 3 μM, D; or 6 μM, E) were analyzed by light microscopy (200×). Doxorubicin (0.5 μM) was used as the positive control (B). Black arrows show reduction of cell volume, nuclear fragmentation and cellular debris.

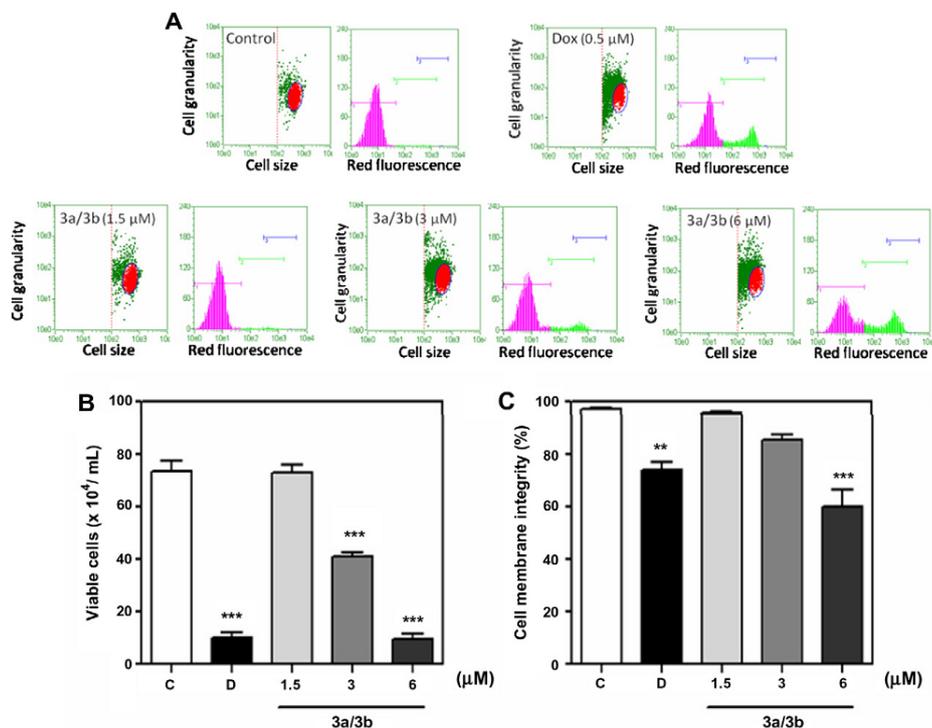


**Figure 4.** Effect of **3a/3b** on HL-60 cell death pattern determined by acridine orange and ethidium bromide-staining (AO/EB) after 24 h of incubation. Negative control (C) was treated with the vehicle used for diluting the test compound. Doxorubicin (0.5 μM) was used as the positive control (D). Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM) for three independent experiments performed in duplicate (*n* = 6). \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.001; \*\*\**p* < 0.0001 compared to control by ANOVA followed by Dunnett's test.

The detection of PS externalization showed that **3a/3b** significantly induced apoptosis (Fig. 6A), especially at 6 μM (44.22%) (*p* < 0.0001). In parallel, it was found that **3a/3b** was also able to activate caspases 3/7 in a significant and concentration-dependent manner. The results showed that 7.88% and 21.58% of cells had activated caspases 3/7 at 3 and 6 μM, respectively (Fig. 6B). All results presented herein suggest that compounds **3a/3b** induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells.

### 3. Conclusions

Despite all the technological advances, the treatment of cancer is still a challenge and cases of cure are rare. Natural products and chemical modification of antitumor substances are among the most important strategies used in the search of new antineoplastic drugs.<sup>30</sup> Therefore, the objective of this study was to extract and identify the triterpenoid mixture of α- and β-amyrin, as well as, to produce new derivatives and determine their cytotoxic effects on human tumor cell lines and normal cells.



**Figure 5.** Effects of **3a/3b** (1.5, 3 and 6 μM) on HL-60 cell population determined by flow cytometry using propidium iodide, after 24 h of incubation. The negative control (C) was treated with the vehicle used for diluting the test compound. Doxorubicin (0.5 μM) was used as the positive control (D). (**Panel A**) The forward light scatter and side light scatter of the laser were used as indices of cell size and granularity, respectively. (**Panel B**) Number of viable cells by size and granularity (gated cells in panel A). (**Panel C**) Percentage of cells with intact membrane. Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM) for three independent experiments performed in duplicate (n = 6). \*\*p < 0.001; \*\*\*p < 0.0001 compared to control by ANOVA followed by Dunnett's test.

**Table 2**  
Effect of **3a/3b** on the nuclear DNA content of HL-60 cells determined by flow cytometry after 24 h of incubation

Compound	Concentration (μM)	DNA <sup>b</sup> (%)			
		Sub-G0/G <sub>1</sub>	G0/G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Control	—	8.25 ± 0.15	22.07 ± 0.43	67.13 ± 1.09	11.83 ± 1.08
Doxorubicin <sup>a</sup>	0.5	77.67 ± 2.41***	19.67 ± 3.72	78.91 ± 4.84	1.41 ± 1.11***
<b>3a/3b</b>	1.5	17.57 ± 1.17**	25.17 ± 2.92	67.41 ± 3.27	7.41 ± 0.62*
	3.0	61.54 ± 0.52***	30.52 ± 2.66**	64.92 ± 1.95	4.57 ± 1.29**
	6.0	84.24 ± 1.16***	7.11 ± 0.56**	88.63 ± 3.65**	0.04 ± 0.04***

\*p < 0.05; \*\*p < 0.001; \*\*\*p < 0.0001, compared to control by ANOVA followed by Dunnett's test.

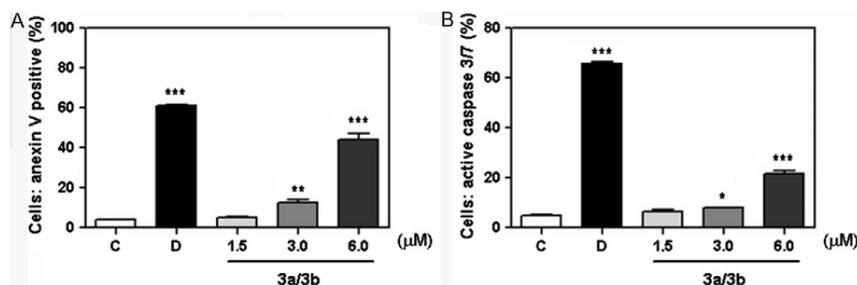
<sup>a</sup> Doxorubicin (0.5 μM) was used as the positive control.

<sup>b</sup> Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM) for three independent experiments performed in duplicate (n = 6).

In this study, we demonstrated that among the mixtures of derivatives of α,β-amyryn tested, the mixture **3a/3b** stood out because of its high cytotoxic effect on human tumor cell lines, with highest activity in HL-60 cells. This activity is possibly related to the presence of the maleinate group linked to C-3 of the A ring of the triterpenoid skeleton. There is a positive correlation between the IC<sub>50</sub> and the presence of the double bond in this group, due the possibility to interact with cellular DNA, inhibiting the enzyme topoisomerase I, or lipid peroxidation generates a large amount of by-products and adduct formation, which can damage the DNA

and altered gene expression.<sup>22,23</sup> Additionally, **3a/3b** seemed to be selective for tumor cells, since they were not toxic to normal PBMC cells. Regarding the mechanism of action, **3a/3b** induced the death of HL-60 cells by the induction of apoptosis, which was demonstrated by morphological analysis (volume reduction, maintenance of cell membrane integrity and nuclear fragmentation), DNA fragmentation, externalization of PS and activation of caspases 3/7.<sup>29,31,32</sup>

The esterases could be a critical point in this work, but another researches concluded that some of the non-natural ester analogues



**Figure 6.** Effect of **3a/3b** on PS externalization (**Panel A**) and caspase 3/7 activation (**Panel B**) of HL-60 cells by flow cytometry after 24 h of incubation. Negative control (C) was treated with the vehicle used for diluting the test compound. Doxorubicin (0.5 μM) was used as the positive control (D). Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM) for two independent experiments performed in triplicate ( $n = 6$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ , compared to control by ANOVA followed by Dunnett's test.

of the naturally occurring  $\alpha$ -amyirin are better glucose ameliorating than the naturally isolated  $\alpha$ -amyirin acetate and almost as equipotent as metformin.<sup>33</sup> The by-products in this organic reaction could be more effective than the original compound. To measure this reaction in vivo will be the next step in this work. Nanoscience and nanotechnology strategies for imaging and treating cancer could be useful to design a method to avoid the esterases action, like another works that find a combinatorial drug delivery nanocapsule with sequential delivery feature for effective antivasculature and anticancer activities in vitro and in vivo.<sup>34</sup> Among the various approaches considered, nanotechnology offers the best promise for the targeted delivery of drugs and genes to a tumor site and for alleviating side effects of chemotherapeutic agents. Renowned industrial and academic researchers describe the advantages of nanoparticles as sensing, delivery, image enhancement agents for cancer treatments, and various types of useful nanoparticles such as polymeric nanoparticles and dendrimers.<sup>35,36</sup>

## 4. Experimental

### 4.1. Chemistry

The melting point was determined using a Mettler Toledo FP82HT micromelting point apparatus. The IR spectra were measured in KBr pellets using a Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 1000. All NMR data were recorded using a Bruker Avance DPX 300 and Avance DRX-500 spectrometer operating at the frequency of the hydrogen at 300.13 and 500.13 MHz in the frequency of the carbon for 75.47 and 125.75 MHz, using  $\text{CDCl}_3$  as the solvent. High resolution data were obtained in a MS-IT-TOF mass spectrometer.

#### 4.1.1. Procedure for the synthesis of the derivatives of $\alpha, \beta$ -amyirin

**4.1.1.1. 3-O-Carboxybenzoate of  $\alpha, \beta$ -amyirin (1a/1b).** The mixture of  $\alpha, \beta$ -amyirin (**a/b**), 100 mg, was dissolved in 20 mL of ethyl ether and added to a solution of phthalic anhydride (139 mg in 20 mL of ethyl ether) in pyridine (0.5 mL); the reaction proceeded under reflux for 8 h at a temperature of 50 °C. The final solution was added to 15 mL of a concentrated solution of copper sulfate, and the organic phase was separated and evaporated to dryness at room temperature. The reaction material was chromatographed on a silica gel column eluted with EtOAc, yielding 58.4 mg (43%).

**4.1.1.2. 3-O-Carboxysuccinate of  $\alpha, \beta$ -amyirin (2a/2b).** The mixture of  $\alpha, \beta$ -amyirin (**a/b**), 100 mg, was dissolved in 20 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and then added a solution of succinic anhydride (43.67 mg in

20 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) and DMAP in catalytic amounts, with subsequent refluxing for 8 h at a temperature of 50 °C. The solution was concentrated and the resulting solid was chromatographed on a silica gel column eluted with EtOAc, yielding 45.84 mg (37%).

**4.1.1.3. 3-O-Carboxymaleinate of  $\alpha, \beta$ -amyirin (3a/3b).** The mixture of  $\alpha, \beta$ -amyirin (**a/b**), 200 mg, was dissolved in 20 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and then added to a solution of maleic anhydride (184 mg in 20 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). The mixture was then refluxed for 8 h at a temperature of 50 °C. The solution was concentrated under vacuum and the resulting solid chromatographed on a silica gel column eluted with EtOAc, yielding 76.27 mg (31%).

**4.1.1.4. 3-O-Carboxyglutarate of  $\alpha, \beta$ -amyirin (4a/4b).** The mixture of  $\alpha, \beta$ -amyirin (**a/b**), 100 mg, was dissolved in 20 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and then added to a solution of glutaric anhydride (26.76 mg in 20 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) and DMAP in catalytic amounts, with subsequent refluxing for 8 h at a temperature of 50 °C. The reaction product was concentrated under vacuum and the resulting solid chromatographed on a silica gel column eluted with EtOAc, yielding 92 mg (35%).

#### 4.1.2. 3-O-Carboxybenzoate of $\alpha, \beta$ -amyirin (1a/1b)

White solid, 43% yield; mp: 135 °C. FTIR (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3461, 2925, 1701, 1583, 1404.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.77 (dd, H-3), 5.13 (t, H-12 of the  $\alpha$ -amyirin derivative), 5.19 (t, H-12 of the  $\beta$ -amyirin derivative).  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  38.7/38.2 (C-1), 26.8 (C-2), 83.3 (C-3), 38.2 (C-4), 55, 6 (C-5), 18.4 (C-6), 33.1/33.5 (C-7), 40.0/39.8 (C-8), 47.9/47.8 (C-9), 38.0 (C-10), 23.5/23.6 (C-11), 124.5/121.9 (C-12), 139.8/145.4 (C-13), 41.8/40.0 (C-14), 28.3/26.8 (C-15), 26.8 (C-16), 33.6/33.1 (C-17), 59.3/47.5 (C-18), 39.8/47.5 (C-19), 39.2/31.5 (C-20), 31.5/33.7 (C-21), 41.8/38.0 (C-22), 28.3/28.4 (C-23), 15.9 (C-24), 15.9 (C-25), 17.1/17.0 (C-26), 23.1/26.8 (C-27), 28.9/28.4 (C-28), 17.8/33.6 (C-29), 21.6 (C-30), 168.1/172.1 (C=O), 131.9 (C-1'), 129.1 (C-2'), 133.4 (C-3'), 131.1 (C-4'), 130.1 (C-5'), 131.1 (C-6').

#### 4.1.3. 3-O-Carboxysuccinate of $\alpha, \beta$ -amyirin (2a/2b)

White solid, 37% yield; mp: 200 °C. FTIR (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3446, 2925, 1731, 1715, 1450.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.54 (dd, H-3), 5.13 (t, H-12 of the  $\alpha$ -amyirin derivative), 5.21 (t, H-12 of the  $\beta$ -amyirin derivative), 2.64 (dd,  $J = 5.40$  and  $5.85$  Hz, H-1'), 2.69 (dd,  $J = 5.40$  and  $5.85$  Hz, H-2').  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  38.7/38.0 (C-1), 26.8 (C-2), 81.8 (C-3), 38.0 (C-4), 55, 5 (C-5), 18.4 (C-6), 31.7 (C-7), 39.9 (C-8), 47.8/47.6 (C-9), 37.9 (C-10), 23.1/23.7 (C-11), 124.5/121.8 (C-12), 139.9/145.4 (C-13), 41.8/40.0 (C-14), 28.2/26.8 (C-15), 26.8 (C-16), 33.1/31.5 (C-17), 59.3/47.5

(C-18), 39.8/47.8 (C-19), 39.5/31.0 (C-20), 31.5/33.1 (C-21), 41.6/38.0 (C-22), 28.2/28.3 (C-23), 16.0/15.9 (C-24), 15.9 (C-25), 16.9/16.0 (C-26), 23.5/26.0 (C-27), 28.3/28.2 (C-28), 17.7/33.5 (C-29), 21.6 (C-30), 172.9/178.7 (C=O), 28.2 (C-1'), 28.2 (C-2').

#### 4.1.4. 3-O-Carboxymaleinate of $\alpha,\beta$ -amyrin (3a/3b)

White solid, 31% yield; mp: 188 °C FTIR (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3422, 2924, 1722, 1633, 1454. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.69 (dd, H-3), 5.14 (t, H-12 of the  $\alpha$ -amyrin derivative), 5.20 (t, H-12 of the  $\beta$ -amyrin derivative), 6.39 (d,  $J$  = 12.8 Hz, H-1'), 6.47 (d,  $J$  = 12.8 Hz, H-2'). <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  C 38.6/38.4 (C-1), 27.1 (C-2), 85.3 (C-3), 37.3 (C-4), 55.5 (C-5), 18.4 (C-6), 32.7 (C-7), 40.2/40.0 (C-8), 47.9/47.8 (C-9), 37.0 (C-10), 23.6/23.7 (C-11), 124.3/121.7 (C-12), 139.9/145.3 (C-13), 42.3/41.9 (C-14), 28.3/26.3 (C-15), 26.8 (C-16), 33.9/32.7 (C-17), 59.3/47.4 (C-18), 39.8/47.0 (C-19), 39.8/31.0 (C-20), 31.4/35.0 (C-21), 41.7/37.3 (C-22), 28.3 (C-23), 15.9/13.7 (C-24), 15.9/15.7 (C-25), 16.9/16.8 (C-26), 23.5/26.2 (C-27), 28.6/28.3 (C-28), 17.7/33.5 (C-29), 21.6 (C-30), 164.6/167.9 (C=O), 136.9 (C-1'), 129.9 (C-2').

#### 4.1.5. 3-O-Carboxylglutarate of $\alpha,\beta$ -amyrin (4a/4b)

White solid, 35% yield; mp: 209 °C. FTIR (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3461, 2924, 1727, 1455. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.52 (dd, H-3), 5.13 (t, H-12 of the  $\alpha$ -amyrin derivative), 5.21 (t, H-12 of the  $\beta$ -amyrin derivative), 2.40 (t,  $J$  = 7.3 Hz, H-1'), 2.44 (t,  $J$  = 7.4 Hz, H-3'), 1.98 (m, H-2'). <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  38.6/38.5 (C-1), 27.1 (C-2), 81.4 (C-3), 37.9 (C-4), 55.5 (C-5), 18.4 (C-6), 32.7 (C-7), 40.2/40.0 (C-8), 47.8/47.7 (C-9), 37.1 (C-10), 23.6/23.7 (C-11), 124.5/121.8 (C-12), 139.8/145.4 (C-13), 42.3/41.9 (C-14), 28.3/26.3 (C-15), 26.8 (C-16), 33.9/32.7 (C-17), 59.3/47.4 (C-18), 39.8/47.0 (C-19), 39.9/31.2 (C-20), 31.5/34.9 (C-21), 41.8/37.4 (C-22), 28.3 (C-23), 15.9/15.8 (C-24), 15.9/15.8 (C-25), 17.0/16.9 (C-26), 23.5/26.2 (C-27), 28.6/28.3 (C-28), 17.7/33.5 (C-29), 21.6 (C-30), 172.9/178.7 (C=O), 33.2 (C-1'), 20.2 (C-2'), 33.8 (C-3').

## 4.2. Biology

### 4.2.1. Cytotoxicity against cancer cell lines—MTT assay

The cytotoxic effect of compounds was evaluated by the MTT assay,<sup>37</sup> using four human cancer cell lines: HL-60 (promyelocytic leukemia), SF-295 (glioblastoma), HCT-8 (colon cancer) and MDAMB-435 (melanoma), all obtained from the National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA). All cell lines were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Cancer cell growth was quantified by the ability of living cells to reduce the yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO/USA) to a purple formazan product. Briefly, cells were seeded in 96-well plates (0.7  $\times$  10<sup>5</sup> cells/well for adherent cells and 0.3  $\times$  10<sup>6</sup> cells/well for suspended cells), and compounds (0.078–5  $\mu$ g/mL) dissolved in DMSO were added to each plate well. Control groups received the same amount of vehicle. The final concentration of DMSO in the culture medium was kept constant, below 0.1% (v/v). After 72 h of incubation, the supernatant was replaced by fresh medium containing MTT (0.5 mg/mL). Three hours later, the MTT formazan product was dissolved in 150  $\mu$ L DMSO, and absorbance was measured at 595 nm (DTX-880 Multimode Detector, Beckman Coulter®). All cell treatments were carried out in triplicate and doxorubicin was used as the positive control.

### 4.2.2. Inhibition of PBMC proliferation—Alamar Blue assay

In order to investigate the effect of the test compounds on normal proliferating cells, the Alamar Blue assay<sup>38</sup> was performed with human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after 72 h drug

exposure. Heparinized blood (from healthy, non-smoker donors who had not taken any drug at least 15 days prior to sampling) was collected and PBMC were isolated by a standard method of density-gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque. PBMC were washed and resuspended at a concentration of 3  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mL in RPMI 1640 medium supplemented with 20% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Phytohemagglutinin (3%) was added at the beginning of culture. After 24 h, the compounds (0.078–5  $\mu$ g/mL) dissolved in DMSO were added to each plate well, and the cells were incubated for 72 h. Control groups received the same amount of vehicle and doxorubicin was used as the positive control. The final concentration of DMSO in the culture medium was kept constant, below 0.1% (v/v). Twenty-four hours before the end of the incubation, 10  $\mu$ L of stock solution (0.312 mg/mL) of the Alamar Blue (Resazurin, Sigma-Aldrich Co) was added to each well. The absorbance was measured using a multiplate reader (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter®) and the drug effect was expressed as the percentage of control absorbance at 570 nm and 595 nm.

### 4.2.3. Hemolytic assay

The test was performed in 96-well plates using a 2% mouse erythrocyte suspension in 0.85% NaCl containing 10 mM CaCl<sub>2</sub>, following the method described by Jimenez et al.<sup>39</sup> The compounds were tested at concentrations ranging from 0.38 to 200  $\mu$ g/mL. After incubation (1 h) at room temperature, the supernatant was removed and the hemoglobin released was measured spectrophotometrically at 540 nm. DMSO at 10% was used as the negative control and Triton X-100 (1%) was used as the positive control.

### 4.2.4. Study of the mechanism of cytotoxicity induced by 3-O-carboxymaleinate of $\alpha$ - and $\beta$ -amyrin (3a/3b)

In the second stage of the study aimed at determining the cytotoxicity induced by **3a/3b**, the HL-60 promyelocytic leukemia cell line was chosen based on preliminary cytotoxicity screening (MTT assay).

The HL-60 cell line is one of the most often used model for studying cytotoxic substances.<sup>40,41</sup> Therefore, the following experiments were performed using HL-60 cells as a model and **3a/3b** were dissolved in sterile DMSO (vehicle control). The cells were incubated with the test compounds for 24 h at three different concentrations (1.5, 3.0 and 6.0  $\mu$ M), chosen based on IC<sub>50</sub> values obtained by the MTT assay. Doxorubicin (0.5  $\mu$ M) was used as the positive control.

**4.2.4.1. Cell viability by trypan blue exclusion.** Cell viability was determined by the trypan blue dye exclusion test<sup>42</sup> after treatment. Cells (0.3  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL) were incubated with **3a/3b**, and trypan blue-excluding cells were counted in a Neubauer chamber, using an aliquot of cells removed from cultures after incubation.

**4.2.4.2. Analysis of morphological changes.** Untreated and treated HL-60 cells were examined for morphological changes by light microscopy (Olympus, Tokyo, Japan). Cells from cultures after 24 h were harvested, transferred to cytospin slides, fixed with methanol for 1 min and stained with May Grünwald–Giemsa (Bioclin, Brazil).

**4.2.4.3. Morphological analysis with fluorescence microscopy.** Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) (Sigma Aldrich) staining<sup>43</sup> of HL-60 cells was performed to evaluate the cell death pattern induced by increasing concentrations of compounds. After incubation, cells were pelleted and each sample was mixed with 1  $\mu$ L of aqueous AO/EB solution (100  $\mu$ g/mL of AO in PBS; 100  $\mu$ g/mL EB in PBS) just prior to fluorescence microscopy and quantification (Olympus, Tokyo, Japan). Three hundred cells were counted per sample and scored as follows: viable cells,

apoptotic cells and necrotic cells.<sup>44,45</sup> The percentage of apoptotic and necrotic cells was calculated.

**4.2.4.4. Flow cytometry analysis.** HL-60 cell fluorescence was determined by flow cytometry in a Guava EasyCyte Mine using Guava Express Plus software. Five thousand events were analyzed for each replicate in three independent experiments, and cellular debris was omitted from the analysis. Internucleosomal DNA fragmentation and cell cycle were determined by ModFit LT for Win32 version 3.1.

#### 4.2.5. Cell membrane integrity

The cell membrane integrity was evaluated by the exclusion of propidium iodide (50 µg/mL, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO/USA). Briefly, a 100 µL suspension of treated and untreated cells was incubated with propidium iodide (50 µg/mL). The cells were then incubated for 5 min. Fluorescence was measured and analyzed for cell morphology, granularity and membrane integrity.<sup>46</sup>

#### 4.2.6. Internucleosomal DNA fragmentation and cell cycle analysis

DNA fragmentation and cell cycle were analyzed by flow cytometry after DNA staining with propidium iodide. Briefly, a 100 µL suspension of treated and untreated cells was incubated for 30 min, in the dark, with hypotonic solution containing 50 µg/mL propidium iodide, 0.1% sodium citrate, and 0.1% Triton X-100. Fluorescence was measured and DNA fragmentation and cell cycle phases were determined.<sup>47</sup>

#### 4.2.7. Phosphatidylserine (PS) externalization

PS externalization was analyzed by flow cytometry after PS staining with Annexin V according to the method described by Vermes et al.<sup>48</sup> The Guava Nexin Assay Kit was used to determine early apoptosis. Cells were washed twice with cold PBS and then resuspended in 135 µL of PBS with 5 µL of 7-amino-actinomycin D (7AAD) and 10 µL of Annexin V-PE. The cells were gently vortexed and incubated for 20 min at room temperature (20–25 °C) in the dark. Afterward, the cells were analyzed by flow cytometry (EasyCyte from Guava Technologies). Annexin V is a phospholipid-binding protein that has a high affinity for PS. 7-AAD, a cell impermeant dye, is used as an indicator of membrane structural integrity. Annexin V-PE was measured as a yellow fluorescence at 583 nm and 7-AAD as a red fluorescence at 680 nm. The percentage of early and late apoptotic cells and necrotic cells was then calculated.

#### 4.2.8. Activity of caspases 3 and 7

Caspase 3/7 activity was analyzed by flow cytometry, using Guava® EasyCyte Caspase Kit, after 24 h of incubation. HL-60 cells ( $3 \times 10^5$  cells/mL) were incubated with Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases (FLICA) and maintained for 1 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, 80 µL of washing buffer were added and cells were centrifuged at 2000 rpm for 5 min. The resulting pellet was resuspended in 200 µL of washing buffer and centrifuged again. The cells were then resuspended in the working solution (propidium iodide 1:200 in 1× washing buffer) and analyzed immediately using flow cytometry.

#### 4.3. Statistical analysis

For cytotoxicity assays, the IC<sub>50</sub> or EC<sub>50</sub> values and their 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression using the GraphPad program (Intuitive Software for Science, San Diego, CA). Data obtained from the studies of mechanism of action are

presented as means ± SEM for at least three independent experiments and evaluated by ANOVA followed by the Student Newman–Keuls test.

#### 5. Conflict of interest statement

None

#### Acknowledgments

This research received financial support from FUNCAP, CNPq and CAPES. The authors thank National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA) for donating the tumor cell lines used in this study and CENAUREM for conducting the NMR spectra. Dr. A. Leyva provided English editing of the manuscript.

#### References and notes

- Mahato, S. B.; Nandy, A. K.; Roy, G. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2199.
- Mahato, S. B.; Sen, S. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1185.
- Oliveira, F. A.; Costa, C. L. S.; Chaves, M. H.; Almeida, F. R. C.; Cavalcante, I. J. M.; Lima, A. F.; Lima, R. C. P., Jr.; Silva, R. M.; Campos, A. R.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N. *Life Sci.* **2005**, *77*, 2942.
- Keterere, D. R.; Gray, A. I.; Nash, R. J.; Waigh, R. D. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 81.
- Oliveira, F. A.; Lima, R. C. P., Jr.; Cordeiro, W. M.; Vieira, G. M., Jr.; Chaves, M. H.; Almeida, F. R. C.; Silva, R. M.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2004**, *78*, 719.
- Oliveira, F. A.; Vieira, H. M., Jr.; Chaves, M. H.; Almeida, F. R. C.; Florêncio, M. G.; Lima, R. C. P., Jr.; Silva, R. M.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N. *Pharmacol. Res.* **2004**, *49*, 105.
- Pinto, S. A. H.; Pinto, L. M. S.; Cunha, G. M. A.; Chaves, M. H.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N. *Inflammopharmacology* **2008**, *16*, 48.
- Pinto, S. A. H.; Pinto, L. M. S.; Guedes, G. M. A.; Cunha, G. M. A.; Chaves, M. H.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 630.
- Aragão, G. F.; Carneiro, L. M. V.; Junior, A. P. F.; Vieira, L. C.; Bandeira, P. N.; Lemos, T. L. G.; Viana, G. S. B. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2006**, *85*, 827.
- Aragão, G. F.; Cristhiany, C. P.; Bandeira, P. N.; Lemos, T. L. G.; Viana, G. S. B. *J. Herbal Pharmacother.* **2007**, *7*, 31.
- Laszczyk, M. N. *Planta Med.* **2009**, *75*, 1549.
- Bandeira, P. N.; Lemos, T. L. G.; Costa, S. M. O.; Santos, H. S. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 204.
- Soldi, C.; Latti, M. G. P.; Luiz, A. P.; Marcon, R.; Meotti, F. C.; Miotto, L. A.; Santos, A. R. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *1*.
- Aragão, G. F.; Carneiro, L. M. V.; Junior, A. P. F.; Bandeira, P. N.; Lemos, T. L. G.; Viana, G. S. B. *Pharm. Biol.* **2007**, *45*, 343.
- Oliveira, F. A.; Lima, R. C. P., Jr.; Cordeiro, W. M.; Vieira, G. M., Jr.; Chaves, M. H.; Almeida, F. R. C.; Silva, R. M.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2004**, *78*, 718.
- Fernandes, J.; Castilho, R. O.; Costa, M. R.; Wagner-Souza, K.; Kaplan, M. A. C.; Gattass, C. R. *Cancer Lett.* **2003**, *190*, 165.
- Sun, H. X.; Ye, Y. P.; Pan, Y. J. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *90*, 261.
- Lee, K. H. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 500.
- Bandeira, P. N.; Pessoa, O. D. L.; Trevisan, M. T. S.; Lemos, T. L. G. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1078.
- Amslinger, S. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 351.
- Roh, E. M.; Jin, Q.; Jin, H. G.; Shin, J. E.; Choi, E. J.; Moon, Y. H.; Woo, E. R. *Arch. Pharmacol. Res.* **2010**, *33*, 1347.
- Cavalcanti, B. C.; Bezerra, D. P.; Magalhães, H. I.; Moraes, M. O.; Lima, M. A.; Silveira, E. R.; Câmara, C. A.; Rao, V. S.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L. V. *J. Appl. Toxicol.* **2009**, *7*, 560.
- Pillon, N. J.; Soulière, L.; Vella, R. E.; Croze, M.; Caré, B. R.; Soula, H. A.; Doutheau, A.; Lagarde, M.; Soulage, C. O. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *188*, 171.
- Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J.; Cragg, G. M. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3012.
- Coseri, S. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 560.
- Kingston, D. G. I. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3975.
- Rahier, N. J.; Thomas, C. J.; Hecht, S. M. In *Anticancer Agents from Natural Products*; Cragg, G. M., Kingston, D. G. I., Newman, D. J., Eds.; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2005; p 5.
- Maia, D. P.; Wilke, D. V.; Mafezoli, J.; Júnior, J. N. S.; Moraes, M. O.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L. V. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *180*, 220.
- Bezerra, D. P.; Militão, G. C. G.; Castro, F. O.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Silveira, E. R.; Lima, M. A. S.; Elmiro, F. J. M.; Costa-Lotufo, L. V. *Toxicol. In Vitro* **2007**, *21*, 1.
- Pinkerton, D. M.; Banwell, M. G.; Garson, M. J.; Kumar, N.; Moraes, M. O.; Cavalcanti, B. C.; Barros, F. W. A.; Pessoa, C. *Chem. Biodiv.* **2010**, *7*, 1311.
- Esteves-Souza, A.; Lucio, K. A.; Da Cunha, A. S.; Da Cunha Pinto, A.; Da Silva Lima, E. L.; Camara, C. A.; Vargas, M. D.; Gattass, C. R. *Oncol. Rep.* **2008**, *20*, 225.
- Yedjou, C. G.; Milner, J. N.; Howard, C. B.; Tchounpou, P. B. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2010**, *7*, 2008.

## Author's personal copy

1276

F. W. A. Barros et al./Bioorg. Med. Chem. 19 (2011) 1268–1276

33. Narender, T.; Khaliq, T.; Singh, A. B.; Joshi, M. D.; Mishra, P.; Chaturvedi, J. P.; Srivastava, A. K.; Maurya, R.; Agarwal, S. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1215.
34. Wang, Z.; Ho, P. C. *Biomaterials* **2010**, *31*, 7115.
35. Nassar, T.; Rom, A.; Nyska, A.; Benita, S. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2019.
36. Nassar, T.; Rom, A.; Nyska, A.; Benita, S. *J. Controlled Release* **2009**, *133*, 77.
37. Mosman, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
38. Zhi-Jun, Y.; Sriranganathan, N.; Vaught, T.; Arastu, S. K.; Ansar-Ahmed, S. *J. Immunol. Methods* **1997**, *210*, 25.
39. Jimenez, P. C.; Fortier, S. C.; Lotufo, T. M. C.; Pessoa, C.; Moraes, M. E. A.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* **2003**, *287*, 93.
40. Collins, S. J. *Blood* **1987**, *70*, 1233.
41. Militão, G. C. G.; Dantas, I. N. F.; Pessoa, C.; Falcão, M. J. C.; Silveira, E. R.; Lima, M. A. S.; Curi, R.; Lima, T.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V. *Life Sci.* **2006**, *78*, 2409.
42. Renzi, D.; Valtolina, M.; Foster, R. *Altern. Lab. Anim.* **1993**, *21*, 89.
43. McGahon, A. J.; Martin, S. M.; Bissonette, R. P.; Mahboubi, A.; Shi, Y.; Mogil, R. J.; Nishioka, W. K.; Green, D. R. *Methods Cell Biol.* **1995**, *46*, 153.
44. Geng, C. X.; Zeng, Z. C.; Wang, J. Y. *World J. Gastroenterol.* **2003**, *9*, 696.
45. Cury-Boaventura, M. F.; Pompeia, C.; Curi, R. *Clin. Nutr.* **2004**, *23*, 721.
46. Darzynkiewicz, Z.; Bruno, S.; Del Bino, G.; Gorczyca, W.; Hotz, M. A.; Lassota, P.; Traganos, F. *Cytometry* **1992**, *13*, 795.
47. Nicoletti, I.; Migliorati, G.; Pagliacci, M. C.; Grignani, F.; Riccardi, C. *J. Immunol. Methods* **1991**, *139*, 271.
48. Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutlingsperger, C. *J. Immunol. Methods* **1995**, *184*, 39.

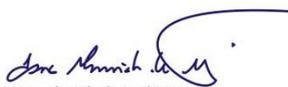
## 8.2 ANEXO II – MENÇÃO HONROSA, NO XXI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL.



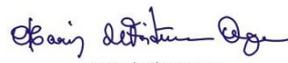
# CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho *ESTERS OF ALPHA AND BETA-AMYRIN INDUCE APOPTOSIS IN HUMAN LEUKEMIA HL-60 CELLS*, apresentado por *DAISY JEREISSATI BARBOSA LIMA* em co-autoria com *FRANCISCO W. A. BARROS, PAULO N. BANDEIRA, ASSUERO S. MEIRA, SILVANA S. DE FARIAS, MARIA ROSE J. R. ALBUQUERQUE, HÉLCIO S. DOS SANTOS, TELMA L. G. DE LEMOS, MANOEL ODORICO DE MORAIS, LETÍCIA VERAS COSTA-LOTUFO, CLAUDIA DO O PESSOA* recebeu **Menção Honrosa** como poster na **ÁREA DE FARMACOLOGIA** durante o XXI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, realizado no período de 14 a 17 de setembro de 2010, no Centro de Convenções do Tropical Hotel Tambau, na cidade de Joao Pessoa-PB.

João Pessoa-PB, 17 de setembro de 2010.



Isac Almeida de Medeiros  
Presidente do XXI SPMB



Maria de fátima Agra  
Coord<sup>a</sup>. da Comissão Científica

