



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

**DANILO DAMASCENO ROCHA**

**ESTUDO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E**  
**ANTITUMORAL DE VITAFISILINAS ISOLADAS DE**  
*Acnistus arborescens*

**FORTALEZA**

**2008**

**DANILO DAMASCENO ROCHA**

**ESTUDO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DE  
VITAFISILINAS ISOLADAS DE *Acnistus arborescens***

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: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Leticia Veras Costa Lotufo

**FORTALEZA**

**2008**

Ficha catalográfica

R572e Rocha, Danilo Damasceno

Estudo das atividades citotóxica e antitumoral de vitafisilinas isoladas de *Acnistus arborescens*/ Danilo Damasceno Rocha. – Fortaleza, 2008.

123 f. : il.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Leticia Veras Costa Lotufo

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Vitafisalina 2. Apoptose 3. Solanaceae I. Lotufo, Leticia Veras Costa (orient.). II. Título.

CDD 615.32379

**DANILO DAMASCENO ROCHA**

**ESTUDO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DE  
VITAFISILINAS ISOLADAS DE *Acnistus arborescens***

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.

Este documento encontra-se a disposição dos interessados na biblioteca setorial as referida universidade. A citação de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao  
Universidade Federal do Ceará

---

Profª. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves  
Universidade Federal do Ceará

*A **Deus**, que sempre me deu força e coragem,  
não me deixando desanimar nos momentos  
de angustia, tristeza e aflição.*

## AGRADECIMENTOS

À grande amiga e orientadora **Profª Drª Letícia Veras Costa-Lotufo**, por ter me aceitado, incentivado e acreditado em meu trabalho desde o início; pela paciência, ajuda e por todos os ensinamentos do dia-a-dia, e pela a orientação deste trabalho.

À **Profª Drª Claudia do Ó Pessoa**, pelo apoio, incentivo e pela amizade.

À **Drª Raquel Carvalho Montenegro**, por todos os auxílios e dicas essenciais, e pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes**, pelo incentivo e contribuição à pesquisa no Laboratório de Oncologia Experimental.

À **Profª Drª Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, pela contribuição e auxílio nas análises histopatológicas.

À **Profª Drª Otilia Deusdênia Loiola Pessoa** e ao **Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira** (esse é o prof., a parte do pai está lá em baixo), do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), junto aos pós-graduandos **Ana Isabel Maia** e **Maria Leopoldina Veras**, pelo isolamento e caracterização química das vitafisalinas aqui estudadas, e pela imensa colaboração neste trabalho.

Aos amigos do **Laboratório de Oncologia Experimental: Arinice, Bruno, Carla, Cecília, Daniel, Delano, Elthon, Eveline, Felipe, Hemerson, Ivana, Jersia, José Roberto, Kristiana, Márcio, Marne, Michel, Patrícia Marçal, Paula e Washington** pela ajuda, amizade e momentos de descontração de todos os dias; em especial **Diego e Gardênia**, por terem me passado um pouco de seus profundos conhecimentos e por todas as explicações sobre as metodologias utilizadas no laboratório.

À **Silvana** pela imensurável paciência e ajuda neste trabalho.

Aos técnicos **Adriano Santos, Luciana França e Maria de Fátima Teixeira** cuja dedicação é essencial para o laboratório.

Aos professores da Pós-graduação em Farmacologia por todas as lições.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: **Adelânia, Sheila, Aura, Chiquinho, Carlos e Íris** que tentam resolver ou indicar o melhor caminho para os problemas do dia a dia.

Ao meu sobrinho **João Pedro**, que com toda sua alegria e inocência me faz esquecer dos problemas da vida de gente grande.

Às minhas irmãs **Stephanie e Patrícia**, que me fazem uma raiva danada, mas mesmo assim eu as amo muito.

À minha mãe **Veranisia Damasceno Rocha**, pelo beijo, abraço, amor, carinho, conforto, compreensão e paciência “muita” de todos os dias; TE AMO!

Ao meu pai **Edilberto Rocha Silveira**, que tem um jeito “ditador” especial de ser, mas sempre se esforçou muito para me proporcionar as melhores condições de vida; sempre me dizendo pra estudar (nem sempre eu escutava), e hoje eu agradeço pela insistência e oportunidade de poder concluir e seguir em frente com os meus estudos; pelo exemplo de “grande homem” que venceu na vida e chegou onde chegou; TE AMO!

À minha noiva e melhor amiga **Carolinne Reinaldo Pontes**, que sempre, sempre, sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me incentivando em todas as decisões e momentos difíceis; pelo amor e carinho de todos os dias; TE AMO, TE AMO, TE AMO!!!

À todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica ou para a execução deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

**Banco do Nordeste do Brasil - BNB**

**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**

## RESUMO

As vitafisalininas são lactonas esteroidais (C<sub>28</sub>), estruturalmente baseadas no esqueleto do ergostano, comumente encontradas em plantas da família Solanaceae. A fim de avaliar as propriedades anticâncer desses compostos, cinco vitafisalininas [O, F, M, N e (17S, 20R, 22R) -5 β, 6β :18,20-2-diepóxi β-4, 18 - diidróxi-1 - oxovita-3-24-enolido] isoladas da *Acnistus arborescens*, planta típica do nordeste brasileiro, foram analisadas utilizando diversos modelos biológicos. Todas as cinco vitafisalininas mostraram efeitos citotóxicos em linhagens de células tumorais, sendo a vitafisalinina O a mais potente e a vitafisalinina (17S, 20R, 22R) -5 β, 6β :18,20-2-diepóxi β-4, 18 - diidróxi-1-oxovita-3 - 24-enolido) a menos potente. Ao compararmos as estruturas químicas das vitafisalininas e suas atividades, foi observado que a ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 é essencial para os efeitos citotóxicos desses compostos. No entanto, as vitafisalininas (O, F e N) não mostraram qualquer especificidade para linhagens tumorais, já que também apresentaram efeitos citotóxicos e genotóxicos, semelhantes, em células leucêmicas (HL-60) e em células normais (PBMNC). A viabilidade celular e curvas de crescimento foram determinadas, para as linhagens de HL-60 e K-562, utilizando o ensaio de exclusão de azul de tripan. As vitafisalininas O, F, M e N reduziram o número de células viáveis de modo dose e tempo dependente, apresentando valores de CI<sub>50</sub> variando de 0,7 a 3,5 μM após 72 horas de incubação. Nas mesmas linhagens leucêmicas, as vitafisalininas também inibiram a síntese de DNA, causaram alterações morfológicas típicas de apoptose, e apenas na linhagem HL-60 induziram a ativação da caspase-3. Além disso, foi realizado, em células de HL-60, a análise da integridade da membrana celular, distribuição do ciclo celular, fragmentação de DNA e o potencial transmembrânico de mitocôndria, utilizando citometria de fluxo. Nestes experimentos, as vitafisalininas O e F, somente na concentração de 10 μM, reduziram o número de células viáveis para 60 e 40%, respectivamente. Na análise do ciclo celular, ambas vitafisalininas, na concentração de 5 μM, causaram um acúmulo de células na fase G2/M do ciclo celular. Ambas vitafisalininas também causaram um aumento significativo do número de células apresentando fragmentação de DNA. Os resultados da análise do potencial transmembrânico de mitocôndria mostraram um aumento na despolarização de 4,7, 17,5 e 9,1% causado pela vitafisalinina O e de 7,6, 16,6 e 5,6% pela vitafisalinina F. O efeito antitumoral (*in vivo*) da vitafisalinina F foi analisado em camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180, nas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg/dia por via intraperitoneal e na dose de 20 mg/Kg/dia por via oral. O crescimento do tumor foi inibido em mais de 76% na maior doses testada (20mg/Kg/dia), tanto por via intraperitoneal quanto por via oral. A análise histopatológica dos órgãos dos animais mostraram que a vitafisalinina F provoca efeitos tóxicos moderados, principalmente no fígado e nos rins, mas esses podem ser considerados como reversíveis. Tendo em vista todos estes dados, pode concluir-se que as vitafisalininas podem ser consideradas como uma classe emergente de novos compostos anticâncer.

Palavras-chave: Vitafisalinina. Apoptose. Solanaceae.

## ABSTRACT

Withaphysalins are C28-steroidal lactones structurally based on the ergostane skeleton commonly found in Solanaceae species. In order to evaluate the anticancer properties of these compounds, five withaphysalins [O, F, M, N and (17S,20R,22R)-5 $\beta$ ,6 $\beta$ : 18,20-diepoxy-4 $\beta$ ,18-dihydroxy-1-oxowitha-24-enolide] isolated from *Acnistus arborescens*, a plant from the northeastern Brazilian flora, were analyzed in several biological models. All five withaphysalins showed cytotoxic effects against tumor cell lines, being withaphysalin O the most potent and withaphysalin (17S,20R,22R)-5 $\beta$ ,6 $\beta$ : 18,20-diepoxy-4 $\beta$ ,18-dihydroxy-1-oxowitha-24-enolide, the less potent. Based on these results, it is shown that a double-bond between carbons 2 and 3 is essential for the cytotoxic activity of withaphysalins. Withaphysalins (O, F and N) did not show any specificity to tumor cell lines, showing similar cytotoxic and genotoxic effects against leukemic cells (HL-60) and normal cells (PBMC). Cell viability and growth curves of HL-60 and K-562 treated cells were determined using trypan blue exclusion assay, where all withaphysalins reduced the number of viable cells in a dose- and time-dependent fashion, with IC<sub>50</sub> values ranging from 0.7 to 3.5  $\mu$ M after 72 h of incubation. In HL-60 and K-562 cells, the withaphysalins inhibited DNA synthesis, induced morphological alterations, typical of apoptosis, and only in the HL-60 cell line, and they induced activation of caspase-3. Moreover, it was performed the analyzes of cell membrane integrity, cell cycle distribution, DNA fragmentation and the mitochondrial membrane potential using flow cytometry. In these experiments, withaphysalins O and F, only at concentration of 10 $\mu$ M, reduced the number of viable cells to 60 and 40% respectively. In the cell cycle analysis, both withaphysalins led to a cell cycle arrest at G2/M, at the concentration of 5 $\mu$ M. Cells treated with both withaphysalins also showed a significant increase in DNA fragmentation when compared to the negative control. Results of the mitochondrial transmembrane potential showed depolarization changes in accordance to the tested concentration (2.5, 5 and 10 $\mu$ g/mL) with 4.7, 17.5 and 9.1% for withaphysalin O and 7.6, 16.6 and 5.6% for withaphysalin F, respectively. The *in vivo* antitumor effects of withaphysalin F was performed in animals bearing the sarcoma 180 tumor, and at the highest dose tested (20mg/Kg/day), growth tumor was inhibited in 77%. Histopathological analysis of mice organs showed that withaphysalin F causes moderate toxic effects mostly in liver and kidney, but they may be considered reversible effects. Taking in account all these data, it can be concluded that withaphysalins could be considered as an emerging class of new anticancer compounds.

Key words: Withaphysalin. Apoptosis. Solanaceae

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> -	Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira, sem pele não melanoma.....	18
<b>Figura 2</b> -	Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homes/mulheres, estimadas para o ano de 2008.....	19
<b>Figura 3</b> -	Ilustração esquemática das fases do ciclo celular.....	21
<b>Figura 4</b> -	Ilustração esquemática das fases do ciclo celular e respectivas ciclinas e cdks.....	22
<b>Figura 5</b> -	(A) <i>Catharanthus roseus</i> e (B) estruturas químicas da vimblastina (1) vincristina (2), vindesina (3) e vinorelbina (4).....	25
<b>Figura 6</b> -	(A) <i>Podophyllum peltatum</i> L e (B) estruturas químicas da podofilotoxina, (5), etoposídeo (6) e tenoposídeo (7).....	27
<b>Figura 7</b> -	(A) <i>Camptotheca acuminata</i> e (B) estruturas químicas da camptotecina (8), topotecan (9) e irinotecan (10).....	29
<b>Figura 8</b> -	A) <i>Taxus baccata</i> e (B) estruturas químicas do paclitaxel (11) e docetaxel (12).....	31
<b>Figura 9</b> -	Estruturas químicas básicas dos sete grupos de vitaesteróides.....	33
<b>Figura 10</b> -	<i>Acnistus arborescens</i> L. Schlecht.....	35
<b>Figura 11</b> -	Estruturas dos compostos Vitaferina A (13), Vitacnistina (14), 7 $\beta$ -Acetóxivitanolido D (15), 7 $\beta$ ,16 $\alpha$ -Diacetóxivitanolido D (16), 4-Deóxi-7 $\beta$ ,16- $\alpha$ -diacetóxivitanolido D (17), Vitafisalina F (18), Vitafisalina M (19) Vitafisalina N (20), Vitafisalina O (21) e Vitafisalina (17S,20R,22R)-5 $\beta$ ,6 $\beta$ :18,20-2-diepóxi-4 $\beta$ ,18-diidróxi-1-oxovita-3-24-enolido (22) isolados da <i>A. arborescens</i> .....	36
<b>Figura 12</b> -	Curva de crescimento celular da linhagem HL-60 (leucemia humana) tratada com as vitafisalinas O (A), F (B), M (C) e N (D). Viabilidade celular.....	68
<b>Figura 13</b> -	Curva de crescimento celular da linhagem K-562 (leucemia humana) tratada com as vitafisalinas O (A), F (B), M (C) e N (D). Viabilidade celular.....	69
<b>Figura 14</b> -	Curva de crescimento celular da linhagem HL-60 (leucemia humana) tratada com as vitafisalinas O (A), F (B), M (C) e N (D). Número de células.....	70

<b>Figura 15</b> - Curva de crescimento celular da linhagem K-562 (leucemia humana) tratada com as vitafisalinas O (A), F (B), M (C) e N (D). Número de células.....	71
<b>Figura 16</b> - Freqüência de dano das vitafisalinas O, M e N sobre células de PBMC (A) e HL-60 (B), analisado pelo teste do cometa após 24 horas de incubação.....	73
<b>Figura 17</b> - Índice de dano das vitafisalinas O, M e N sobre células de PBMC (A) e HL-60 (B), analisado pelo teste do cometa após 24 horas de incubação...	74
<b>Figura 18</b> - Efeito das vitafisalinas O, M e N sobre células de (A) HL-60 e (B) K562, analisado por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina após 24 horas de incubação.....	77
<b>Figura 19</b> - Efeito das vitafisalinas O, M e N sobre a ativação da caspase-3 em células de HL-60 após 24 horas de incubação	78
<b>Figura 20</b> - Morfologia de células da linhagem HL-60 (leucemia) após 24h de incubação, coradas por Hematoxilina/Eosina e visualizadas por microscopia óptica.....	80
<b>Figura 21</b> - Morfologia de células da linhagem HL-60 (leucemia) após 24h de incubação, coradas por May-Grunwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica.....	81
<b>Figura 22</b> - Efeito das vitafisalinas F e O sobre a viabilidade (integridade de membrana) de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.....	82
<b>Figura 23</b> - Efeito das vitafisalinas F e O sobre a concentração de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.....	83
<b>Figura 24</b> - Efeito das vitafisalinas F e O sobre a distribuição do ciclo celular (eixo x: intensidade de fluorescência; eixo y: número de células) em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.....	85
<b>Figura 25</b> - Efeito das vitafisalinas F e O sobre a fragmentação de DNA de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.....	86
<b>Figura 26</b> - Efeito das vitafisalinas F e O sobre o potencial transmembrânico de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123 após 24 horas de incubação.....	87

<b>Figura 27</b> - Efeito da vitafisalina F nas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg/dia, i.p. e 20 mg/Kg/dia, v.o. sobre a proliferação tumoral de camundongos ( <i>Mus musculos</i> ) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento.....	89
<b>Figura 28</b> - Fotomicrografia dos tumores de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento.....	92
<b>Figura 29</b> - Fotomicrografia do fígado de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento.....	93
<b>Figura 30</b> - Fotomicrografia dos rins de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento.....	94
<b>Figura 31</b> - Fotomicrografia do baço de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento.....	95
<b>Figura 32</b> - Estruturas químicas das vitafisalinas estudadas. As diferenças estruturais entre os compostos se encontram em destaque.....	101

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade in vitro.....	47
<b>Tabela 2 -</b>	Atividade citotóxica in vitro de vitafisalinas isoladas da <i>Acnistus arborescens</i> em linhagens de células tumorais.....	65
<b>Tabela 3 -</b>	Atividade citotóxica in vitro de vitafisalinas isoladas da <i>Acnistus arborescens</i> em PBMC.....	66
<b>Tabela 4 -</b>	Atividade citotóxica das vitafisalinas F, O, M e N em células leucêmicas das linhagens HL-60 (leucemia promielocítica) e K562 (leucemia mielocítica crônica).....	72
<b>Tabela 5 -</b>	Efeito das vitafisalinas O, M e N na incorporação do 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) em células leucêmicas de HL-60 e K562 depois de 24 horas de incubação.....	75
<b>Tabela 6 -</b>	Efeito das vitafisalinas F e O sobre a distribuição do ciclo celular em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. ....	84
<b>Tabela 7 -</b>	Efeito das vitafisalinas F e O sobre a distribuição do ciclo celular em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.....	91
<b>Tabela 8 -</b>	Resumo dos resultados encontrados no estudo da atividade citotóxica das vitafisalinas.....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	Analisis of Variance (Análise de variância)
<b>BE/LA</b>	Brometo de Etídio / Laranja de Acridina
<b>BrdU</b>	Bromodeoxiuridina
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração Inibitória Média
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>E.P.M.</b>	Erro Padrão da Média
<b>h</b>	Hora
<b>H/E</b>	Hematoxilina/Eosina
<b>L</b>	Litro
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>min</b>	Minuto
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
<b>RPMI</b>	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
<b>TBS</b>	Tris Buffer Solution (Tampão Tris)
<b>U</b>	Unidade
<b>UV</b>	Ultra-Violeta
<b>i.p.</b>	Via Intraperitoneal
<b>v.o.</b>	Via Oral

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	17
1.1 Câncer.....	17
1.2 Produtos naturais com atividade anticâncer.....	23
1.3 Vitaesteróides.....	32
1.4 <i>Acnistus arborescens</i> L. Schlecht .....	34
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 Geral.....	38
2.2 Específicos.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 Materiais.....	40
3.2 Métodos.....	46
3.2.1 Obtenção das vitafisalinas .....	46
3.2.2 Cultivo das células .....	46
3.2.3 Avaliação da atividade citotóxica em células tumorais <i>in vitro</i> – MTT .....	47
3.2.4 Avaliação da atividade citotóxica em células normais <i>in vitro</i> – Alamar Blue.....	48
3.2.5 Avaliação da atividade antiproliferativa em células leucêmicas (Curva de crescimento celular) - exclusão por azul de tripan.....	49
3.2.6 Avaliação da atividade genotóxica em células normais e leucêmicas. ....	50
3.2.7 Inibição da síntese de DNA – BrDU.....	52
3.2.8 Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina .....	53
3.2.9 Determinação da ativação da caspase-3 .....	55
3.2.10 Análise morfológica – Coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E) .....	56
3.2.11 Análise morfológica - Coloração por May-Grunwald-Giemsa .....	56
3.2.12 Determinação da Integridade da Membrana.....	57
3.2.13 Avaliação do ciclo celular e fragmentação de DNA.....	58
3.2.14 Determinação do Potencial Transmembrânico de Mitocôndria .....	59
3.2.15 Avaliação da atividade antitumoral da vitafisalina F em camundongos .....	60
3.2.15.1 Achados Histopatológicos .....	62
4 RESULTADOS .....	64
4.1 Avaliação da atividade citotóxica em células tumorais <i>in vitro</i> – MTT .....	64
4.2 Avaliação da atividade citotóxica em células normais <i>in vitro</i> – Alamar Blue.....	66
4.3 Avaliação da atividade antiproliferativa em células leucêmicas (Curva de crescimento celular) - exclusão por azul de tripan.....	66
4.4 Avaliação da atividade genotóxica em células normais e leucêmicas. ....	72
4.5 Inibição da síntese de DNA – BrDU.....	75
4.6 Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina .....	75
4.7 Determinação da ativação da caspase-3 .....	78
4.8 Análise morfológica – Coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E) e May-Grunwald-Giemsa.....	79
4.9 Determinação da Integridade da Membrana.....	82
4.10 Avaliação do ciclo celular e fragmentação de DNA.....	83
4.11 Determinação do Potencial Transmembrânico de Mitocôndria .....	87
4.12 Atividade da atividade antitumoral da vitafisalina F em camundongos .....	88
4.12.1 Análise histopatológica dos órgãos.....	90
5 DISCUSSÃO.....	98
6 CONCLUSÃO.....	111
REFERÊNCIAS .....	113

# *Introdução*

# 1 INTRODUÇÃO

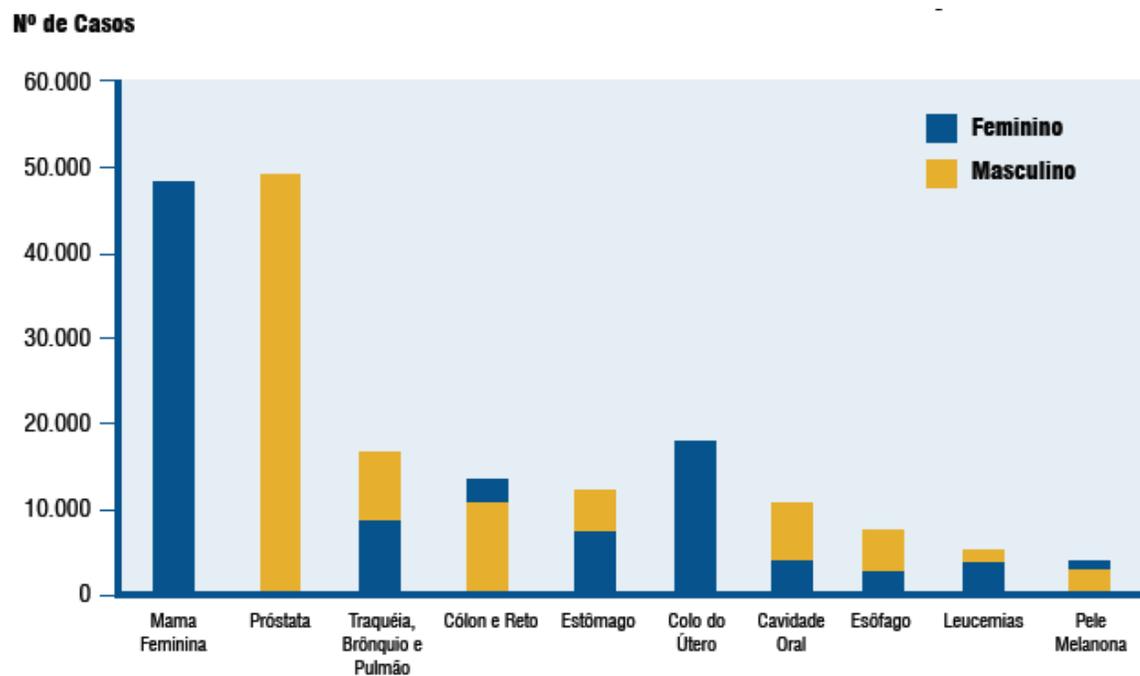
## 1.1 Câncer

A palavra câncer se refere a uma variedade de doenças, em que sua característica principal é o crescimento descontrolado das células. Existem mais de 100 tipos de câncer, que diferem de acordo com o tipo de célula, tecido ou órgão em que ocorrem. Geralmente as células cancerosas levam a formação de uma massa tumoral, podendo essa ser benigna ou maligna (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2008).

As primeiras descrições sobre câncer em humanos datam de 3000-1500 a.C. quando foram encontrados sete papiros no Egito, e entre estes, o de George Elbers e o de Edwin Smith, descreviam oito casos de tumor ou úlceras de mama. (REDDY *et al.*, 2003). No Egito também foram encontradas as primeiras evidências de tumor em esqueletos de múmias fossilizadas que viviam na Era do Bronze (1900-1600 a.C.). Em torno de 460-370 a.C., ao analisar vários tipos de tumor, Hipócrates comparava a morfologia destes com a forma de um caranguejo, daí a criação do termo *cancer* em latim, que se refere ao termo grego *karkinos* (caranguejo). O termo câncer foi usado pela primeira vez por Galeno (138-201 d.C.) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

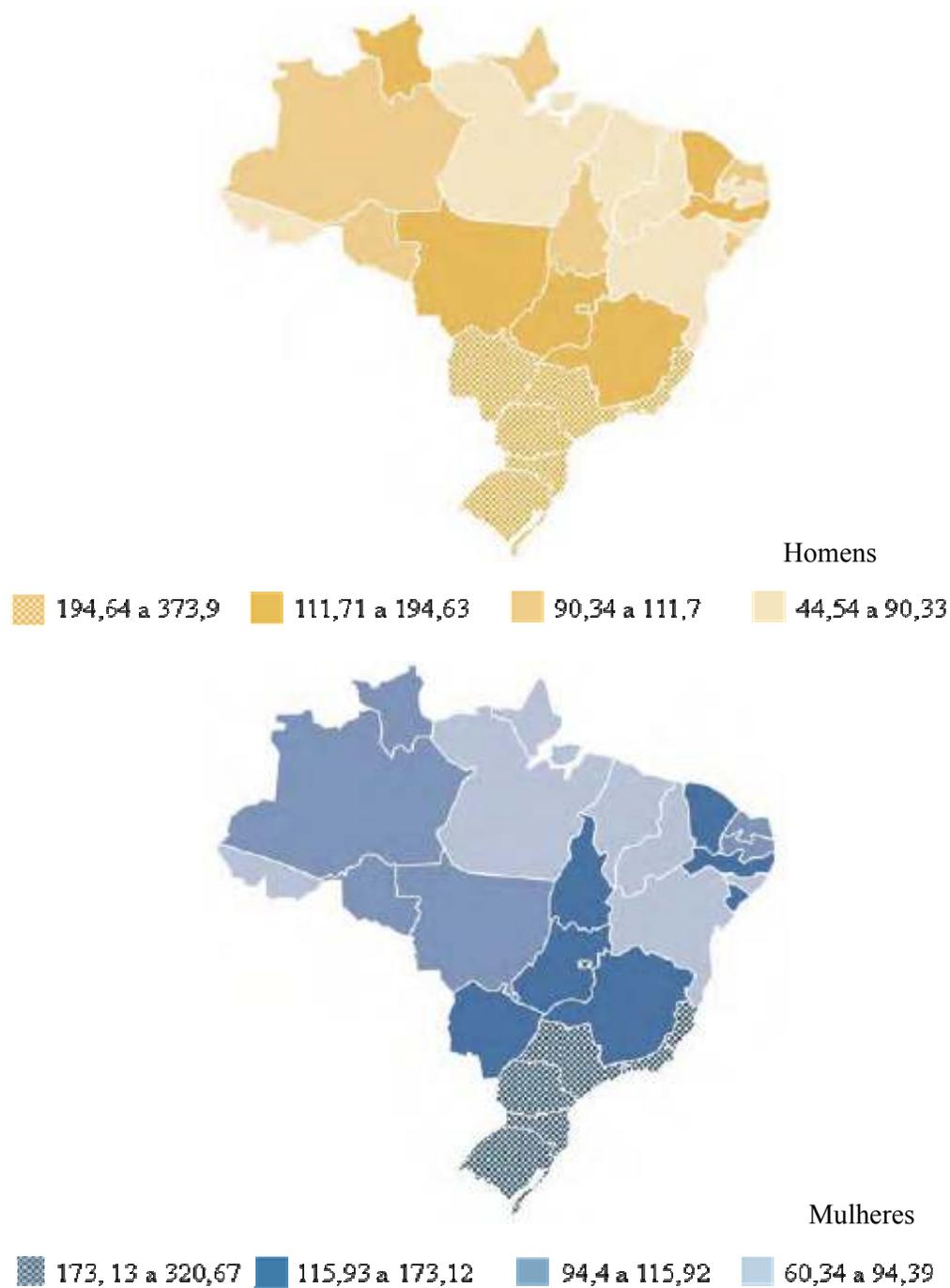
Hoje em dia o câncer é uma das maiores causas de morte no mundo, atrás apenas das mortes causadas por doenças cardiovasculares. Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes no mundo, 7,6 milhões (13%) foram causadas por câncer. No Brasil, o número de mortes causadas por câncer em 2005 foi de 190.000, representando 14,8% do número total de casos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Para o ano de 2008, estimativas indicam que ocorrerão 466.730 novos casos de câncer no Brasil, sendo 231.860 para o sexo masculino e 234.870 para o sexo feminino. O tipo de câncer mais comum, em ambos os sexos, é o de pele não melanoma, com uma incidência de 114 mil novos casos por ano. Sem levar em consideração o câncer de pele, os cânceres de próstata, pulmão e estômago são os tipos mais comuns entre os homens (81.000 casos), enquanto que em mulheres os tipos mais comuns são os de mama e colo do útero (68.000 casos). Apesar do câncer de próstata ter maior incidência entre os homens, o câncer de pulmão ainda é o tipo que mais mata no mundo (Figuras 1 e 2) (BRASIL, 2007).



Fonte: (BRASIL, 2007)

**Figura 1** - Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira, sem pele não melanoma.



Fonte: (BRASIL, 2007)

**Figura 2** - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homes/mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação (todas as neoplasias, exceto as de pele não melanoma).

O câncer é considerado uma doença genética, onde o agente carcinógeno quando incide sobre uma célula normal, causa alterações na molécula de DNA. Essas alterações são denominadas de mutação. Qualquer célula normal pode sofrer alterações no seu material genético. Normalmente essa alteração é reparada, ou então a célula entra em processo de morte. Na verdade, para que a mutação de fato ocorra, é necessário que o DNA alterado seja replicado e passado para as células filhas. Na carcinogênese, não apenas uma mutação, mas uma série de eventos acumulados ao longo dos anos é necessária para desencadear esse processo (CORTNER; WOUDE, 1997).

O processo de carcinogênese inclui a iniciação, promoção e progressão tumoral. O primeiro estágio envolve o contato entre o agente carcinógeno e o DNA das células, levando a formação de uma célula transformada. A mutação, por si só, não é capaz de causar câncer, podendo essa permanecer inativa e levar vários anos para se manifestar. O segundo estágio da carcinogênese envolve a ação de substâncias promotoras de tumores, como os ésteres de forbol, que induzem a expressão de genes envolvidos no crescimento celular. Aparentemente, esses promotores só agem em células que já sofreram algum tipo de mutação e exigem um contato por um período longo e contínuo para que essas células se tornem malignas. No terceiro estágio, o de progressão, já começam a aparecer as primeiras manifestações clínicas da doença, caracterizada pelo crescimento descontrolado das células mutadas e conseqüente formação do tumor (DONNICI *et al.*, 2005).

As células tumorais possuem defeitos nos mecanismos que regulam a proliferação celular normal e a homeostase. Esses defeitos podem ser resumidos em seis alterações características de células tumorais, como: auto suficiência na sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade à sinais para inibição do crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial de replicação ilimitado, angiogênese e a capacidade de invasão e metastatização para outros tecidos (HANAHAN; WEINGER, 2000).

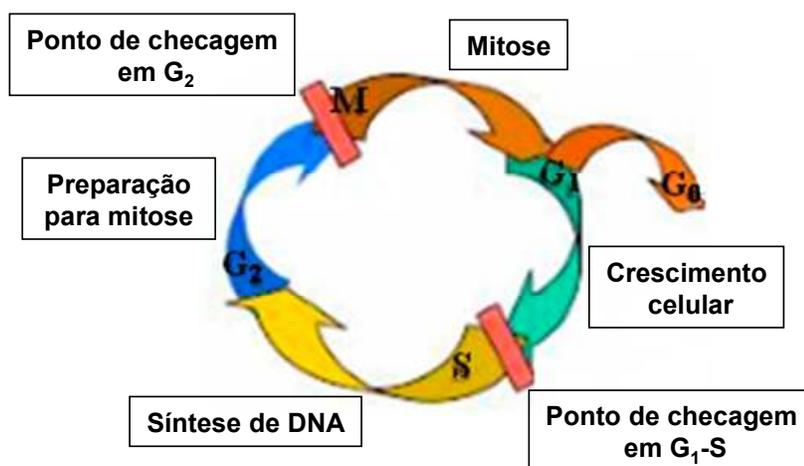
Muitas dessas alterações se devem, principalmente, às mutações que ocorrem em dois tipos de genes especiais, denominados de oncogenes e genes supressores tumorais, os principais reguladores da proliferação celular (BISHOP, 1987).

Os oncogenes são os responsáveis pelo controle do crescimento celular. Em células normais os oncogenes, são chamados de proto-oncogenes, que ao sofrerem alguma mutação passam a ter sua expressão aumentada. Uma característica dos oncogenes é que eles agem de forma dominante na célula, onde uma mutação em um dos alelos já é suficiente para alterar o funcionamento normal do gene (BISHOP, 1987). Já os genes supressores tumorais

necessitam que as duas cópias do gene sofram mutação, levando a perda da função destes (BISHOP, 1987).

Dependendo da necessidade do organismo novas células podem ser formadas, seja para o reparo de tecidos lesionados ou simplesmente para substituir células velhas e mortas. Mas as vezes esse processo sofre alterações, e ocorre então a formação de novas células, sem que estas sejam necessárias, ou então células velhas e/ou danificadas, que deveriam morrer, por algum motivo não morrem. As mutações nos oncogenes e nos genes supressores tumorais são as responsáveis por essa alteração no balanço entre proliferação e morte celular.

A proliferação das células dá-se através de uma seqüência ordenada de eventos, em que ocorrem a duplicação do material genético e posterior divisão em duas células filhas. Esses dois processos resumem as duas principais fases do ciclo celular, onde ocorre a duplicação do DNA na *fase S* (S de *síntese*), e a divisão celular que ocorre na *fase M* (M de *mitose*) (FISHER *et al.*, 2004). Além dessas duas fases, existe também um intervalo entre as fases M e S, chamada de fase G<sub>1</sub>, onde vai ocorrer a síntese de várias enzimas necessárias para a fase S, e um intervalo entre as fases S e M, que é a fase G<sub>2</sub>, onde também irá ocorrer a síntese de proteínas necessárias para a fase M. Assim, o ciclo celular é composto por quatro fases seqüenciais, as fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M. Logo depois da divisão celular, na fase M, as células podem entrar em um estado de quiescência, também chamada de fase G<sub>0</sub>, onde a taxa metabólica das células é mantida estável, aguardando por sinais extracelulares que sejam favoráveis à sua proliferação (GUO; HAY, 1999) (Figura 3).

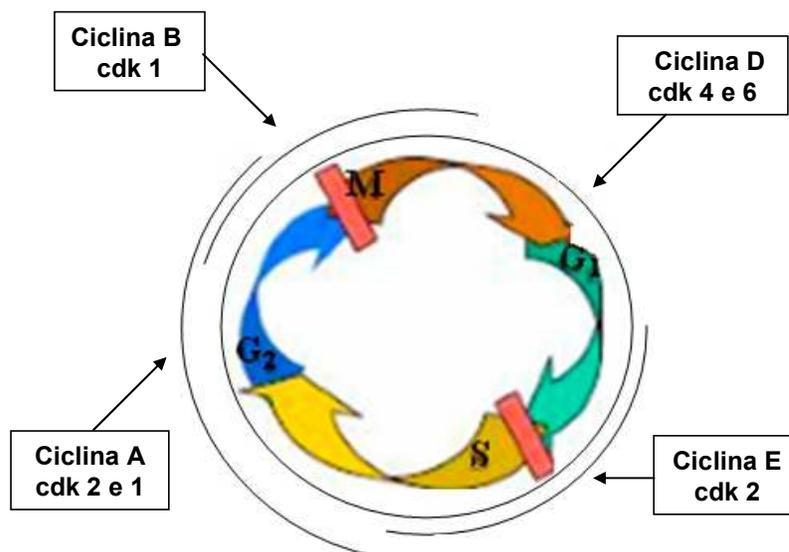


**Figura 3** - Ilustração esquemática das fases do ciclo celular.

A progressão do ciclo celular é controlada por duas famílias de proteínas, as ciclinas e as quinases dependentes de ciclina (*cdks*, *cyclin dependent kinases*). As *cdks* estão expressas constitutivamente nas células, e como o próprio nome já diz, elas precisam estar ligadas às ciclinas para se tornarem ativas. Por outro lado, as ciclinas são sintetizadas e degradadas em cada fase do ciclo celular, de modo que o complexo ciclina-cdk se torne específico pra cada uma dessas fases (COLLINS *et al.*, 2005) (Figura 4).

Os fatores de crescimento estimulam a entrada das células no ciclo celular através do aumento dos níveis da ciclina D, que se ligam as *cdks* 4 e 6, no início da fase  $G_1$ . A ligação da ciclina E a *cdk2* promove a passagem da fase  $G_1$  para a fase S. Durante a fase S a ciclina A está ligada a *cdk2*, e na transição para  $G_2$  se liga a *cdk1*. A ligação da ciclina B com a *cdk1* surge no final da fase  $G_2$  e continua até a entrada da célula em mitose (LUNDBERG; WEINBERG, 1999).

Os complexos ciclinas-*cdks* controlam o ciclo celular através da regulação dos chamados pontos de checagem (checkpoints). Qualquer dano no DNA e/ou mal funcionamento de organelas e estruturas essenciais para o ciclo celular, ocasionam o atraso ou a parada desse ciclo, para que o defeito possa ser reparado, caso contrario a célula entraria em processo de morte (LUNDBERG; WEINBERG, 1999).



**Figura 4** - Ilustração esquemática das fases do ciclo celular e respectivas ciclinas e *cdks*.

## 1.2 Plantas medicinais com atividade anticâncer

A milhares de anos, os produtos naturais vêm sendo utilizados na prevenção e cura de doenças. Esses produtos naturais têm se originado de diversas fontes, incluindo um grande número de plantas, animais e microorganismos (NEWMAN *et al.*, 2000).

No período de 1981 a 2007, de todas as novas entidades químicas aprovadas pelo 'US Food and Drug Administration (FDA), 63 % eram produtos naturais, derivados de produtos naturais ou eram moléculas sintéticas com estruturas semelhantes as dos produtos naturais, e muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos e cosméticos. (NEWMAN; CRAGG, 2007). Nos anos de 2001 e 2002, aproximadamente 25 % dos medicamentos mais vendidos no mundo eram produtos naturais ou derivados destes (BUTLER, 2004). Um estudo realizado, analisando as prescrições dos médicos, mostrou que o uso desses medicamentos pode ser utilizado no tratamento de 87 % de todas as doenças humanas como agentes antimicrobianos, anticâncer, anticoagulantes, antiparasitários, entre outros (NEWMAN *et al.*, 2003).

Na área do cancer, esses compostos tem sido de fundamental importancia, já que 60 % dos medicamentos anticancer utilizados na clínica são de origem natural (NEWMAN, 2003). Dentre as diversas fontes de produtos naturais, as espécies vegetais têm contribuído de forma bastante significativa para o fornecimento de novos compostos anticâncer. Entre esses compostos estão a vimblastina, vincristina, os derivados da camptotecina, topotecan e irinotecan, etoposideo derivado da podofilotoxina e o paclitaxel (Taxol®) (CRAGG; NEWMAN, 2005).

A vimblastina (1) e a vincristina (2) foram isoladas da planta *Catharanthus roseus*, conhecida como “pervinca” de Madagascar, pertencente a família *Apocinaceae*, que durante anos vinha sendo utilizada na medicina popular por possuir vários efeitos farmacológicos (Fig. 5). Peckolt (1910) reportou que, no Brasil, a infusão das folhas era utilizada em dores de dente, no controle da hemorragia e na limpeza de ferimentos. Outras espécies relacionadas também possuíam seu uso medicinal, como no tratamento de úlcera diabética (NOBEL, 1958 *apud* JOHNSON *et al.*, 1960) como hipoglicemiante oral, antimicrobiano e antihipertensivo (CHOPRA, 1959 *apud* JOHNSON *et al.*, 1960).

Na década de 1950, Clark e Robert Nobel se interessaram pelas propriedades farmacológicas da *C. roseus*, já que na Jamaica, na falta de insulina, as folhas da planta eram utilizadas no tratamento da diabetes (CHOPRA, 1959 *apud* JOHNSON *et al.*, 1960). Os cientistas então observaram que quando os ratos eram tratados com extratos da planta *C.*

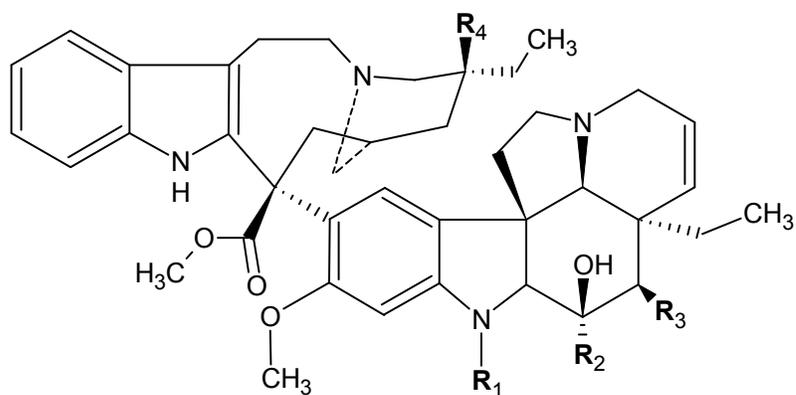
*roseus* para o tratamento de diabetes melitos, estes apresentavam granulocitopenia e mielossupressão. Depois daí, Clark e Robert junto com o químico Charles T. Beer e Gordon Svoboda, da indústria farmacêutica Lilly, conseguiram isolar dois alcalóides, a vincalécoblastina e a leurocristina, que depois tiveram seus nomes mudados para vimblastina e vincristina respectivamente (Figura 5) (SVOBODA, 1961 *apud* JOHNSON *et al.*, 1960). Logo depois mais dois novos compostos foram semi-sintetizados, vindesina (3) e vinorelbina (4) (Figura 5), que já fazem parte do tratamento quimioterápico do câncer, e mais recentemente vinflunine, que está em estudos clínicos de fase 3 na Europa (FAHY *et al.*, 1997; KRZAKOWSKI *et al.*, 2007).

Os alcalóides da vinca se ligam à tubulina, impedindo a polimerização dos microtúbulos e conseqüente formação do fuso mitótico, resultando na parada do ciclo celular durante a mitose.

A



B



Vimblastina (1) –  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$ ;  $R_3 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$ ;  $R_4 = \text{OH}$

Vincristina (2) –  $R_1 = \text{COH}$ ;  $R_2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$ ;  $R_3 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$ ;  $R_4 = \text{OH}$

Vindesina (3) –  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{CONH}_3$ ;  $R_3 = \text{OH}$ ;  $R_4 = \text{OH}$

Vinorelbina (4) –  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$ ;  $R_3 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$ ;  $R_4 = \text{H}$

**Figura 5** - (A) *Catharanthus roseus* e (B) estruturas químicas da vimblastina (1) vincristina (2), vindesina (3) e vinorelbina (4).

Podofilotoxinas são lignanas encontradas principalmente em plantas do gênero *Podophyllum* (Podophyllaceae), que há séculos vem sendo utilizado devido suas propriedades medicinais. Catersby, em 1731, foi o primeiro a descrever sobre plantas do gênero *Podophyllum*, onde relata que a planta *Podophyllum peltatum* L., também conhecida como “mandrágora”, era utilizada pelos índios americanos devido a seus efeitos eméticos, catárticos e anti-helmínticos (IMBERT, 1998)

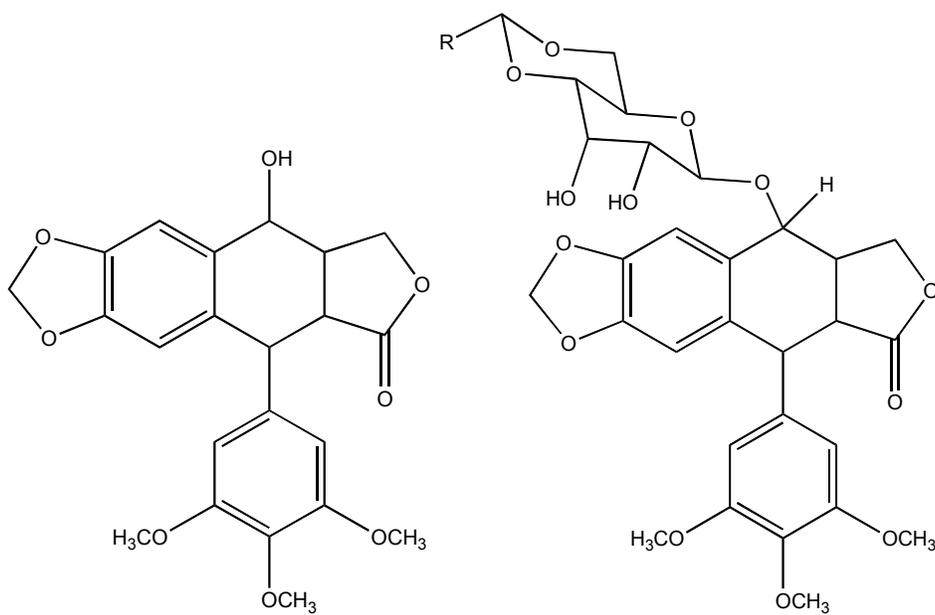
A podofilotoxina (5) atua ao inibir a polimerização dos microtúbulos e também a topoisomerase II (Fig. 6) (CORTESE *et al.*, 1977). Com o pensamento de que a podofilotoxina pudesse ser usada para o tratamento do câncer, vários ensaios clínicos foram realizados, mas os efeitos tóxicos causados no sistema gastrintestinal não deixavam os estudos irem adiante. Foi então que, à procura por derivados menos tóxicos, várias alterações foram feitas na estrutura da podofilotoxina, levando a obtenção de dois compostos semi-sintéticos, o VP-16 e o VM-26, que depois tiveram seus nomes modificados para etoposídeo (6) e tenoposídeo (7), respectivamente (Figura 6) (STAHELIN *et al.*, 1991). Essas modificações também alteraram o mecanismo de ação desses dois compostos, que passaram a possuir somente a atividade inibitória sobre a topoisomerase II, já que o anel trimetoxilado da podofilotoxina, responsável pela ação sobre a tubulina, tinha um dos seus grupamentos substituídos por uma hidroxila (SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

O etoposídeo (Vepesid®) possui uma atividade de amplo espectro, se mostrando ativo em uma grande variedade de cânceres, como: câncer de testículo, carcinoma de ovário, diferentes tipos de câncer de pulmão, leucemias, linfomas, sarcomas, melanomas e câncer de colon. O tenoposídeo (Vumon®), que é mais potente que o etoposídeo, também possui um amplo espectro de atividade, se mostrando ativo contra cânceres de cérebro, leucemia linfocítica e linfoblástica, mieloma e linfoma non-Hodgkin (GORDALIZA *et al.*, 2000).

A



B



Podofilotoxina (5)

Etoposídeo (6) – R = CH<sub>3</sub>Tenoposídeo (7) – R = 

**Figura 6** - (A) *Podophyllum peltatum* L e (B) estruturas químicas da podofilotoxina, (5), etoposídeo (6) e tenoposídeo (7).

A camptotecina (**8**) é um alcalóide isolado da *Camptotheca acuminata*, planta nativa da China, também conhecida como “planta do amor” (WALL *et al.*, 1966) (Fig. 7). Esse composto logo despertou o interesse dos cientistas, por possuir forte efeito contra a linhagem leucêmica L1210 de ratos (*in vivo*), mas logo apareceram problemas com a insolubilidade da droga em água. Em 1970 alguns ensaios clínicos foram realizados com a droga sendo solubilizada em solução salina, mas os efeitos observados não foram os mesmos (GOTTLIEB *et al.*, 1970). Em seguida, através de estudos de estrutura-atividade, descobriu-se que um anel de lactona era importante para o seu efeito antitumoral, e que este estava sendo quebrado quando a droga era dissolvida em solução salina, diminuindo o seu efeito e aumentando sua toxicidade (MUGGIA *et al.*, 1972). Em 1974 a camptotecina foi retirada dos ensaios clínicos.

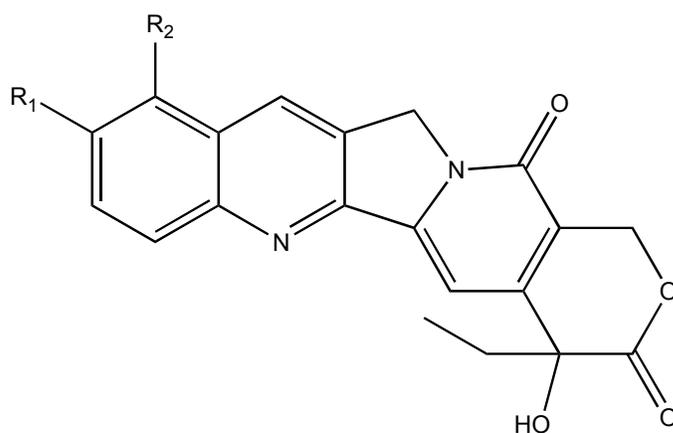
O interesse pela camptotecina voltou em 1985, quando descobriram que a enzima topoisomerase I era o seu principal alvo na célula. As topoisomerasas (tipo I e tipo II) são enzimas responsáveis pelo relaxamento do DNA, e a camptotecina se liga a esse complexo DNA-topoisomerase, deixando-o estável, e impedindo que as duas fitas do DNA se separem e possam então ser replicadas e transcritas (HSIANG *et al.*, 1985). Até então, a camptotecina não era utilizada na clínica devido sua baixa solubilidade em água, mas algumas modificações estruturais levaram a descoberta de dois análogos solúveis em água, o irinotecan (**9**) e o topotecan (**10**) (SAWADA *et al.*, 1991; KINGSBURY *et al.*, 1991) (Figura 7).

Em 1996 o uso do topotecan (Hycantin, GlaxoSmithKline) foi aprovado pelo FDA para uso na terapia contra câncer de ovário, e em 2000 o irinotecan (Camptosar, Pfizer) foi aprovado para o uso no tratamento de câncer cólon retal (ULUKAN; SWAAN, 2002).

A



B



Camptotencina (**8**) – R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = H

Topotecan (**9**) – R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> =

Irinotecan (**10**) – R<sub>1</sub> = ; R<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

**Figura 7** - (A) *Camptotheca acuminata* e (B) estruturas químicas da camptotecina (**8**), topotecan (**9**) e irinotecan (**10**).

O paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) (11), um diterpenoide isolado da planta *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), surgiu de um programa de “screening”, do NCI, em busca por novos compostos com potencial atividade anticâncer (Figura 8). O paclitaxel foi isolado na sua forma pura, pela primeira vez, em 1966, e em 1971 teve sua estrutura elucidada (WANI *et al.*, 1971). Apesar de, na época, o paclitaxel ter mostrado resultados promissores, alguns problemas o impediam de entrar para os ensaios pré-clínicos. Um deles era o baixo rendimento da substância pura que era extraído da planta, já que eram precisas mais de 4000 árvores para a obtenção de apenas 360g de taxol, e que seriam necessários mais 38000 árvores para que se pudesse obter 25Kg de taxol para os testes clínicos. Isso gerou uma série de discussões, tanto na população como entre os próprios cientistas, que questionavam entre a conservação da natureza e o direito dos pacientes de receberem um novo tratamento, já que o taxol era supostamente uma droga em potencial para se tornar um quimioterápico no tratamento do câncer. Outro problema era o fato da estrutura do taxol ser bastante complexa para que pudesse então ser sintetizada, além do fato de ser pouco solúvel em água. Apesar desses problemas, os cientistas persistiram em testar o taxol em várias linhagens de tumor sólido de humanos, em ratos imunossuprimidos, incluindo linhagens de cólon e mama. Os resultados desses testes foram impressionantes, o que fez com que os estudos se estendessem, já prevendo o início dos ensaios clínicos (KINGSTON, 2007).

Em 1979, ocorreu uma das mais importantes descobertas na história do desenvolvimento do paclitaxel, quando Susan Horwitz descobriu que esse composto agia como um promotor da polimerização da tubulina (SCHIFF *et al.*, 1979), o que despertou ainda mais o interesse dos pesquisadores, já que outras drogas como a vinblastina e a vincristina agiam justamente de modo oposto, inibindo a polimerização da tubulina (ZAVALA *et al.*, 1978)

Durante a década de 1980, o paclitaxel entrou para os testes clínicos de fase I, II e III, o que levou a descoberta de seu potente efeito contra câncer de ovário. A partir daí mais recursos eram necessários para tornar o paclitaxel em uma droga comercial, mas como isso não era possível para o NCI, a droga foi entregue para uma indústria farmacêutica (Bristol-Myers Squibb) por intermédio de uma cooperação (Cooperative Research and Development Agreement- CRADA), e como o paclitaxel ainda não havia sido patenteado, foi concedida à BMS 7 anos de exclusividade na comercialização do taxol (WALL; WANI, 1995)

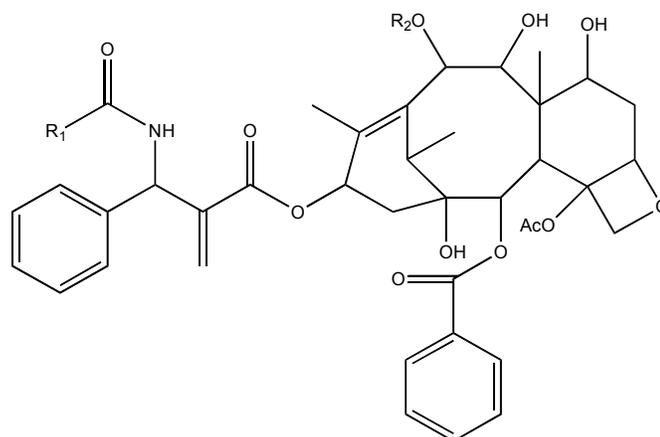
No início da década de 1990, a dificuldade na obtenção de quantidade suficiente de taxol foi resolvida, quando Portier e colaboradores conseguiram isolar da planta

*Taxus baccata*, uma planta abundante na Europa, o composto 10-diacetilbacatina, que podia ser convertido em paclitaxel. Essa foi a planta escolhida pela BMS para a obtenção de paclitaxel, em vez da *T. Brevifolia* (KINGSTON, 2007). A partir de então, várias alterações foram feitas na estrutura do taxol em busca de compostos mais potentes, o que acabou levando a descoberta do docetaxel (**12**), que logo entrou para os ensaios clínicos de fase I, e em 1996 foi aprovado pelo FDA para o tratamento de câncer de mama, com o nome comercial de Taxotere<sup>®</sup> (KINGSTON, 2007) (Figura 8).

A



B



Paclitaxel (**11**) –  $R_1 =$   ;  $R_2 = \text{COCH}_3$   
 Docetaxel (**12**) –  $R_1 = \text{OC}(\text{CH}_3)$ ;  $R_2 = \text{H}$

**Figura 8** - (A) *Taxus baccata* e (B) estruturas químicas do paclitaxel (**11**) e docetaxel (**12**).

Com o passar dos anos, várias técnicas vem sendo utilizadas para a obtenção de novos compostos, e os resultados dessas é o desenvolvimento de novas drogas com potencial anticâncer. O grande problema desses compostos é a dificuldade de serem sintetizados, e de, na maioria das vezes, apresentarem efeitos adversos severos, já que não possuem seletividade pelas células tumorais e acabam que atingindo também as células normais.

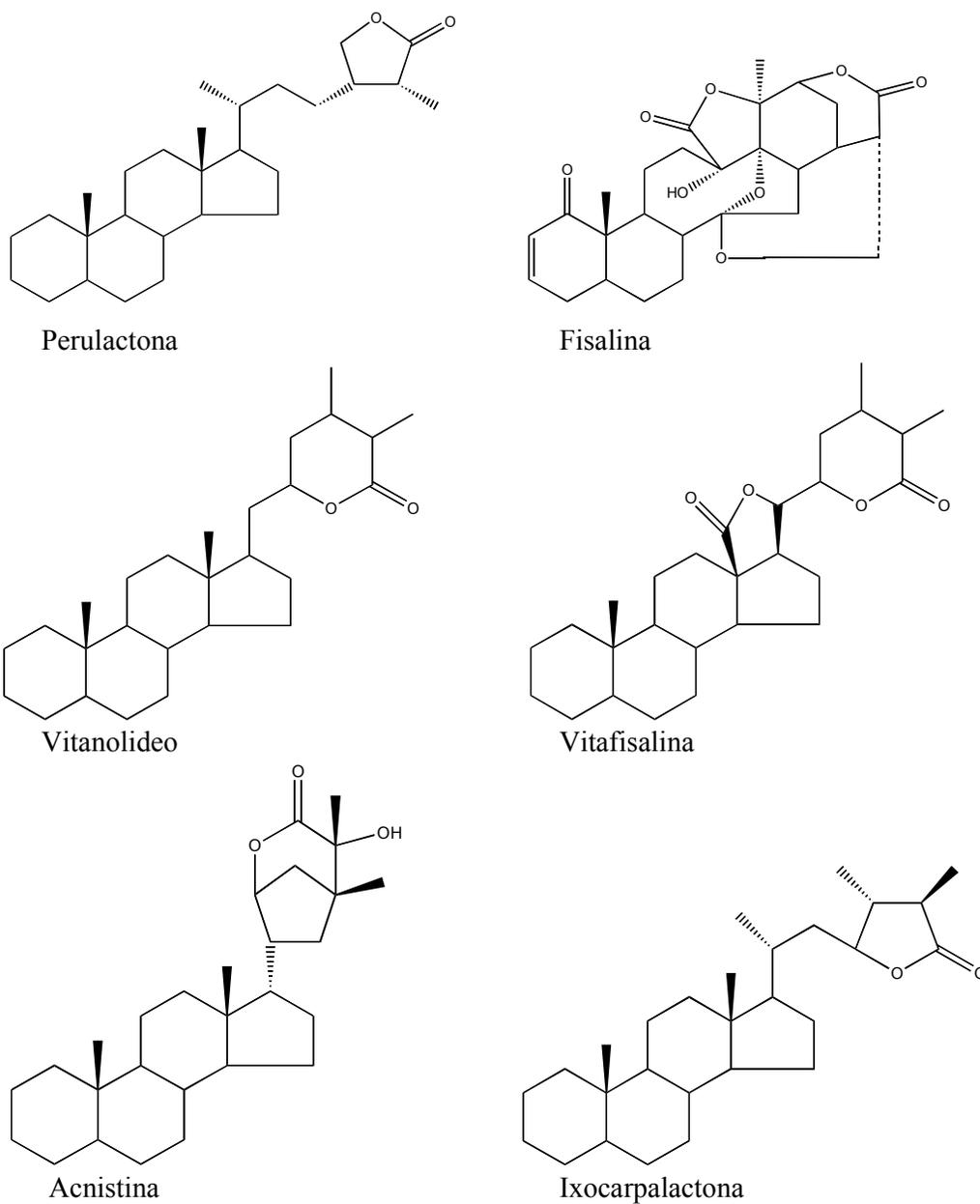
Embora um grande número de drogas anticâncer, a partir de plantas ou derivados deles, tenha sido desenvolvido, a busca por drogas mais seguras, econômicas e mais eficazes ainda é um desafio.

### 1.3 Vitaesteróides

Os vitaesteróides constituem uma classe de lactonas esteroidais, pois possuem uma função lactona em C<sub>26</sub>, com estruturas baseadas no esqueleto de ergostano. A estrutura desses compostos é polioxigenada, o que leva as alterações naturais das cadeias carboxílicas e também das cadeias laterais, resultando em diversos compostos com características estruturais bem complexas (VERAS *et al.*, 2004a). Devido a sua grande diversidade estrutural os vitaesteróides foram subdivididos em seis grupos principais: vitanolídeos, vitafisalinas, acnistinas, ixocarpalactonas, perulactonas e fisalinas (Figura 9).

Esses compostos têm sido isolados principalmente de plantas da família Solanaceae, mas também das famílias Taccaceae e Leguminosae (LIU *et al.*, 2006), assim também como de alguns organismos marinhos (KSEBATI; SDCHMITZ, 1988). Os vitaesteróides são os compostos mais abundantes em vários gêneros da família Solanaceae, como: *Physalis*, *Acnistus*, *Withania*, *Datura*, *Discopodium*, *Iochroma*, *Dunalia* e *Vassobia* (VERAS *et al.*, 2004a).

Varias atividades biológicas tem sido atribuída aos vitaesteróides, como: antiinflamatório (JAYAPRAKASAM; MURALEEDHRAN, 2003; WUBE *et al.*, 2008) imunossupressor (SOARES *et al.*, 2003; 2006), antiparasitário (CHOUDHARY *et al.*, 2006, CARDONA *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2008), anticolinesterásico (RIAZ *et al.*, 2004; CHOUDHARY *et al.*, 2005), antimicrobiano (JANUÁRIO *et al.*, 2002; SHANAZBANU *et al.*, 2006), citotóxica (ROCHA *et al.*, 2006; HSIEH *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2006a) e antitumoral (DEVI *et al.*, 1995; MAGALHÃES *et al.*, 2006b).



**Figura 9** - Estruturas químicas básicas dos sete grupos de vitaesteróides.

#### 1.4 *Acnistus arborescens* L. Schlecht

*Acnistus arborescens* L. Schlecht (sinonímia: *Acnistus frutescens* Bello, *Atropa arborescens* L., *Cestrum cauliflorum* (Jacq.), *Cestrum macrostemon* Sassi & Moç., e *Dunalia arborescens* (L.) Sleumer) é uma planta nativa das Américas do Sul e Central, sendo também encontrada no México e nas Antilhas. No Brasil é encontrada principalmente na flora nordestina, onde também é conhecida pelos nomes de “mariana”, “marianeira” e “esporão de galo de falso” (BARATA *et al.*, 1970).

É uma árvore relativamente rara, ocasionalmente utilizada como planta ornamental e cerca viva, já que, em sua idade adulta, se apresenta tanto na forma de arbusto como de árvore de pequeno porte. As flores são pequenas, de cor branca e tons esverdeados, e possui frutos amarelos semelhantes a pequenos tomates, podendo ser de cor alaranjada. A época de floração e frutificação da *A. arborescens* varia de acordo com o local de origem, mas ocorre geralmente entre os meses de maio e setembro (Figura 10).

A *A. arborescens* é uma planta de importante valor medicinal, sendo popularmente utilizada no tratamento de câncer, hemorróidas e doenças relacionadas ao fígado e baço, assim também como diurético (NITTALA; LAVIE, 1981). A maioria desses efeitos farmacológicos é atribuída à presença dos vitaesteróides.

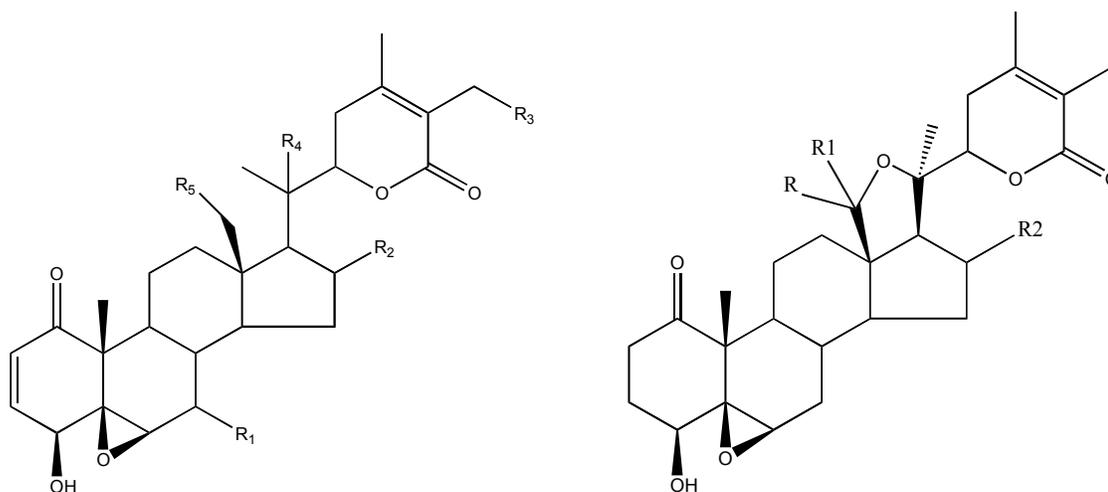
O primeiro relato sobre as propriedades farmacológicas dessa planta, foi quando Kupchan *et al.* (1965), observaram que o extrato etanólico da *A. arborescens* possuía atividade antitumoral (*in vitro*) em células de carcinoma de epiderme nasofaríngea de humanos e (*in vivo*) em sarcoma 180 em camundongos. Logo depois, Kupchan *et al.* (1969) isolaram dois compostos desse extrato, a vitaferina A (**13**) e a vitacnistina (**14**), as quais foram atribuídas os efeitos antitumorais do extrato.

Desde então, poucos estudos haviam sido feitos com a *A. arborescens*, até que Minguzzi *et al.* (2002) reportaram o isolamento de três vitanolídeos (**15**, **16** e **17**) dessa planta e seus respectivos efeitos citotóxicos em várias linhagens tumorais (mama, pulmão, cólon, carcinoma nasofaríngeo e próstata) (Figura 11).

Veras *et al.* (2004a, 2004b), reportou, pela primeira vez, o isolamento e os efeitos citotóxicos de cinco vitafisalinas (**18**, **19**, **20**, **21** e **22**) das folhas de *A. arborescens*. A diferença básica entre esses compostos e os vitanolídeos é a presença de um anel lactônico de cinco membros nas vitafisalinas (Figura 11).



**Figura 10** - *Acnistus arborescens* L. Schlecht (Fotografadas por: Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira)



**13** R = R<sub>3</sub> =  $\beta$ -OH; R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = R<sub>5</sub> = H  
**14** R =  $\beta$ -OH; R<sub>5</sub> = OAc; R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
**15** R = R<sub>4</sub> = OH; R<sub>1</sub> =  $\beta$ -OAc; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>5</sub> = H  
**16** R = R<sub>4</sub> = OH; R<sub>1</sub> =  $\beta$ -OAc; R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -OAc; R<sub>3</sub> = R<sub>5</sub> = H  
**17** R<sub>1</sub> =  $\beta$ -OAc; R<sub>2</sub> =  $\alpha$ -OAc; R<sub>4</sub> =  $\beta$ -OH; R = R<sub>3</sub> = R<sub>5</sub> = H

**18** R = OEt; R<sub>1</sub> = H;  $\Delta^2$   
**19** R =  $\beta$ -OH; R<sub>1</sub> = H (18R);  $\Delta^2$   
**19a** R = H; R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -OH (18S);  $\Delta^2$   
**20** R = O;  $\Delta^2$   
**21** R = O  
**22** R =  $\beta$ -OH; R<sub>1</sub> = H (18R)  
**22a** R = H; R<sub>1</sub> =  $\alpha$ -OH (18S)

**Figura 11** - Estruturas dos compostos Vitaferina A (**13**), Vitacnistina (**14**), 7 $\beta$ -Acetóxivitanolido D (**15**), 7 $\beta$ ,16 $\alpha$ -Diacetóxivitanolido D (**16**), 4-Deóxi-7 $\beta$ ,16- $\alpha$ -diacetóxivitanolido D (**17**), Vitafisalina O (**18**), Vitafisalina F (**19**), Vitafisalina M (**20**), Vitafisalina N (**21**) e Vitafisalina (17S,20R,22R)-5 $\beta$ ,6 $\beta$ :18,20-2-diepóxi-4 $\beta$ ,18-diidroxi-1-oxovita-3-24-enolido (**22**) isolados da *A. arborescens*.

# *Objetivos*

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar as atividades citotóxica e antitumoral das vitafisalinas O, F, M, N e (17*S*,20*R*,22*R*)-5 $\beta$ ,6 $\beta$ :18,20-2-diepóxi-4 $\beta$ ,18-diidróxi-1-oxovita-3-24-enolido isoladas da planta *Acnistus arborescens* L. Schlecht em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

### 2.2 Específicos

- Determinar e comparar as atividades citotóxicas das vitafisalinas O, F, M, N e (17*S*,20*R*,22*R*) - 5 $\beta$ ,6 $\beta$ : 18,20-2- diepóxi-4 $\beta$ ,18- diidróxi-1- oxovita-3-24- enolido em células tumorais e normais (PBMC).

- Avaliar o mecanismo de ação das vitafisalinas O, F, M e N utilizando células da linhagem HL-60 e K-562 como modelo.

- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* da vitafisalina F em camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com o tumor Sarcoma 180.

- Analisar as características histopatológicas dos órgãos (rim, fígado e baço) de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com o tumor Sarcoma 180, tratados por 7 dias com a vitafisalina F.

# *Materiais e Métodos*

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Materiais**

##### Equipamentos

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2

Agitador de tubo, Donner AD 8850

Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di

Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212

Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403

Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin

Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte mini

Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter

Fluxo laminar, VECO

Incubadora de células, (CO<sub>2</sub> Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow

High Throughput Screening (HTS)/Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000,  
Beckman Coulter

Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070

Microondas, Panasonic

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot

Microscópio de fluorescência, Olympus

Micrótomo, SLEE Mainz

pHmetro, Micronal B474

Pipetas automáticas, Gilson

Sistema de Eletroforese Horizontal mini Submarine, Amersham Biosciences

Soluções, Reagentes e Fármacos

Ácido Acético	-	Vetec
Ácido Clorídrico	-	Vetec
Álcool Etilico	70 %	Vetec
Agarose 1 %	0,5 g de agarose Água deionizada q. s. p. 50 mL	FMC - Bioproducts
Agarose LMP 1,5 %	1,5 g de agarose PBS q. s. p. 100 mL	Gibco®
Agarose NMP 0,5 %	0,5 g de agarose PBS q. s. p. 100 mL	Gibco®
Alamar Blue	0,3 mg/mL	Sigma®
Anticorpo anti-BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU BSA 5 % q.s.p. 500 µL de solução	Sigma® Dako
Anticorpo biotilidado anti- imunoglobulina de camundongo	1 µL de anticorpo anti-imunoglobulina BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução	Sigma®
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® -
BrdU 10mM	-	Sigma®
Brometo de Etídio 100 µg/mL	1mg de brometo de etídeo PBS q.s.p 10 mL de solução	Sigma® -
Citrato de Sódio	-	Grupo Química

Cloreto de Sódio (NaCl)	-	Labsynth®
Diaminobenzidina (DAB)	5 µL de DAB 1 mL de Tris-HCl (Tris 0,05M) pH= 7,6 2 µL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Immunotech© Proquímios Proquímios
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	Vetec®
Doxorrubicina – fornecida pelo Instituto do Câncer do Ceará – ICC	2,5 mg/mL	Zodiac®
EDTA	-	Qeel
Eosina 0,5%	0,5 g de Eosina 80 mL de Álcool etílico 0,5 mL de Ácido acético 20 mL de H <sub>2</sub> O	Doles© Vetec Vetec -
Eosina-Azul de Metileno (May-Grunwald)	0,2 g Metanol q.s.p. 100 mL de solução	Reagen
Estreptavidina – peroxidase	1 µL de Estreptavidina – peroxidase BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução	Sigma® Dako®
Ficoll	-	Sigma®
Fitohemaglutinina	-	Sigma®
Formaldeído 10 %	100 mL de formaldeído H <sub>2</sub> O q. s. p. 1 L	Dinâmica®
Giemsa	-	Bioclin

Hematoxilina 0,1%	0,5 g de Hematoxilina	Doles®
	10 mL de Glicerina	Labsynth®
	25 g de Sulfato de alumínio	Labsynth®
	0,1 g de Iodeto de potássio	Labsynth®
	H <sub>2</sub> O q.s.p. 500 mL de solução	-
Hidróxido de Sódio (NaOH)	-	Vetec®
Iodeto de propídeo 50 µg/mL	1 mg de iodeto de propídeo	Boehringer©
	PBS q.s.p. 50 mL	
Laranja de Acridina	1 g de laranja de acridina (100 µg/mL)	Fluka®
	H <sub>2</sub> O q.s.p. 10 mL de solução	-
Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e esterelizada, filtrado em filtro millipore (0,22 µm) e complementado com SBF	
	10 %, 1 % de glutamina, 1 % de antibióticos, 1 % de bicarbonato de sódio (0,75 %) e 25 mM de HEPES	Cultilab®
MTT	20 mg de MTT	Sigma®
	PBS q.s.p. 100 mL de solução	-
N-Lauroylsarcosine	-	Sigma®
Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL	Cultilab®
	Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab®
Ringer-lactato	Cloreto de Sódio = 0,600g	
	Cloreto de Potássio = 0,030g	
	Cloreto de Cálcio 2H <sub>2</sub> O = 0,020g	Laboratórios Biosintética®
	Lactato de Sódio = 0,30g	
	Água q. s. p. 100 mL	

Sulfato de Gentamicina	-	Gentamicin Novafarma®
Solução de Eletroforese	EDTA 1mM, NaOH 300 mM, pH > 13	-
Solução de Lise	NaCl 2,5M, EDTA 100mM Tris 10mM, N-Lauroyl sarcosine 1% pH = 10, Triton X-100 1 %, DMSO 10 %	-
Solução de Neutralização	Tris 0,4 M, pH = 7,5	
Solução desnaturante (para análise de incorporação de BrdU)	Formamida 70 % 2x SSC (pH entre 6,5 e 7,5 a 70 °C)	Vetec®
Soro fetal bovino	-	Cultilab®
Solução salina (para hemólise)	8,5 g de Cloreto de sódio (0,85 %) 1,11 g de Cloreto de cálcio (10 mM) H <sub>2</sub> O q.s.p 1 L de solução	Labsynth® Reagen® -
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Citrato de sódio 0,15 M H <sub>2</sub> O	-
Tampão de corrida 50 X (TAE)	242 g de TRIS 57,1 mL de ácido acético glacial 100 mL de EDTA 0,5 M	-
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio 2,14 g de NaHPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Labsynth® Labsynth®

	0,276 g de NaHPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Labsynth®
	H <sub>2</sub> O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	-
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M	Labsynth®
	Tris 0,5 M (pH= 7,6)	Proquímios®
	H <sub>2</sub> O	-
	50 mL de Tripsina 2,5 %	Cultilab®
Tripsina 0,25%	0,125 g de EDTA	Proquímios®
	450 mL de PBS	-
Triton X -100	-	Isofar
	100 mL de formaldeído	Dinâmica®
Xilol 10 %	H <sub>2</sub> O q. s. p. 1 L	-
	-	-
Vitafisalina O	-	-
Vitafisalina F	-	-
Vitafisalina M	-	-
Vitafisalina N	-	-
Vitafisalina (17S,20R,22R)- 5β,6β:18,20-2.diepóxi-4β,18- diidróxi-1-oxovita-3.24-enolido	-	-
5- Fluorouracil	2,5 mg/1 mL	ICN Farmacêutica®

### Modelos biológicos

Camundongos albinos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss

Linhagens celulares tumorais mantidas em cultura (Tabela 1)

Células mononucleadas de sangue periférico isoladas de voluntários sadios

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Obtenção das vitafisalinas

As folhas de *A. arborescens* foram coletadas em maio de 2004 na localidade de Pico Alto, na Serra de Guaramiranga (Ceará). O material botânico foi identificado pelo Prof. Edson P. Nunes do Departamento de Biologia – UFC, e encontra-se depositado no Herbário Prisco Bezerra (EAC), sob nº 30.513. As folhas secas e trituradas (3,7 kg) foram extraídas com EtOH à temperatura ambiente ( $2 \times 8$  L), em seguida o solvente foi evaporado sob pressão reduzida resultando em 170 g de um extrato viscoso e escuro, o qual foi submetido a fracionamento cromatográfico empregando gel de sílica com adsorvente e n-hexano (18,1 g),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (48,6 g), AcOEt (29,7 g) e MeOH (42,0 g) como eluentes.

Todas as frações foram avaliadas quanto à citotoxicidade frente a um pequeno painel de células tumorais (Lu1-pulmão, LNCaP-próstata e MCF-7-mama), entretanto, apenas a fração obtida por eluição com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  mostrou atividade, sendo a mesma escolhida para dar continuidade aos estudos. Esta fração foi submetida a sucessivos métodos clássicos de cromatografias, resultando no isolamento das vitafisalinas O (**18**), F (**19**), M (**20**), N (**21**) e (17*S*,20*R*,22*R*)-5 $\beta$ ,6 $\beta$ :18,20-2-diepóxi-4 $\beta$ ,18-diidroxi-1-oxovita-3.24-enolido (**22**) (VERAS *et al.*, 2004a; VERAS *et al.*, 2004b; ROCHA, *et al.*, 2006).

### 3.2.2 Cultivo das células

Nesse trabalho foram utilizados dois tipos de linhagem celular, as linhagens em suspensão (HL-60 e K-562) e as linhagens aderidas (MDAMB-435, PC-3, SF-295 e NCI-H460), todas obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD) (Tabela 1). As células eram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL para células em suspensão), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas.

**Tabela 1** - Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

Linhagem Celular	Tipo Histológico do Câncer/Origem	Concentração de Plaqueamento (céls/mL)
HL-60	Leucemia promielocítica humana	$0,3 \times 10^6$
K-562	Leucemia mielocítica crônica humana	$0,3 \times 10^6$
MDA-MB 435	Carcinoma de mama humano	$0,1 \times 10^6$
PC-3	Carcinoma de próstata humano	$0,1 \times 10^6$
SF-295	Glioblastoma humano	$0,1 \times 10^6$
NCI-H460	Carcinoma de pulmão humano	$0,1 \times 10^6$

### 3.2.3 Avaliação da atividade citotóxica em células tumorais *in vitro* – MTT

A citotoxicidade das vitafisalinas F, O, M, N e (17*S*,20*R*,22*R*)-5 $\beta$ ,6 $\beta$ :18,20-2-diepóxi-4 $\beta$ ,18-diidróxi-1-oxovita-3.24-enolido foram avaliadas, através do método do MTT, utilizando as seguintes linhagens tumorais: HL-60 (leucemia), MDAMB-435 (mama), PC-3 (próstata), SF-295 (sistema nervoso central) e NCI (pulmão).

O método consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT), de cor amarela, para o formazan, composto de cor azul. Essa conversão do MTT em formazan só ocorre em células viáveis e metabolicamente ativas, através da ação da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias, o que permite desta forma a quantificação indireta da porcentagem de células vivas (MOSMANN, 1983).

#### ***Procedimento experimental***

As células em suspensão ou monocamadas foram plaqueadas em placas de 96 poços numa densidade de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, para células em suspensão e  $0,1 \times 10^6$  células/mL para células aderidas. As vitafisalinas F, O, M, N e (17*S*,20*R*,22*R*)-5 $\beta$ ,6 $\beta$ :18,20-2-diepóxi-4 $\beta$ ,18-diidróxi-1-oxovita-3.24-enolido foram incubadas juntamente com as células

durante 72 horas, em concentrações variando de 0,76 a 50  $\mu\text{M}$ , em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95 % de umidade. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm / 15 min.) e o sobrenadante foi descartado. Em seguida em cada poço foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640), e novamente incubada por mais 3 horas. Após esse período, as placas foram centrifugadas (3000 rpm/10 min.) e tiveram o sobrenadante descartado, permanecendo somente o precipitado azul de formazan. O precipitado foi então ressuspensionado em 150  $\mu\text{L}$  de DMSO e agitado por cerca de 10 minutos até sua completa dissolução. Para a quantificação do sal de MTT reduzido, as absorbâncias foram medidas no espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595nm.

### ***Análise dos dados***

Os compostos foram testados em diluição seriada, em duplicata ou triplicata, e suas  $\text{CI}_{50}$  (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 4.0 (GraphPad Software).

### **3.2.4 Avaliação da atividade citotóxica em células normais in vitro – Alamar Blue**

A citotoxicidade das vitafisalinas F, O e N, em células normais, foi avaliada através do ensaio do alamar blue, utilizando células mononucleadas de sangue periférico humano (PBMC - *Peripheral blood mononuclear cells*), 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 vivas, e assim pode ser quantificado e utilizado para avaliar a viabilidade celular.

### ***Procedimento experimental***

As células mononucleadas foram obtidas do sangue periférico de voluntários sadios após centrifugação em gradiente de Ficoll. As células foram removidas, lavadas com tampão fosfato e ressuspensionadas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal

bovino, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina para uma concentração final de final  $3 \times 10^5$  cels/mL. Fitohemaglutinina (3%) foi adicionada para induzir a proliferação dos linfócitos. Após 24 horas de incubação das células, as vitafisalinas F, O e N foram adicionadas em cada poço durante 72 horas, em concentrações variando de 0,76 a 50 µM, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade. Vinte e quatro horas antes de completar o período de incubação, 10 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue foram adicionados em cada poço. Após 72 horas 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. 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 4.0 (GraphPad Software).

### **3.2.5 Avaliação da atividade antiproliferativa em células leucêmicas (Curva de crescimento celular) - exclusão por azul de tripan**

Este ensaio consiste em avaliar a cinética de crescimento de células leucêmicas (HL-60 e K562) tratadas com as vitafisalinas F, O, M e N e assim poder avaliar o efeito de várias concentrações destas em relação ao tempo de incubação.

O corante azul de tripan permite a distinção individual das células viáveis das não-viáveis, onde o corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan pra fora, fazendo com que as células mortas apresentem uma coloração azulada.

### ***Procedimento experimental***

Células das linhagens HL-60 e K-562 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, e incubadas com as vitafisalinas F, O, M e N nas concentrações de 0,2, 0,6, 2, 6 e 20  $\mu$ M. Após cada período de incubação (3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas) era retirada uma alíquota de 90  $\mu$ L da suspensão de células e adicionado a 10  $\mu$ L do azul de tripan. Em seguida uma alíquota de 10  $\mu$ L foi colocada em uma câmara de Neubauer e as células diferenciadas e contadas em viáveis e não viáveis.

### ***Análise dos dados***

O valor obtido para cada contagem foi plotado em um gráfico e construído uma curva com as variáveis: porcentagem de células viáveis x log da concentração, para cada tempo analisado, para a observação da cinética de crescimento das células tratadas. Foram determinados também suas  $CI_{50}$  (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os valores das  $CI_{50}$  foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido do teste Student-Newman-Keuls, com nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ).

#### **3.2.6 Avaliação da atividade genotóxica em células normais e leucêmicas.**

O teste do cometa é um método simples, rápido, econômico e sensível que permite a detecção de dano em DNA em células individualizadas. Ao expor a célula ao composto para avaliação do possível efeito genotóxico, o dano pode ser visualizado através da realização de uma eletroforese em lâmina, onde, fragmentos das fitas de DNA carregadas negativamente começam a migrar afastando-se do núcleo, em direção ao anodo. Quando corados com brometo de etídeo, cada núcleo e sua “cauda” de fragmentos associada remetem a alusão de um cometa. O tamanho da cabeça e o comprimento da cauda são os padrões avaliados para determinar a intensidade do dano (SINGH *et al.*, 1988).

### ***Procedimento Experimental***

O teste do cometa é realizado de acordo como descrito por Singh *et al.* (1988) com pequenas modificações (HARTMANN; SPEIT, 1997). Células de HL-60 e PBMC foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, e incubadas por 24 h com as vitafisalinas O, M e N nas concentrações de 1.8 e 14.3  $\mu\text{M}$ , 20.1 e 21  $\mu\text{M}$  e 9.6 e 11.8  $\mu\text{M}$  respectivamente. A doxorubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usada como controle positivo.

Após o período de incubação de 24 horas foi retirada uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de células, a qual foi adicionada a 110  $\mu\text{L}$  de agarose de baixo ponto de fusão 0,5 % para preparo das lâminas. As lâminas foram previamente cobertas por solução de agarose de ponto de fusão normal 1,5 % a 60 °C e mantidas a temperatura ambiente por 24 h até a solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão da segunda camada de agarose de baixo ponto de fusão, a qual foi preparada previamente. Em seguida, foram cobertas com lamínulas (24 x 60 mm) para uniformizar a distribuição das células e mantidas a 4 °C para solidificação da agarose.

Após solidificação da agarose, a lamínula foi gentilmente removida e a lâmina mergulhada em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10,0, 1% Triton-X and 10% DMSO) a 4 °C e protegida da luz, por no mínimo 1 hora antes da corrida de eletroforese. Depois de removidas da solução de lise, as lâminas foram colocadas em uma solução de neutralização (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13; 4°C) por 15 minutos e dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese. A cuba foi mantida em banho de gelo para a manutenção da temperatura em torno de 4 °C, tendo sido acrescentada a solução de eletroforese até completa imersão das lâminas.

Antes de iniciar a corrida de eletroforese, as lâminas ficaram em repouso por 20 min para permitir o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios álcali-lábeis. Posteriormente, a eletroforese foi conduzida em baixa luminosidade, usando 25 V e corrente de 300 mA por 20 min. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas na solução de neutralização por 5 min, a fim de neutralizar a alcalinidade. A fixação foi realizada com etanol 100 %. Posteriormente, as lâminas foram coradas com 50  $\mu\text{L}$  de solução de brometo de etídio (20  $\mu\text{g/mL}$ ) e analisadas em microscópio de fluorescência.

### **Análise dos dados**

A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (Figura 13). Foram contados 100 cometas por lâmina ( $n = 4$ ) e classificados dentre as cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4), que representam a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de dano sofrido pela célula:

0 = sem danos ao DNA, portanto, sem cauda ( $< 5\%$ )

1 = baixo nível de danos, com a cauda menor que o diâmetro da cabeça (5-20%)

2 = médio nível de danos, com a cauda representando 1-2x o diâmetro da cabeça (20-40%)

3 = alto nível de danos, com a cauda representando mais de 2x o diâmetro da cabeça (40-95%)

4 = dano total ( $> 95\%$ )

O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula:  $ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i$ , onde  $n_i$  é o número de células com nível de dano  $i$  (0, 1, 2, 3 ou 4). A frequência de dano (FD) representa a percentagem de células que sofreram danos no DNA.

Os dados foram expressos como da média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes ( $n = 2$ ). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados serão comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### **3.2.7 Inibição da síntese de DNA – BrDU**

A bromodeoxiuridina (BrDU) é uma base nitrogenada análoga a timina. Quando as células estão sintetizando DNA o BrDU é incorporado no lugar da timina. A detecção do BrDU incorporado nas células é feita por técnicas imunocitoquímicas, onde se ligam anticorpos monoclonais e um cromógeno específico, a diaminobenzidina (DAB), que vai conferir uma coloração marrom ao núcleo das células que incorporaram o BrDU. (MATSUOKA *et al.*, 1990).

### ***Procedimento Experimental***

Células de HL-60 e K562 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, e incubadas por 24 h com as vitafisalinas O, M e N nas concentrações de  $CI_{50}$  (1.8 e 14.3  $\mu\text{M}$ , 20.1 e 21  $\mu\text{M}$  e 9.6 e 11.8  $\mu\text{M}$ , para HL-60 e K-562 respectivamente) e metade da  $CI_{50}$ . As concentrações utilizadas foram estimadas a partir dos valores de  $CI_{50}$ , encontradas no ensaio da curva de crescimento nestas duas linhagens no período de 24 h de incubação. A doxorrubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usada como controle positivo. Três horas antes do período de incubação o BrdU (0,01  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado em cada poço da cultura de células. Após o período de incubação, lâminas foram preparadas em citocentrífuga (cytospin) e postas para secar por 2 horas. Após o período de secagem foram fixadas em metanol: ácido acético (7: 1,5) por 5 minutos. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 minutos a  $70^\circ \text{C}$  e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram circuldadas com caneta hidrofóbica e incubadas com anticorpo primário e deixadas na geladeira durante a noite em câmara úmida. As células foram incubadas com anticorpo secundário biotilado por 20 minutos e, então, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 minutos. Adicionou-se o cromógeno DAB por 1-5 minutos, o qual foi removido com água destilada. A hematoxilina foi utilizada como contracorante.

### ***Análise dos dados***

Duzentas células foram contadas, diferenciando-as entre núcleo marrom (incorporaram o BrdU) e não-marrom (não incorporam o BrdU). Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de dois experimentos independentes (realizados em duplicata). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados pelo teste  $\chi^2$ , utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software), com nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ).

### **3.2.8 Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina**

O método de coloração pelo brometo de etídio / laranja de acridina permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da coloração diferencial por fluorescência com base em alterações morfológicas nucleares e

citoplasmáticas (McGAHON *et al.*, 1995). A laranja de acridina consegue atravessar membranas celulares intactas e se ligam ao DNA, conferindo uma aparência verde ao núcleo das células. O brometo de etídio é incorporado principalmente por células com a membrana já danificada (não viáveis), ligando-se ao DNA e corando-o de laranja. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE. Morfologicamente, observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células em necrose (lesão de membrana) apresentam um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e não há formação de corpos apoptóticos. Possivelmente, as membranas plasmáticas permaneçam intactas durante o fenômeno apoptótico até os últimos estágios quando se tornam permeáveis aos solutos normalmente retidos.

### ***Procedimento Experimental***

Células de HL-60 e K562 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, e incubadas por 24 h com as vitafisalinas O, M e N nas concentrações de  $CI_{50}$  (1.8 e 14.3  $\mu$ M, 20.1 e 21  $\mu$ M e 9.6 e 11.8  $\mu$ M, para HL-60 e K-562 respectivamente) e metade da  $CI_{50}$ . As concentrações utilizadas foram estimadas a partir dos valores de  $CI_{50}$ , encontradas no ensaio da curva de crescimento nestas duas linhagens no período de 24 h de incubação. A doxorrubicina (0,3  $\mu$ g/mL) foi usada como controle positivo. Uma alíquota de 1 mL da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 5 min a 2000rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 20  $\mu$ L de solução de PBS. Em seguida, 1  $\mu$ L da solução de BE:LA foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células transferido para uma lâmina, montado com lamínula, e em seguida levadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares.

### ***Análise dos dados***

Para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas), foram contadas 300 células de cada amostra. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnet, utilizando o

programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software), com nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ).

### **3.2.9 Determinação da ativação da caspase-3**

As caspases pertencem a família de proteases cisteínas. A ativação da caspase-3 possui papel fundamental no mecanismo de apoptose, sendo responsável pela clivagem de vários componentes celulares relacionados ao reparo e ao controle do DNA. Assim, a quantificação dos níveis de caspase-3 permite avaliar os mecanismos de indução apoptótica (MEHMET, 2002).

#### ***Procedimento Experimental***

A atividade de caspase-3 foi avaliada utilizando-se kit colorimétrico de protease, de acordo com as recomendações do fabricante. O método é baseado na detecção espectrofotométrica do cromóforo *p*-nitroanilida (pNA) após clivagem dos substratos X-pNA, onde X representa a seqüência de aminoácidos reconhecidos por caspases específicas: Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-pNA para a caspase-3. Inicialmente, células HL-60 e K-562 ( $2 \times 10^6$  células/mL) foram incubadas por 24 horas com as vitafisalinas O, M e N nas concentrações de  $CI_{50}$  (1.8 e 14.3  $\mu$ M, 20.1 e 21  $\mu$ M e 9.6 e 11.8  $\mu$ M, para HL-60 e K-562 respectivamente) e metade da  $CI_{50}$ , em estufa úmida a 37 °C e atmosfera contendo 5% de  $CO_2$ . Após o período de incubação as células foram centrifugadas e lisadas em gelo. A quantidade de proteína no lisado foi determinada utilizando-se o ensaio para dosagem de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Em seguida, 100-200  $\mu$ g de proteínas foram incubadas com o substrato em placa de 96 cavidades. A densidade óptica das amostras foi medida em comprimento de onda de 405 nm. A atividade de caspase nas amostras foi determinada em relação ao controle negativo e expressa como atividade de caspase-3 específica (UI/mg de proteína).

#### ***Análise dos dados***

Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de dois experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas

entre os diferentes grupos, os dados serão comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### **3.2.10 Análise morfológica – Coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E)**

A coloração por Hematoxilina/Eosina permite distinguir o citoplasma e o núcleo das células, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. A hematoxilina é um corante alcalino que tem maior afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo uma cor lilás. A eosina, por sua vez, liga-se ao citoplasma conferindo-lhe uma coloração rósea.

#### ***Procedimento experimental***

Células da linhagem HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, e incubadas por 24 h com as vitafisalinas O e F nas concentração de  $2\mu\text{M}$ . A doxorrubicina ( $0,5\ \mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Para observar a morfologia das células, lâminas foram preparadas, com  $50\mu\text{L}$  da suspensão de células, em citocentrífuga (cytospin) e fixadas com metanol 100% por 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água corrente, para retirada do excesso de metanol, e coradas com hematoxilina de Harris 0,1%. Após nova lavagem, para a retirada do excesso de hematoxilina, as lâminas foram coradas com eosina 0,5%.

#### ***Análise dos dados***

As lâminas com as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle negativo (não-tratado). O registro das alterações celulares foi feito através de fotografia.

### **3.2.11 Análise morfológica - Coloração por May-Grunwald-Giemsa**

A coloração por May-Grunwald-Giemsa 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.

### ***Procedimento experimental***

Células das linhagens HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, e incubadas por 24 h com as vitafisalinas O e F na concentração de 2  $\mu$ M. A doxorubicina (0,5  $\mu$ M) foi usada como controle positivo. Para observar a morfologia das células, lâminas foram preparadas, com 50 $\mu$ L da suspensão de células, em citocentrífuga (cytospin) e fixadas com metanol 100% por 1 minuto. Em seguida as lâminas foram coradas com May-Grunwald, por 10 seg, e em seguida com Giemsa por 10 seg.

### ***Análise dos dados***

As lâminas com as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle negativo (não-tratado). O registro das alterações celulares foi feito através de fotografia.

### **3.2.12 Determinação da Integridade da Membrana**

Este método consiste na capacidade do iodeto de propídeo (PI) se ligar ao DNA de células cuja membrana plasmática esteja rompida, como nos casos de apoptose tardia e necrose, emitindo uma alta fluorescência quando excitado pelo laser de argônio (488nm). Nas células cuja membrana permanece íntegra (células viáveis), o PI não consegue penetrar e portanto emitem uma fluorescência mais baixa, com isso as células vivas podem diferenciadas das mortas.

### ***Procedimento Experimental***

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, e incubadas por 24 h com as vitafisalinas F e O nas concentrações de 2, 5 e 10  $\mu$ M. A doxorubicina (0,5  $\mu$ M) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50 $\mu$ L da suspensão de células foi transferida para um tubo

ependorf e incubada por mais 5 minutos com 100 $\mu$ L de PI (50 $\mu$ g/mL). Em seguida as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies).

### ***Análise dos dados***

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

### **3.2.13 Avaliação do ciclo celular e fragmentação de DNA.**

Esse método consiste na capacidade do iodeto de propídeo se ligar ao DNA das células, cuja membrana plasmática foi primeiramente lisada por um detergente para permitir a entrada do corante no núcleo. O ciclo celular é constituído pelas seguintes fases: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M. Durante o período de crescimento celular (fase G<sub>1</sub>) uma célula diplóide apresenta um conteúdo 2n (n – conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomos) em DNA nuclear, i.e., possui duas cópias de cada gene. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear (2-4n) e na fase seguinte (fase G<sub>2</sub>) ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo em DNA nuclear é mantido no nível 4n. Em seguida ocorre a mitose (fase M, 4n) durante a qual a célula se divide, formando-se duas células filhas, cada uma com um conteúdo 2n em DNA. As células que não se encontram em divisão celular (G<sub>0</sub>) apresentam um conteúdo 2n em DNA. Assim, as diferentes fases do ciclo celular podem ser determinadas a partir do conteúdo de DNA que elas apresentam.

Quando as células se apresentam com a cromatina condensada e/ou DNA fragmentado, a quantidade de PI incorporada é menor, e portanto emitem uma fluorescência mais baixa.

### ***Procedimento Experimental***

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de 0,3 x 10<sup>6</sup> células/mL, e incubadas por 24 h com as vitafisalinas F e O nas concentrações de 2, 5 e 10  $\mu$ M. A doxorubicina (0,5  $\mu$ M) foi usada como controle positivo. Após o período de

incubação uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 30 minutos com 100 $\mu\text{L}$  de uma solução de lise contendo PI (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Triton X-100 (0,1%) e citrato de sódio (0,1%). Em seguida as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies), onde foram obtidas histogramas representando a quantidade de células em cada fase do ciclo celular ( $G_1$ , S e  $G_2/M$ ) e a quantidade de células com DNA fragmentado.

### ***Análise dos dados***

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

### **3.2.14 Determinação do Potencial Transmembrânico de Mitocôndria**

A mitocôndria está envolvida em diversas vias apoptóticas intrínsecas. O citocromo *c* liberado da membrana externa da mitocôndria irá contribuir para desdobramento de rotas apoptóticas e o espaço liberado funcionará como poro. Através destes poros formar-se-á um efluxo de íons  $\text{H}^+$ , induzindo uma alteração de seu potencial transmembrânico. A rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, é sequestrado pra dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido a maior quantidade de rodamina ligada às cargas positivas internas enquanto que as mitocôndrias das células apoptóticas terão menos afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência.

### ***Procedimento Experimental***

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, e incubadas por 24 h com as vitafisalinas F e O nas concentrações de 2, 5 e 10  $\mu\text{M}$ . A doxorubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 15 minutos com 200 $\mu\text{L}$  de uma solução de rodamina 123 (1

µg/mL em PBS), na ausência de luz e a 37 °C. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuscitado em PBS e reincubado por mais 30 minutos e analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies).

### ***Análise dos dados***

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

### **3.2.15 Avaliação da atividade antitumoral da vitafisalina F em camundongos transplantados com Sarcoma 180**

A avaliação da atividade antitumoral está relacionada à regressão total de tumores nos animais, à redução no crescimento dos tumores e ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os animais não tratados. Schabel *et al.* (1977) demonstrou que o melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado até 48 h após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral. O tumor utilizado foi o Sarcoma 180, o qual foi descoberto em 1914 no ‘Crocker Laboratory (Columbia University, New York)’, sendo originalmente um tumor sólido, surgido espontaneamente na região axilar de camundongos. Inicialmente o tumor foi classificado como um carcinoma mamário, mas por volta de 1919, após a realização de vários transplantes subcutâneos, o tumor assumiu a forma de sarcoma, e desde então se mantém inalterado.

### ***Procedimento Experimental***

Para a avaliação do efeito antitumoral da vitafisalina F foram utilizados camundongos (*Mus musculus* Swiss) fêmeas provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN - UFC). Esses animais foram divididos

aleatoriamente em 4 grupos (n = 8 para cada grupo) com pesos variando entre 22 e 25 g (p > 0,05).

O modelo tumoral - tumor sólido do tipo Sarcoma 180 - foi utilizado com 10 dias de implantação na região axilar direita. O animal doador, ou da manutenção, foi sacrificado por deslocamento cervical, sendo realizado assepsia com álcool iodado. Em seguida, foi retirado o líquido ascítico da cavidade abdominal e preparado uma suspensão de células com 5,0 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem de células. Nos animais receptores, foram injetadas  $2 \times 10^6$  céls/0,5 mL na região axilar esquerda dos camundongos. Após 24 h de inoculação, o tratamento foi iniciado e realizado durante 7 dias consecutivos, utilizando como controle negativo, o veículo de diluição (DMSO 4 %) e como controle positivo, o quimioterápico 5-Fluoracil (25 mg/kg/dia). A vitafisalina F foi testada nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg/dia, todas administradas por via intraperitoneal (i.p.). A dose de 20 mg/kg/dia também foi administrada por via oral (v.o.).

Todos os grupos foram mantidos sob as mesmas condições e sob regime de ingestão *ad libitum* de ração comercial (Purina, São Paulo) e água clorada durante todo o período do experimento.

No final do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo seus órgãos (rins, baço, fígado) e tumores dissecados para avaliação do peso relativo e da atividade antitumoral, respectivamente.

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

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

Onde: A = média dos pesos dos tumores no grupo controle.

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

### ***Análise dos dados***

Os resultados (peso relativo dos órgãos e peso dos tumores) foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet, com nível de significância de 5% (p < 0,05).

### **3.2.15.1 Observações Histopatológicas**

Imediatamente após a dissecação, os órgãos e os tumores foram fixados em formol 10 % para posterior análise macroscópica em relação à coloração, tamanho, consistência e aspecto superficiais e corte. Em seguida, os tecidos foram processados, embebidos em parafina e secções de 3-5  $\mu\text{m}$  de espessura foram preparadas em lâminas. Depois de desparafinizadas em xilol por 15 min e desidratadas em álcool em crescentes concentrações, as lâminas foram lavadas em água destilada, coradas com H/E e examinadas em microscópio óptico (x400).

# *Resultados*

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da atividade citotóxica em células tumorais *in vitro* – MTT

A avaliação da atividade citotóxica das vitafisalinas foi realizado pelo método do MTT em cinco linhagens de células tumorais (MDA-MB-435 – melanoma, NCI-H460 - pulmão, SF-295 – glioblastoma, HL-60 - leucemia promielocítica e PC-3 – próstata) após 72 horas de incubação. A tabela 2 apresenta os valores de  $CI_{50}$  obtidos no ensaio.

Todas as vitafisalinas apresentaram efeitos citotóxicos nas cinco linhagens testadas, com  $CI_{50}$  variando de 0,7 a 15,8 $\mu$ M. A vitafisalina O foi a que apresentou maior efeito citotóxico, com valores de  $CI_{50}$  menores que 1,9 $\mu$ M em quatro das cinco linhagens testadas, sendo a mais ativa de 0,7  $\mu$ M na linhagem de HL-60 e a menos ativa de 3,2  $\mu$ M na linhagem SF-295. Já o composto menos ativo foi a vitafisalina (17*S*,20*R*,22*R*)-5 $\beta$ ,6 $\beta$ :18,20-2-diepóxi-4 $\beta$ ,18-diidrôxi-1-oxovita-3-24-enolido, com valores de  $CI_{50}$  variando entre 6,9 e 15,8  $\mu$ M nas linhagens de HL-60 e SF-295 respectivamente. Para este ensaio, foram consideradas ativas as substâncias que apresentaram  $CI_{50} < 8 \mu$ M (BOIK, 2001)

**Tabela 2** - Atividade citotóxica *in vitro* de vitafisalinas isoladas da *Acnistus arborescens* em linhagens de células tumorais.

Vitafisalina	Linhagens tumorais				
	CI <sub>50</sub> µM				
	MDA-MB435	NCI	SF-295	HL-60	PC-3
<b>O</b>	1,5 (1,1 – 1,9)	1,3 (0,9 – 1,8)	3,2 (1,9 – 5,5)	0,7 (0,6 – 0,7)	1,9 (1,2 – 2,9)
<b>F</b>	2,7 (1,3 – 4,6)	2,5 (0,6 – 8,9)	6,4 (2,7 – 8,3)	1,4 (1,3 – 1,7)	3,0 (1,8 – 4,7)
<b>M</b>	4,1 (2,6 – 6,4)	--	7,9 (5,8 – 8,4)	4,1 (2,6 – 6,0)	15,1 (10,1 – 20,0)
<b>(17S,20R,22R)- 5β,6β:18,20- 2-diepóxi- 4β,18-diidroxi- 1-oxovita-3.24- enolido</b>	11,8 (6,2 – 21,3)	13,6 (7,4 – 22,6)	15,8 (10,8 – 21,6)	6,9 (5,6 – 8,2)	14,2 (9,4 – 20,6)
<b>N</b>	7,6 (3,4 – 16,0)	4,2 (0,8 – 19,0)	11,3 (6,8 – 16,6)	5,5 (5,0 – 5,9)	6,3 (3,1 – 13,2)

Os dados são apresentados em valores de CI<sub>50</sub> µM e o intervalo de confiança de 95% de dois experimentos independentes realizado em triplicata pelo método do MTT após 72 horas de incubação para as linhagens MDA-MB435 (melanoma), NCI-H460 (pulmão), SF-295 (glioblastoma), HL60 (leucemia) e PC-3 (próstata).

#### 4.2 Avaliação da atividade citotóxica em células normais *in vitro* – Alamar Blue

Para avaliar a seletividade em células normais humana, a atividade citotóxica das vitafisalinas O, M e N foram avaliadas em PBMC, através do método do alamar blue após 72 horas de incubação. A tabela 3 apresenta os valores de  $CI_{50}$  obtidos no ensaio.

A vitafisalina F foi a mais citotóxica em PBMC, com  $IC_{50}$  de 1,2  $\mu$ M. As vitafisalinas O e M apresentaram  $IC_{50}$  de 3,7 e 16,9  $\mu$ M, respectivamente.

**Tabela 3** - Atividade citotóxica *in vitro* de vitafisalinas isoladas da *Acnistus arborescens* em PBMC.

Vitafisalina	PBMC $CI_{50}$ $\mu$ M
O	3,7 (3,1 – 4,3)
F	1,2 (0,8 – 1,6)
N	16,9 (12,8 – 22,1)

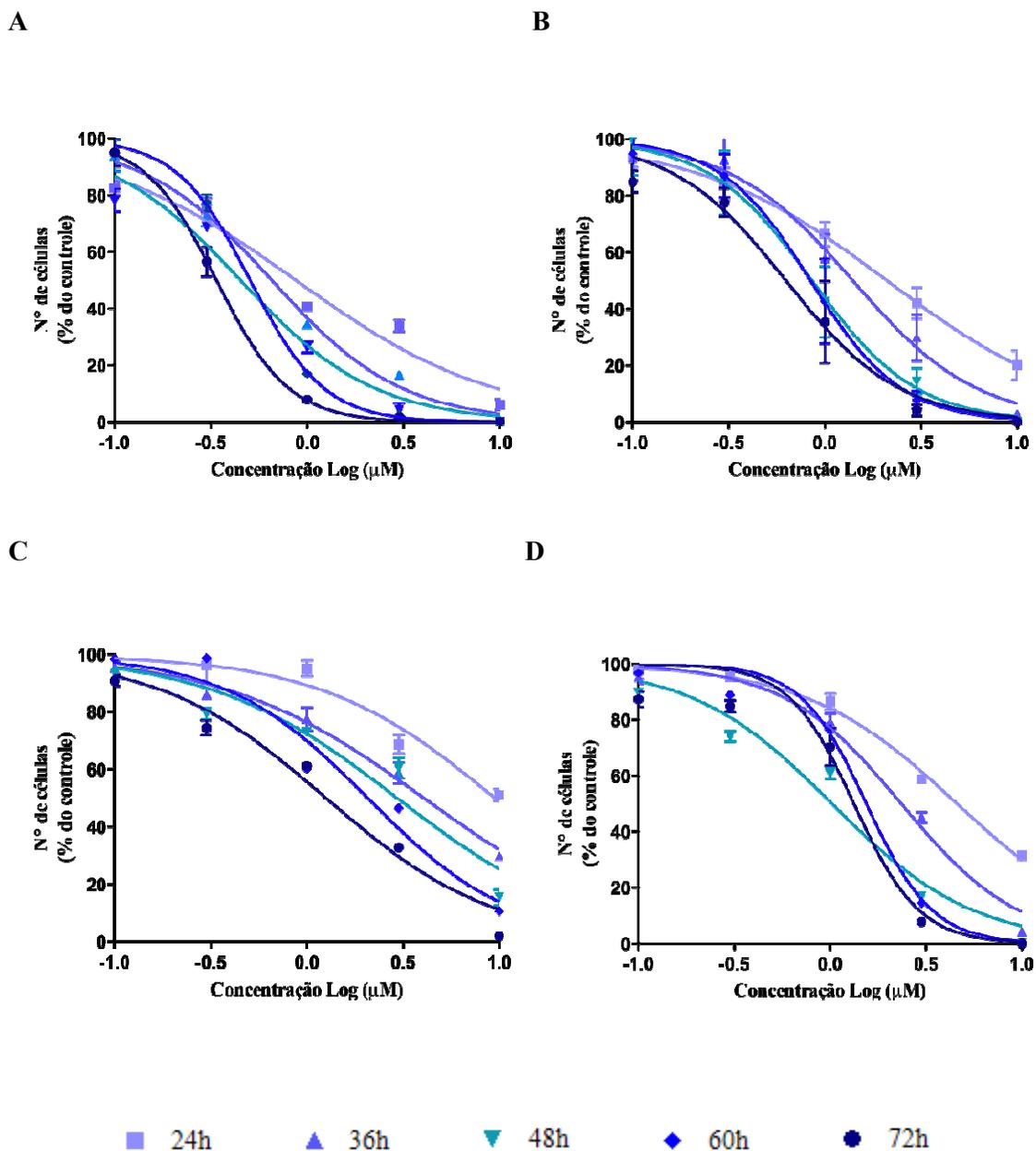
Os dados são apresentados em valores de  $CI_{50}$   $\mu$ M e o intervalo de confiança de 95% de dois experimentos independentes realizado em triplicata pelo método do alamar blue após 72 horas de incubação com células PBMC.

#### 4.3 Avaliação da atividade antiproliferativa em células leucêmicas (Curva de crescimento celular) - exclusão por azul de tripan

A construção da curva de crescimento foi utilizada para determinar a cinética de crescimento de células leucêmicas (HL-60 e K562) sob efeito das vitafisalinas O, F, M e N nos intervalos de tempo de 12h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h. As quatro vitafisalinas testadas apresentaram uma redução significativa no número de células viáveis, tanto na linhagem de HL-60 como de K-562, e esses efeitos parecem ocorrer de modo concentração e tempo dependente (Figuras 12, 13, 14 e 15).

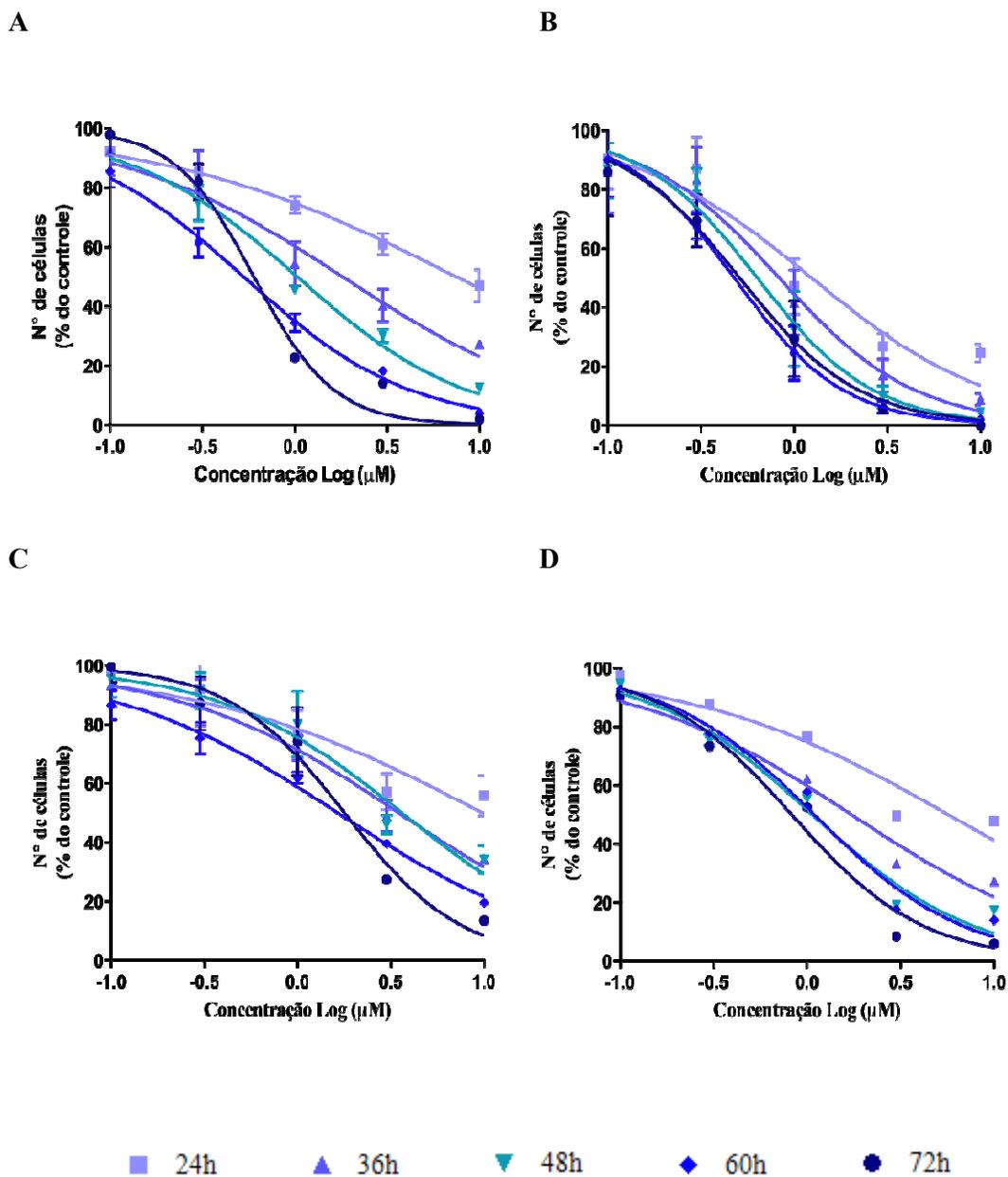
Nas primeiras 12 horas de tratamento o único composto a apresentar efeito sobre a viabilidade das células foi a vitafisalina O, na linhagem de HL-60, com valor de  $CI_{50}$  de 6,2  $\mu$ M. Os demais compostos, com exceção da vitafisalina M, começaram a reduzir a viabilidade celular de ambas as linhagens a partir de 24 h de tratamento, onde as vitafisalinas O, F e N

apresentaram  $CI_{50}$  de 1,7, 3,5 e 9,5  $\mu\text{M}$  na linhagem de HL-60 e 14,4, 5,3 e 11,8  $\mu\text{M}$  na linhagem de K-562, respectivamente. Os primeiros efeitos da vitafisalina M, sobre a viabilidade celular, começaram apenas depois de 36 h de incubação e se estenderam até o final do período de tratamento, apresentando  $CI_{50}$  de 2,3 e 3,5  $\mu\text{M}$  para HL-60 e K-562, respectivamente. A partir de 48 h até o final do período de 72 h de tratamento, houve pouca variação nas  $CI_{50}$  das vitafisalinas O, F e N. Todos os valores de  $CI_{50}$  estão apresentados na tabela 4.



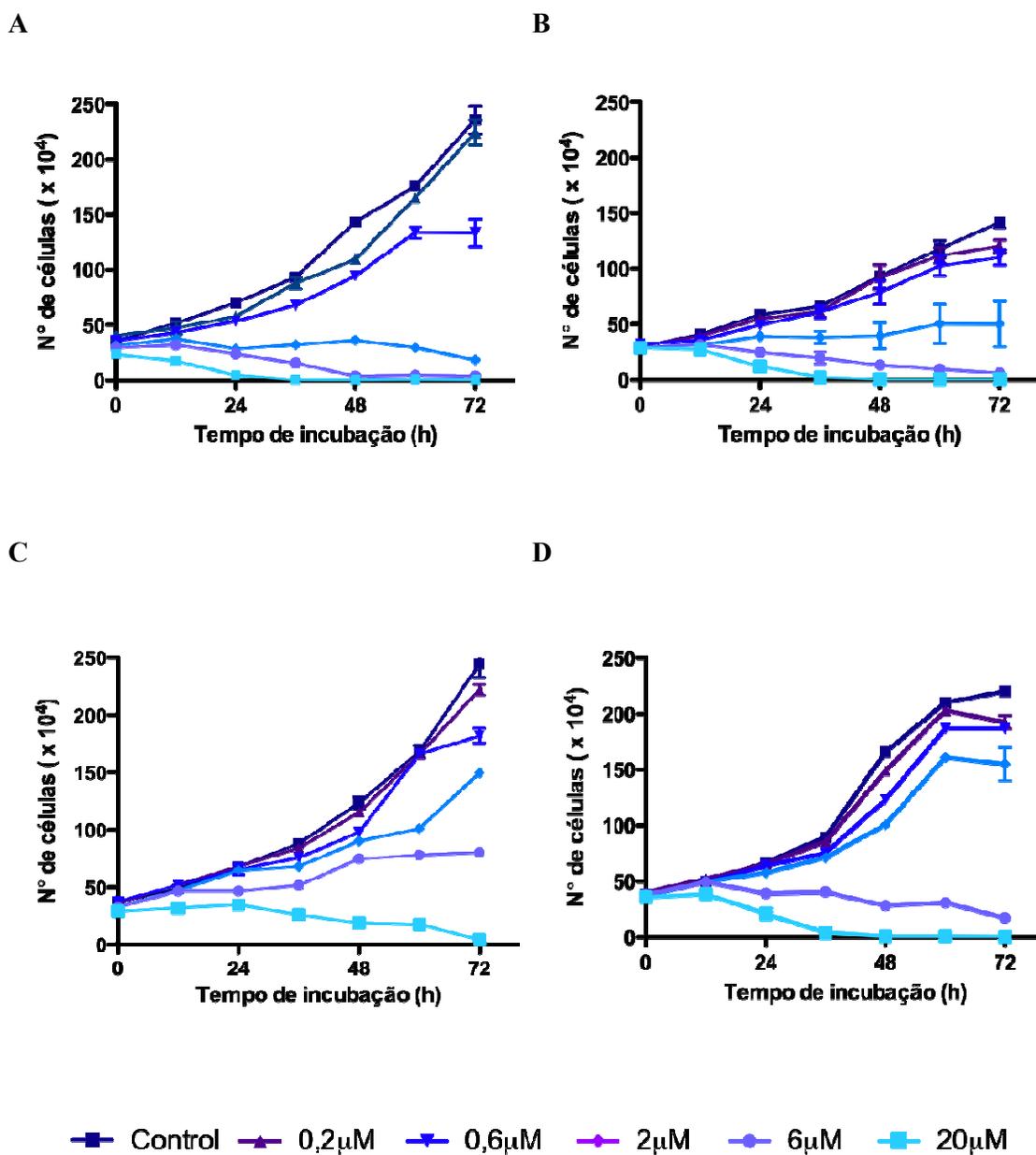
**Figura 12** - Curva de crescimento celular da linhagem HL-60 (leucemia humana) tratada com as vitafisalinas O (A), F (B), M (C) e N (D).

A viabilidade celular foi determinada por exclusão de azul de tripan nos tempos de 24, 36, 48, 60 e 72 horas de incubação. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes realizado em duplicata. Os resultados de 12 h de tratamento não foram mostrados.



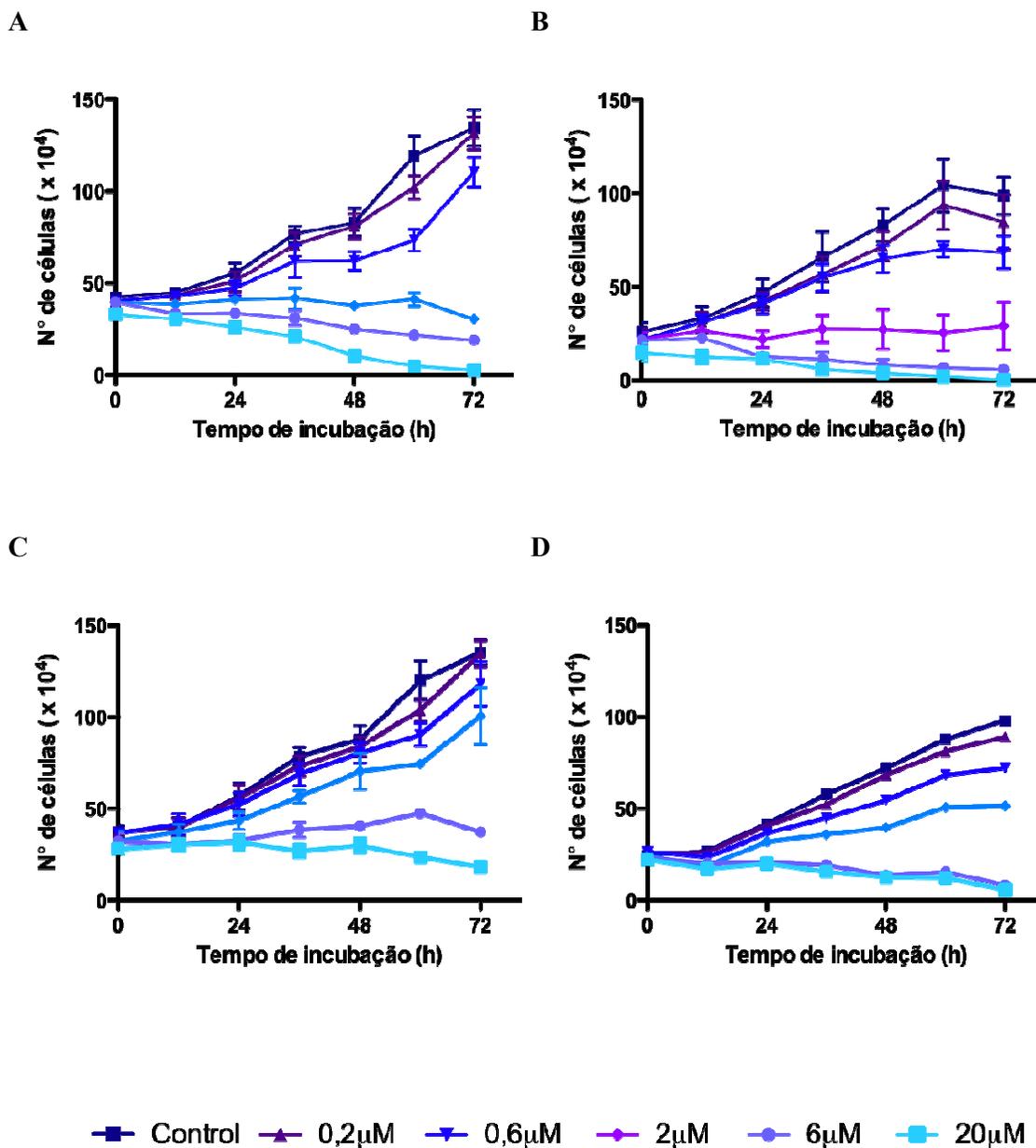
**Figura 13** – Curva de crescimento celular da linhagem K-562 (leucemia humana) tratada com as vitafisalinas O (A), F (B), M (C) e N (D).

A viabilidade celular foi determinada por exclusão de azul de tripan nos tempos de 24, 36, 48, 60 e 72 horas de incubação. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes realizado em duplicata. Os resultados de 12 h de tratamento não foram mostrados.



**Figura 14** – Curva de crescimento celular da linhagem K-562 (leucemia humana) tratada com as vitafisalinas O (A), F (B), M (C) e N (D).

O número de células foi determinado por exclusão de azul de tripan nos tempos de 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas de incubação. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes realizado em duplicata.



**Figura 15** – Curva de crescimento celular da linhagem K-562 (leucemia humana) tratada com as vitafisalinas O (A), F (B), M (C) e N (D).

O número de células foi determinado por exclusão de azul de tripan nos tempos de 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas de incubação. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes realizado em duplicata.

**Tabela 4** – Atividade citotóxica das vitafisalinas F, O, M e N em células leucêmicas das linhagens HL-60 (leucemia promielocítica) e K562 (leucemia mielocítica crônica).

Composto	Linhagem celular	IC <sub>50</sub> , média ± E.P.M., µM					
		12 horas	24 horas	36 horas	48 horas	60 horas	72 horas
<b>O</b>	HL60	6,2 ± 2,8	1,8 ± 0,3	1,3 ± 0,1	0,8 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,0
	K562	> 19,7	14,4 ± 1,4	3,5 ± 0,7	2,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,0
<b>F</b>	HL60	> 20,5	3,5 ± 1,7	3,3 ± 2,0	1,6 ± 0,8	1,2 ± 0,3	0,8 ± 0,1
	K562	> 20,5	5,3 ± 4,9	3,3 ± 2,7	1,6 ± 0,8	1,2 ± 0,6	1,1 ± 0,4
<b>M</b>	HL60	> 20,7	19,4 ± 1,6	8,5 ± 0,7	6,2 ± 0,7	4,3 ± 0,2	2,3 ± 0,7
	K562	> 20,7	> 20,7	7,3 ± 0,9	7,1 ± 0,5	3,8 ± 0,7	3,5 ± 0,4
<b>N</b>	HL60	> 20,7	9,2 ± 0,3	4,9 ± 0,3	2,1 ± 0,1	3,2 ± 0,1	2,7 ± 0,3
	K652	> 20,7	11,8 ± 0,4	3,6 ± 0,1	2,2 ± 0,0	2,3 ± 0,1	1,7 ± 0,0

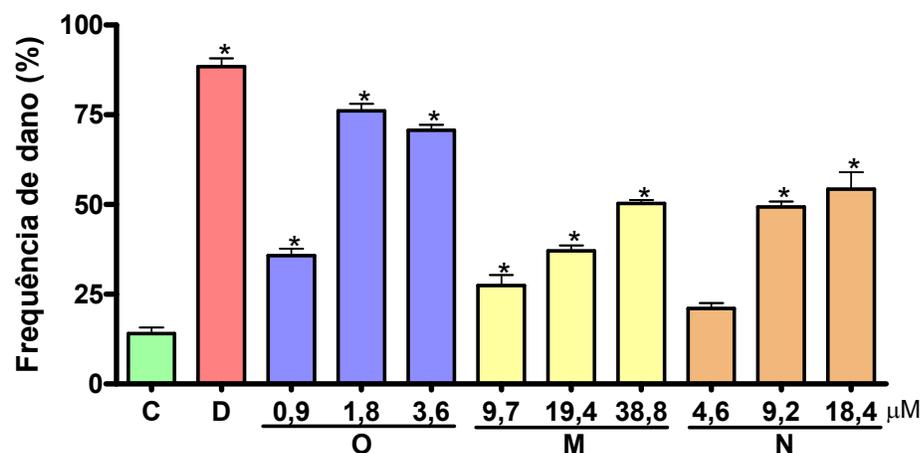
Os dados são apresentados em valores de CI<sub>50</sub> média ± E.P.M., µM de três experimentos independentes realizados em duplicata.

#### 4.4 Avaliação da atividade genotóxica em células normais e leucêmicas.

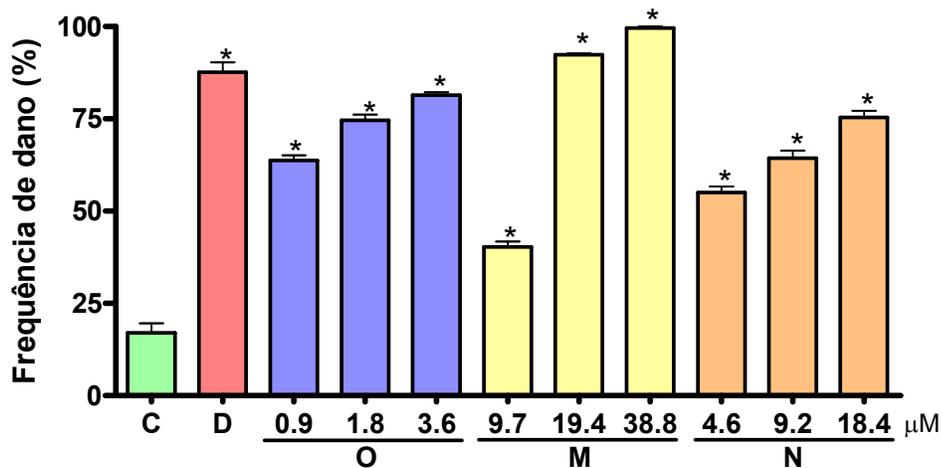
O potencial genotóxico das vitafisalinas O, M e N foi avaliado através do teste do cometa, em células de HL-60 e PBMC, após 24 horas de incubação. As concentrações utilizadas neste ensaio correspondem aos valores de CI<sub>50</sub> encontrados na curva de crescimento em HL-60, a metade da CI<sub>50</sub> e o dobro da CI<sub>50</sub>.

Todas as vitafisalinas testadas aumentaram o índice de dano e a frequência de dano, tanto em PBMC quanto em HL-60 (Figura 16 e 17).

A

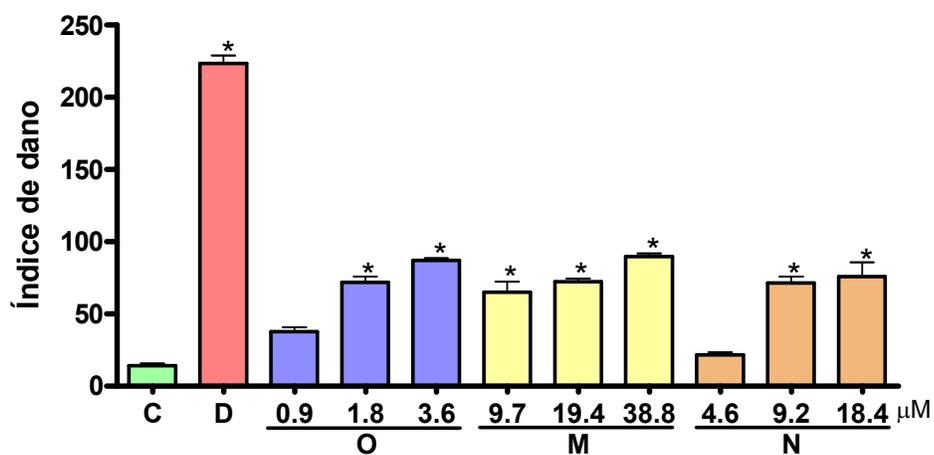


B

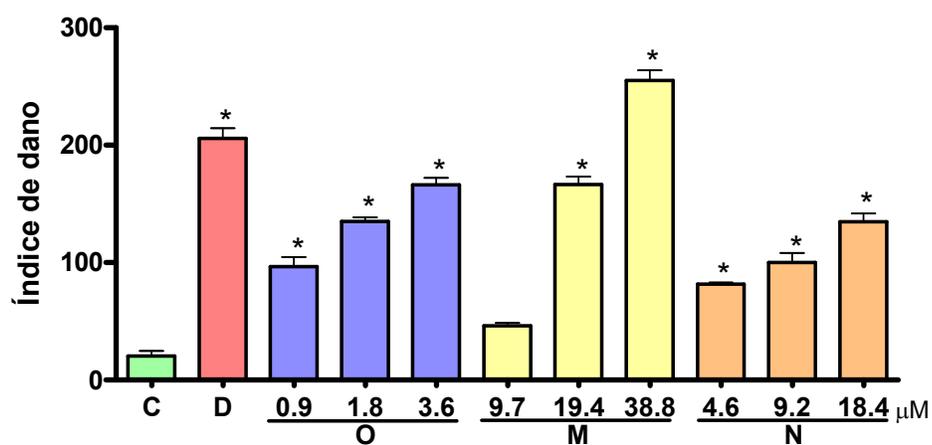


**Figura 16** – Frequência de dano das vitafisalinas O, M e N sobre células de PBMC (A) e HL-60 (B), analisado pelo teste do cometa após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,5 μM) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média ± E.P.M. de dois experimentos independentes. \* p < 0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnet.

A



B



**Figura 17** - Índice de dano das vitafisalinas O, M e N sobre células de PBMC (A) e HL-60 (B), analisado pelo teste do cometa após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de dois experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnet.

#### 4.5 Inibição da síntese de DNA – BrdU

Neste ensaio, foi avaliada a capacidade proliferativa de células tratadas em comparação as não-tratadas pela incorporação de BrdU no DNA (Tabela 5). Os resultados mostraram que as vitafisalinas O, M e N causam uma redução significativa da incorporação do BrdU nas duas linhagens testadas.

A vitafisalina O, na concentração de 1,8  $\mu\text{M}$ , causou uma inibição de 81% na síntese de DNA nas células de HL-60, enquanto que em K-562 uma concentração sete vezes maior (14,4  $\mu\text{g/mL}$ ) reduziu apenas 64%. As vitafisalinas M (19,4  $\mu\text{M}$ ) e N (9,2  $\mu\text{M}$ ) inibiram em quase 100% a síntese de DNA em células de HL-60. Em células de K-562 as vitafisalinas M (21,0  $\mu\text{M}$ ) e N (11,8  $\mu\text{M}$ ) reduziram em torno de 60% a incorporação de BrdU.

**Tabela 5** - Efeito das vitafisalinas O, M e N na incorporação do 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) em células leucêmicas de HL-60 e K562 depois de 24 horas de incubação.

Composto	Concentração $\mu\text{g/mL}$ ( $\mu\text{M}$ )		Células positivas (%)		T/C	
	HL-60	K562	HL-60	K562	HL-60	K562
Controle	-	-	67%	56%	-	-
Doxorrubicina	0,5	0,5	35% <sup>a</sup>	35% <sup>a</sup>	0.51	0.62
<b>O</b>	0,9	7,1	50% <sup>b</sup>	31% <sup>a</sup>	0.74	0.55
	1,8	14,4	13% <sup>a,b</sup>	20% <sup>a</sup>	0.19	0.36
<b>M</b>	9,7	10,4	37% <sup>a</sup>	26% <sup>a</sup>	0.55	0.46
	19,4	21	5,0% <sup>a,b</sup>	22% <sup>a</sup>	0.06	0.39
<b>N</b>	4,6	5,9	36% <sup>a</sup>	53% <sup>b</sup>	0.55	0.95
	9,2	11,8	3,0% <sup>a,b</sup>	23% <sup>a</sup>	0.05	0.40

Nota: Os dados correspondem a media de células positivas (%) de dois experimentos independentes. T/C = tratado/controle.

<sup>a</sup>  $p < 0.05$ ,  $\chi^2$  comparado com o controle

<sup>b</sup>  $p < 0.05$ ,  $\chi^2$  comparado com a doxorrubicina

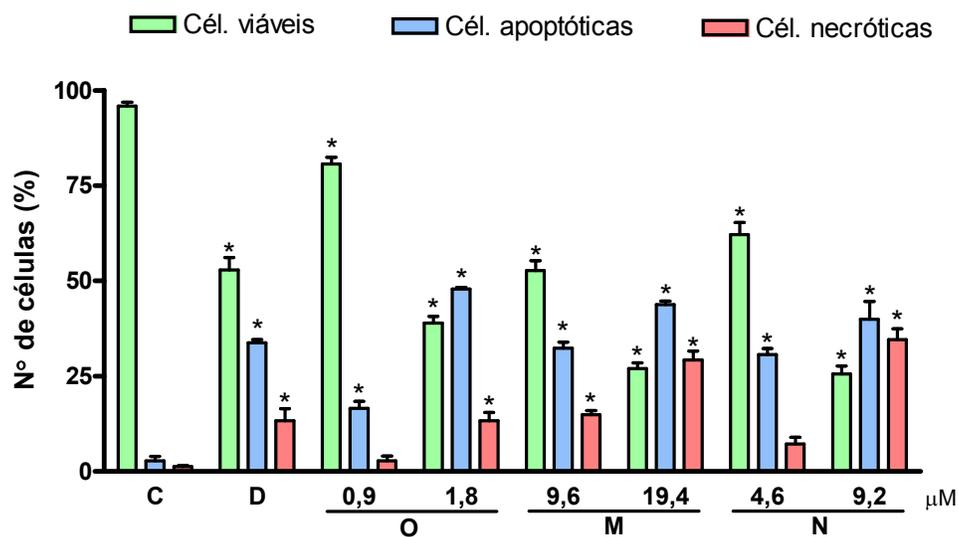
#### 4.6 Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

Após 24 horas de incubação, as três vitafisalinas testadas causaram uma redução de modo dose-dependente, no número de células viáveis, e um aumento de células apoptóticas

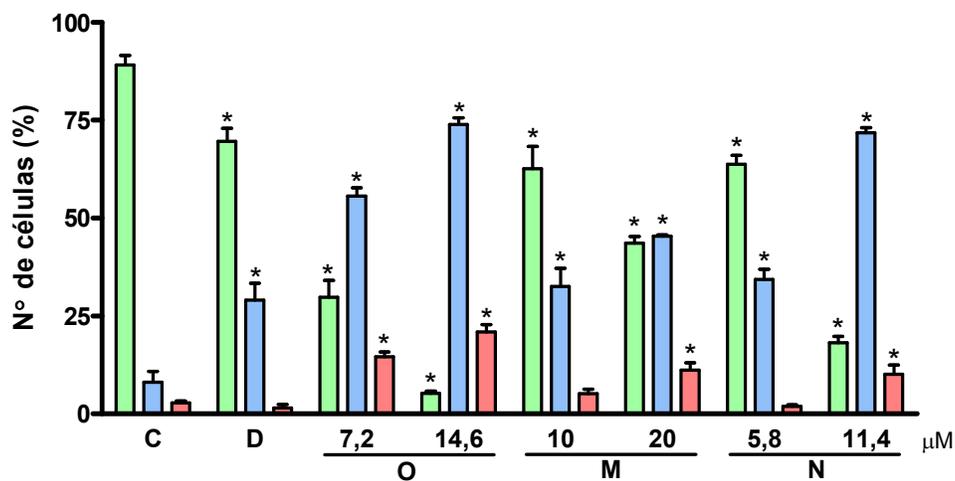
e necróticas em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). As células de HL-60 quando tratadas com a vitafisalina O (1,8  $\mu\text{M}$ ), apresentaram 38,89% de células viáveis, enquanto que no controle esse número foi de 95,89%. Conseqüentemente o número de células apoptóticas e necróticas foi maior nas células tratadas com o composto (48,89 e 13,33%, respectivamente) do que no controle (2,78 e 1,33%, respectivamente). Em relação ao controle, as vitafisalinas M e N também causaram um aumento no número de células necróticas de HL-60 (29% e 34%, respectivamente). As células tratadas com doxorrubicina apresentaram um aumento do número de células apoptóticas (33,78%), assim como de células necróticas (13,33) (Figura 18A).

Já na linhagem de K-562 o efeito mais observado foi o aumento no número de células apoptóticas. Enquanto que no controle a porcentagem de células apoptóticas era de 8%, nas células tratadas com as vitafisalinas O, M e N essa porcentagem aumentou para 73,89, 32,56 e 71,78% respectivamente (Figura 18B).

A



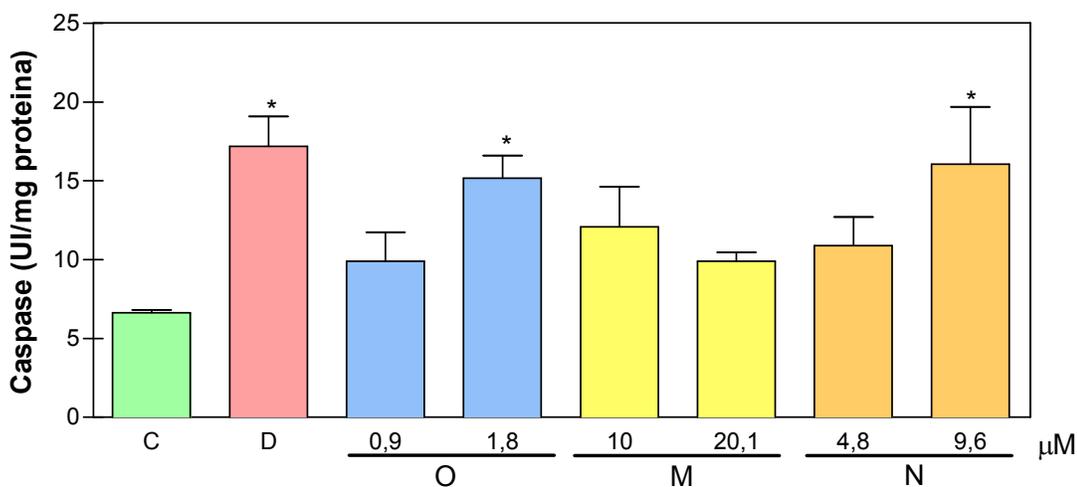
B



**Figura 18** - Efeito das vitafisalinas O, M e N sobre células de HL-60 (A) e K562 (B), analisado por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,5 μM) foi usada como controle positivo. 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 Dunnet.

#### 4.7 Determinação da ativação da caspase-3

A ativação da caspase-3 foi avaliada por ensaio colorimétrico. A doxorubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância. Apenas as vitafisalinas O e N, nas maiores concentrações testadas, induziram significativamente a ativação de caspase-3 em células de HL-60 (Figura 19). Em células de K-562, nenhuma das três vitafisalinas testadas induziu ativação de caspase-3 (Dados não apresentados).

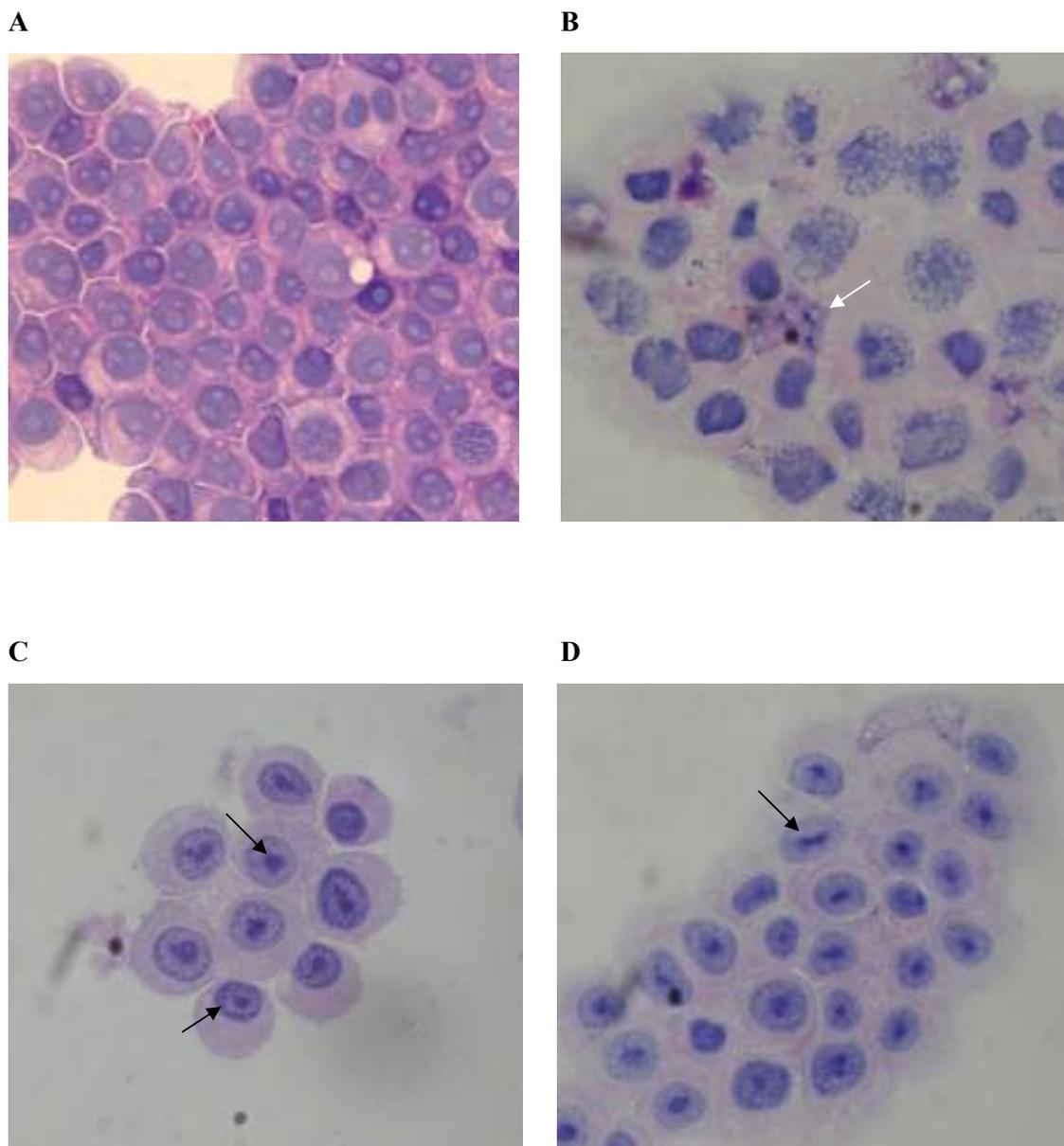


**Figura 19** - Efeito das vitafisalinas O, M e N sobre a ativação da caspase-3 em células de HL-60 após 24 horas de incubação. . C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. Os resultados são expressos como atividade específica. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de dois experimentos independentes realizados em triplicata. \*,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

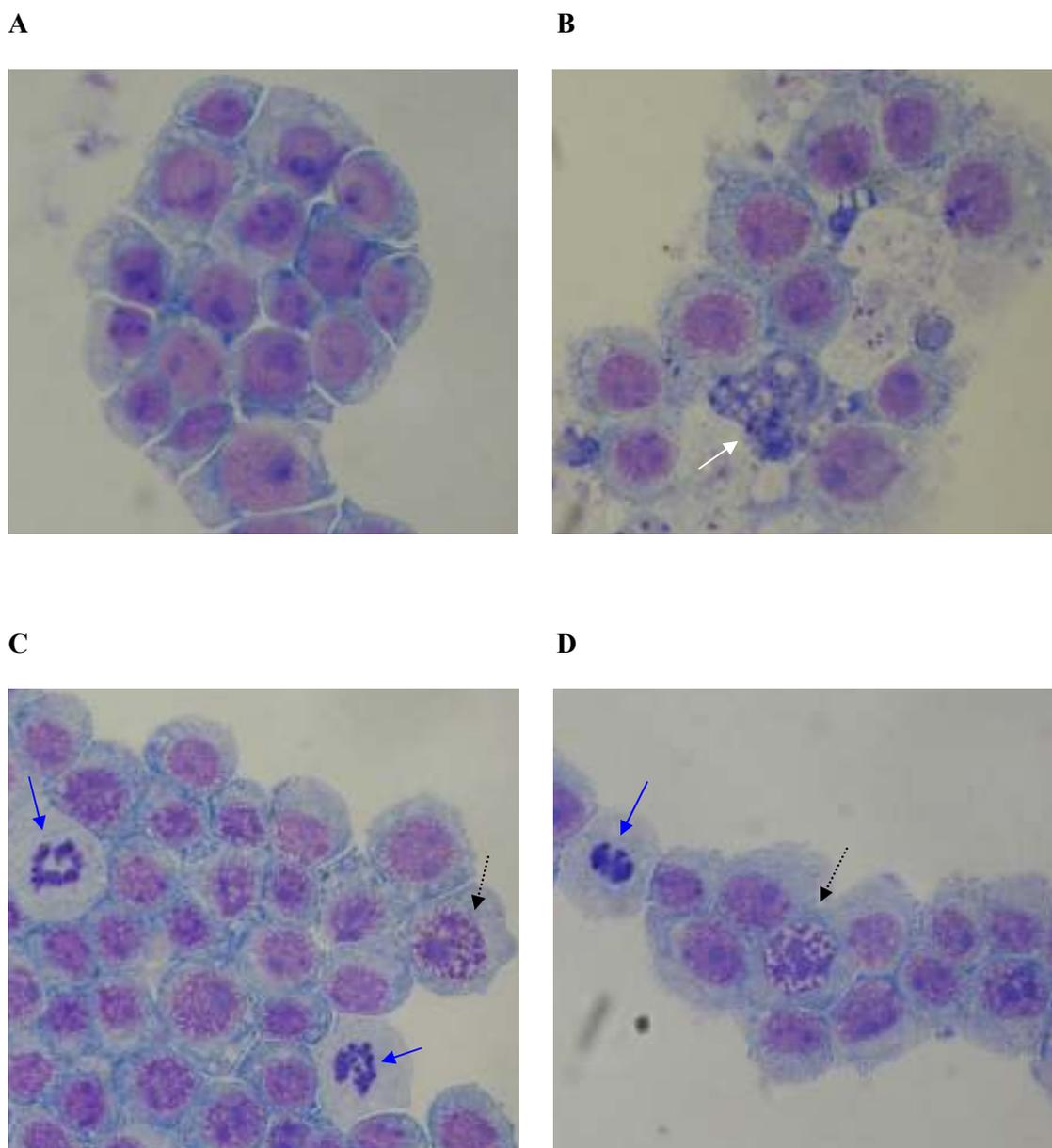
#### **4.8 Análise morfológica – Coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E) e May-Grunwald-Giemsa**

Análises morfológicas das células de HL-60 tratadas com as vitafisalinas O e F foram feitas por coloração de Hematoxilina/Eosina e de May-Grunwald-Giemsa com o objetivo de visualizar as possíveis alterações decorrentes do tratamento com as vitafisalinas O e F. Análises por microscopia óptica das células de HL-60, coradas, revelaram várias diferenças entre as células tratadas e o controle negativo. As células de HL-60 do controle negativo exibiram uma morfologia típica com membrana íntegra, células pleomórficas, nítida visualização tanto da membrana plasmática quanto nuclear (Figuras 20A e 21A).

Nas células tratadas com as vitafisalinas O e F, os efeitos foram melhores visualizados na coloração de May-Grunwald-Giemsa, onde a maioria das células apresentava uma morfologia atípica, semelhante à figuras mitóticas da fase prófase (Figuras 21C e 21D). Na análise das células coradas com H/E, apenas visualizamos discreta condensação da cromatina (Figuras 20C e 20D). A doxorubicina, por sua vez, induziu alterações compatíveis com a morte celular por apoptose, incluindo fragmentação nuclear (Figuras 20B e 21B).



**Figura 20** - Morfologia de células da linhagem HL-60 (leucemia) após 24h de incubação, coradas por Hematoxilina/Eosina e visualizadas por microscopia óptica. (A): controle negativo; (B): Doxorubicina (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi usada como controle positivo; (C): células tratadas com a vitafisalina O na concentração de 2  $\mu\text{M}$ ; (D): células tratadas com a vitafisalina F na concentração de 2  $\mu\text{M}$ . Seta preta: condensação da cromatina; Seta branca: fragmentação nuclear.

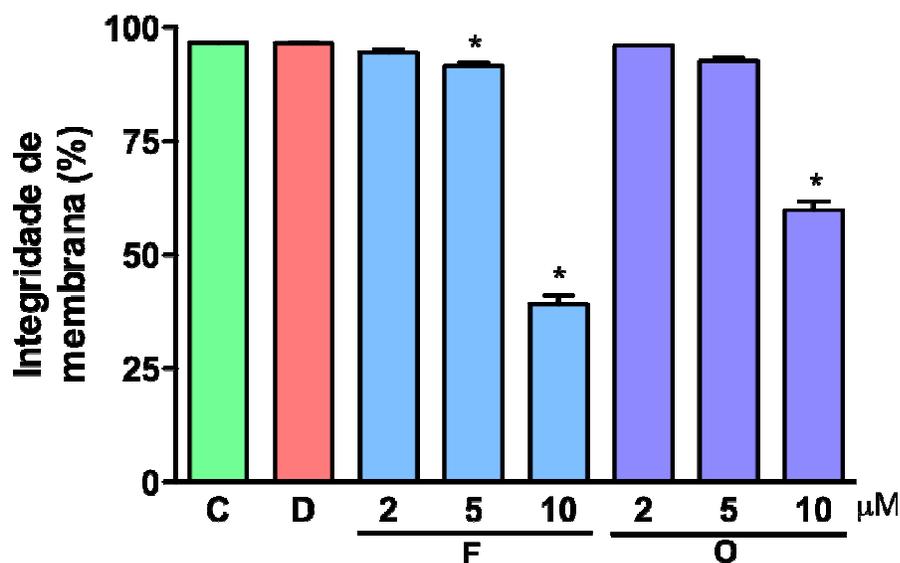


**Figura 21** - Morfologia de células da linhagem HL-60 (leucemia) após 24h de incubação, coradas por May-Grunwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica. (A): controle negativo; (B): Doxorubicina (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi usada como controle positivo; (C): células tratadas com a vitafisalina O na concentração de 2  $\mu\text{M}$ ; (D): células tratadas com a vitafisalina F na concentração de 2  $\mu\text{M}$ . Seta branca: fragmentação nuclear; Seta preta pontilhada: pré-prófase; Seta azul: mitose atípica.

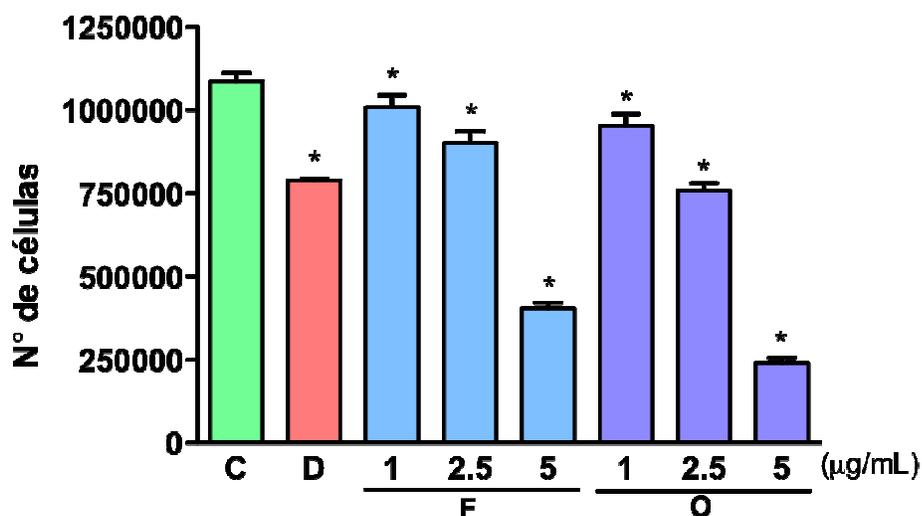
#### 4.9 Determinação da Integridade da Membrana

A avaliação da integridade de membrana serviu como parâmetro pra determinar a viabilidade das células de HL-60 tratadas com as vitafisalinas F e O.

Como pode ser observado na figura 22, nenhuma das duas substâncias reduziu a viabilidade celular na concentração de 2  $\mu\text{M}$ . Na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , apesar de uma pequena diferença de 5,11%, apenas a vitafisalina F mostrou redução significativa do número de células viáveis em relação ao controle. Já na concentração de 10  $\mu\text{M}$  tanto a vitafisalina F quanto a O reduziram significativamente a viabilidade das células de HL-60 para 39,13 e 59,81%, respectivamente (Figura 22). Vale ressaltar que, apesar das células apresentarem membranas íntegras, a concentração de células está reduzida, em todos as concentrações testadas, relação ao controle negativo (Figura 23).



**Figura 22** - Efeito das vitafisalinas F e O sobre a viabilidade (integridade de membrana) de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.



**Figura 23** - Efeito das vitafisalinas F e O sobre a concentração de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,5 µM) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

#### 4.10 Avaliação do ciclo celular e fragmentação de DNA

A análise do ciclo celular das células de HL-60, tratadas com as vitafisalinas F e O, foi feita através do programa ModFit LT 3.1. Os resultados mostraram que ambas vitafisalinas alteram o ciclo celular já a partir da menor concentração testada (2 µM), onde a quantidade de células na fase  $G_0/G_1$  é maior do que no controle negativo, e na fase S menor. Já na concentração de 5 µM as células aparecem acumuladas na fase  $G_2/M$  do ciclo celular, com 23,67% e 39,23%, para as vitafisalinas O e F, respectivamente, enquanto no controle o número de células em  $G_2/M$  foi de 8,3%. Na concentração de 10 µM a maioria das células se encontram na fase S do ciclo celular. A doxorubicina, que foi utilizada como controle positivo, apresentou um acúmulo de 64,24% das células na fase  $G_2/M$  do ciclo celular. As porcentagens, referentes ao número de células presentes em cada fase do ciclo celular, estão apresentadas na tabela 6.

Na figura 24 as fases do ciclo celular estão representadas sob a forma de histogramas, onde é possível se observar o acúmulo em  $G_2/M$  de células tratadas com a

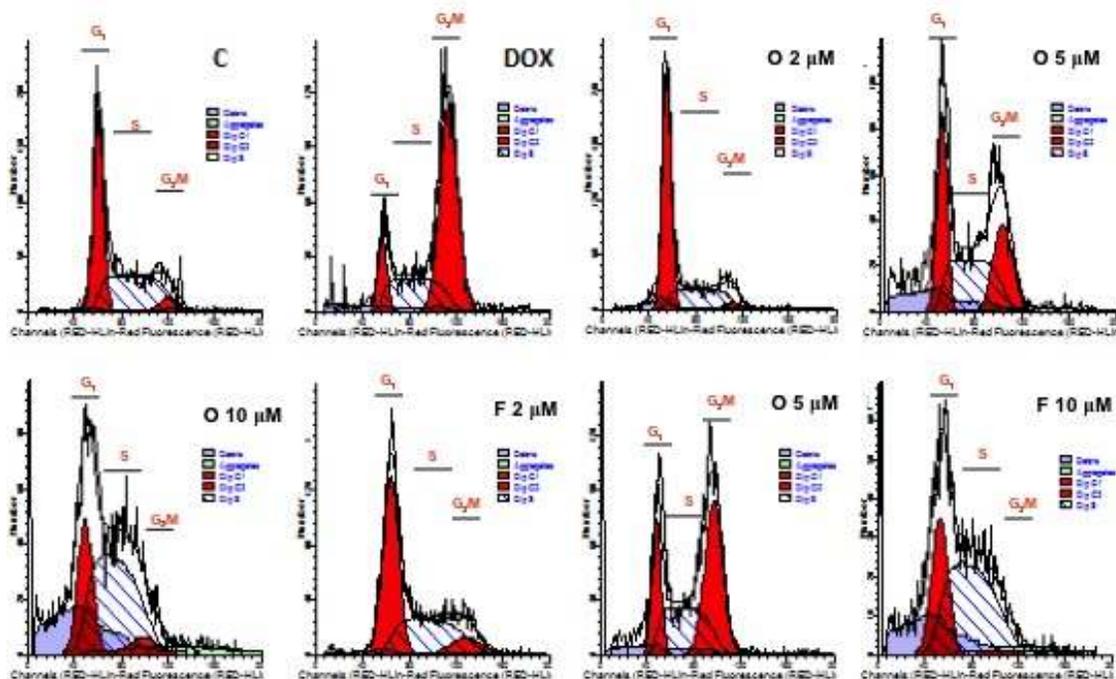
doxorubicina e as vitafisalinas F e O na concentração de 5  $\mu$ M. É possível observar também o aumento do número de células na fase S nos tratamentos com 10  $\mu$ M das duas vitafisalinas.

A vitafisalina F causou um aumento significativo da fragmentação de DNA, em todas as concentrações testadas, enquanto no tratamento com a vitafisalina O esses efeitos só foram observados nas duas maiores concentrações (Figura 25).

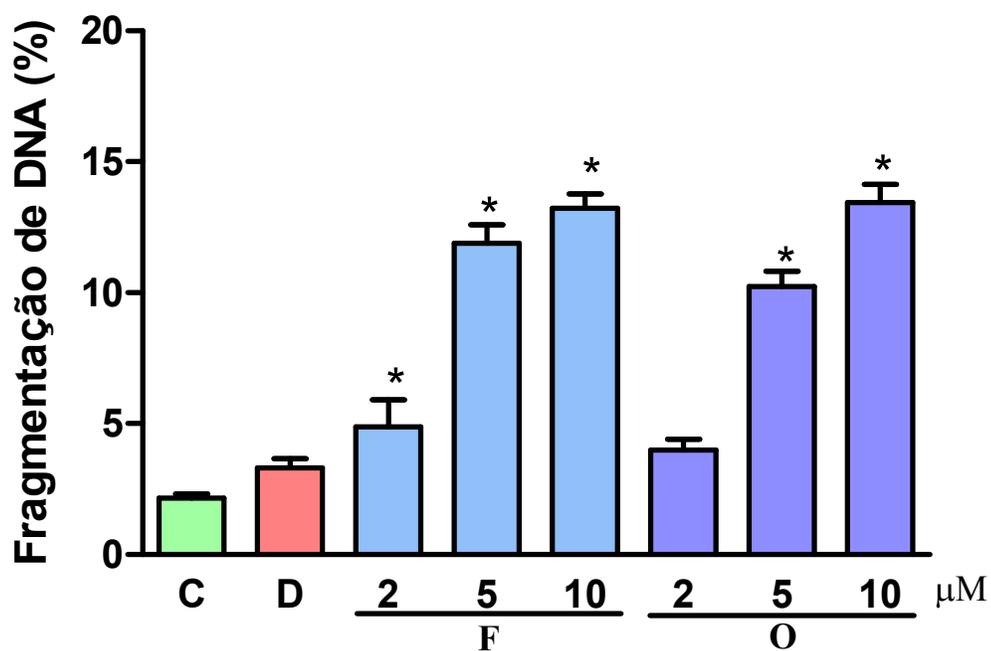
**Tabela 6** - Efeito das vitafisalinas F e O sobre a distribuição do ciclo celular em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,5  $\mu$ M) foi usada como controle positivo.

Substâncias	Concentração	Fase do ciclo celular (%)		
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
C	-	41.34	50.36	8.30
D	0.5	7.91*	29.55*	64.24*
	5	54.70*	41.74*	3.56
O	5	36.04	41.63*	23.67*
	10	33.83*	57.25	8.87
	2	55.65*	35.36*	10.03
F	5	24.51*	37.52*	39.23*
	10	35.24*	60.51*	4.25

Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.



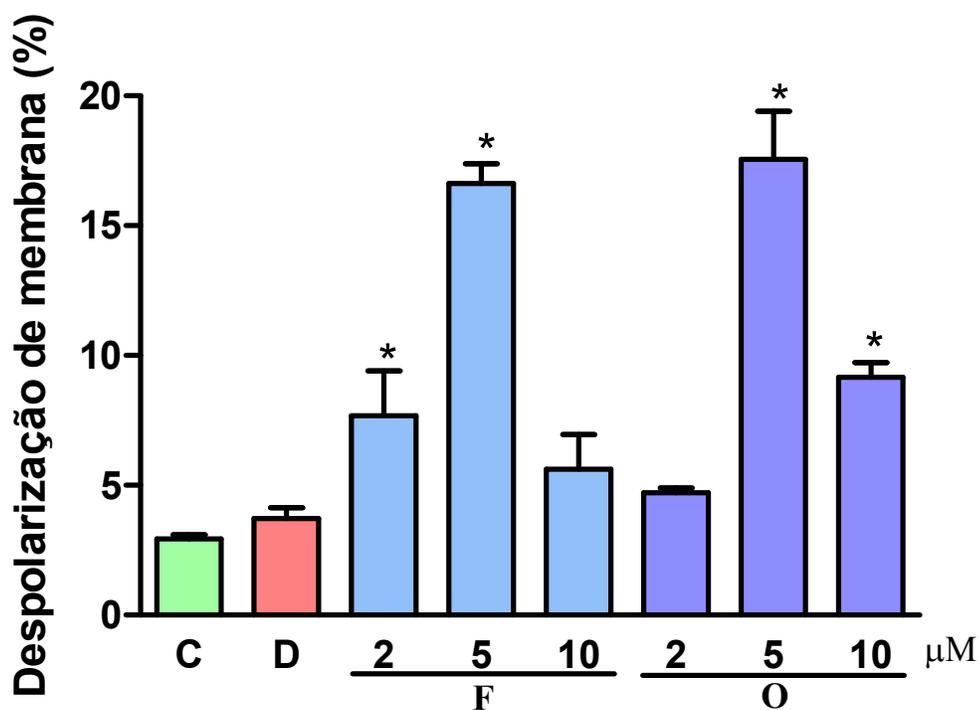
**Figura 24** - Efeito das vitafisalinas F e O sobre a distribuição do ciclo celular (eixo x: intensidade de fluorescência; eixo y: número de células) em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Os histogramas foram obtidos no programa ModFit LT 3.1, e representam a média de três experimentos independentes.



**Figura 25** - Efeito das vitafisalinas F e O sobre a fragmentação de DNA de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

#### 4.11 Determinação do Potencial Transmembrânico de Mitocôndria

Ambas vitafisalinas testadas causaram alterações no potencial transmembrânico das células de HL-60. Nas células tratadas com a vitafisalina F, já na concentração de 2  $\mu\text{M}$ , houve um aumento da despolarização mitocondrial (7,7 %) em relação ao controle (2,9 %). Na concentração de 5  $\mu\text{M}$  esse número foi de 16,6 %. No tratamento com a vitafisalina O os efeitos só foram observados nas duas maiores concentrações testadas (5 e 10  $\mu\text{M}$ ), com 17,5 e 9,2 % de células apresentando despolarização de mitocôndria, respectivamente. A doxorubicina não apresentou efeito significativo em relação ao controle (Figura 26).

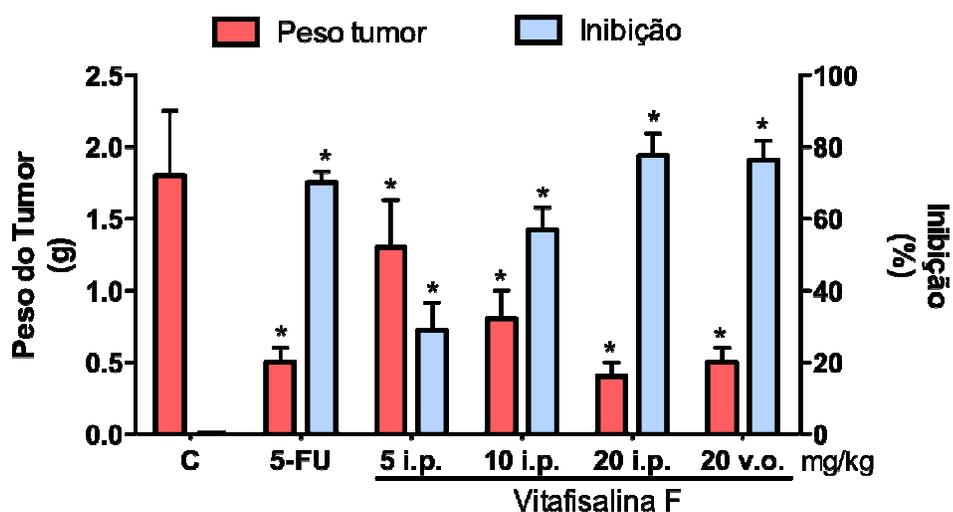


**Figura 26** - Efeito das vitafisalinas F e O sobre o potencial transmembrânico de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123 após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

#### **4.12 Avaliação da atividade antitumoral da vitafisalina F em camundongos transplantedos com Sarcoma 180**

A avaliação da atividade antitumoral da vitafisalina F foi realizada em camundongos *Mus musculus* Swiss utilizando o modelo experimental do Sarcoma 180. A vitafisalina F foi administrada nos animais pelas vias intraperitoneal (5, 10 e 20 mg/kg/dia) e oral (20mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. No 9º dia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para a retirada do tumor, fígado, baço e rins.

Em todas as doses testadas a vitafisalina F foi capaz de diminuir significativamente o crescimento da massa tumoral em relação ao controle negativo (DMSO 4%). O peso médio dos tumores dos animais tratados com DMSO 4% foi de  $1,83 \pm 0,45$  g, enquanto nos animais tratados com 5, 10 e 20 mg/kg/dia da vitafisalina F por via i.p. foi de  $1,32 \pm 0,33$ g,  $0,75 \pm 0,20$  g e  $0,37 \pm 0,10$  g, respectivamente. Já nos animais tratados com a vitafisalina F (20 mg/kg/dia) por via oral e nos animais tratados com 5-FU (25 mg/kg/dia), o peso médio dos tumores foi de  $0,53 \pm 0,09$  g e  $0,50 \pm 0,05$  g, respectivamente. Dessa maneira foi possível determinar os percentuais de inibição do crescimento tumoral. A vitafisalina F administrada por via i.p. inibiu em 28,94, 56,95 e 77,50 % o crescimento do tumor nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg/dia, respectivamente. Quando administrada por via oral (20 mg/kg/dia) a vitafisalina F inibiu em 76,30 % o crescimento tumoral. O 5-FU inibiu 70 % do crescimento tumoral (Figura 27).



**Figura 27** - Efeito da vitafisalina F nas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg/dia i.p. e 20 mg/Kg/dia v.o. sobre a proliferação tumoral de camundongos (*Mus musculos*) Swiss transplantedos com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento. C: o controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 4%). 5-FU: o 5-Fluorouracil (25 mg/Kg/dia) foi utilizado como controle positivo. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais. \*,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnet.

#### 4.12.1 Análise histopatológica dos órgãos

Após o tratamento com diferentes doses de vitafisalina F, o peso relativo úmido de alguns órgãos mostrou diferença estatística ( $p < 0,005$ ) quando comparados com os órgãos do grupo controle. Na dose de 20mg/Kg/dia v.o. não foi observada nenhuma alteração quanto ao peso dos órgãos dos animais tratados. Já na dose de 20mg/Kg/dia i.p. todos os órgãos analisados apresentavam peso maior em relação aos do controle negativo. Nas doses de 5 e 10 mg/Kg/dia i.p. apenas o baço e o fígado apresentavam diferença significativa em relação ao controle, respectivamente. No tratamento com 5-fluorouracil (25mg/Kg/dia) houve uma redução significativa no peso do baço ( $p < 0,05$ ) e um aumento do peso do rim em relação ao grupo controle (Tabela 7).

Histologicamente, os órgãos dos animais do grupo controle negativo (DMSO 4%) não apresentaram sinais graves de toxicidade, com o fígado apresentando degeneração hidrópica e balonzante, os rins com estrutura glomerular preservada e o baço apresentando vários megacariócitos.

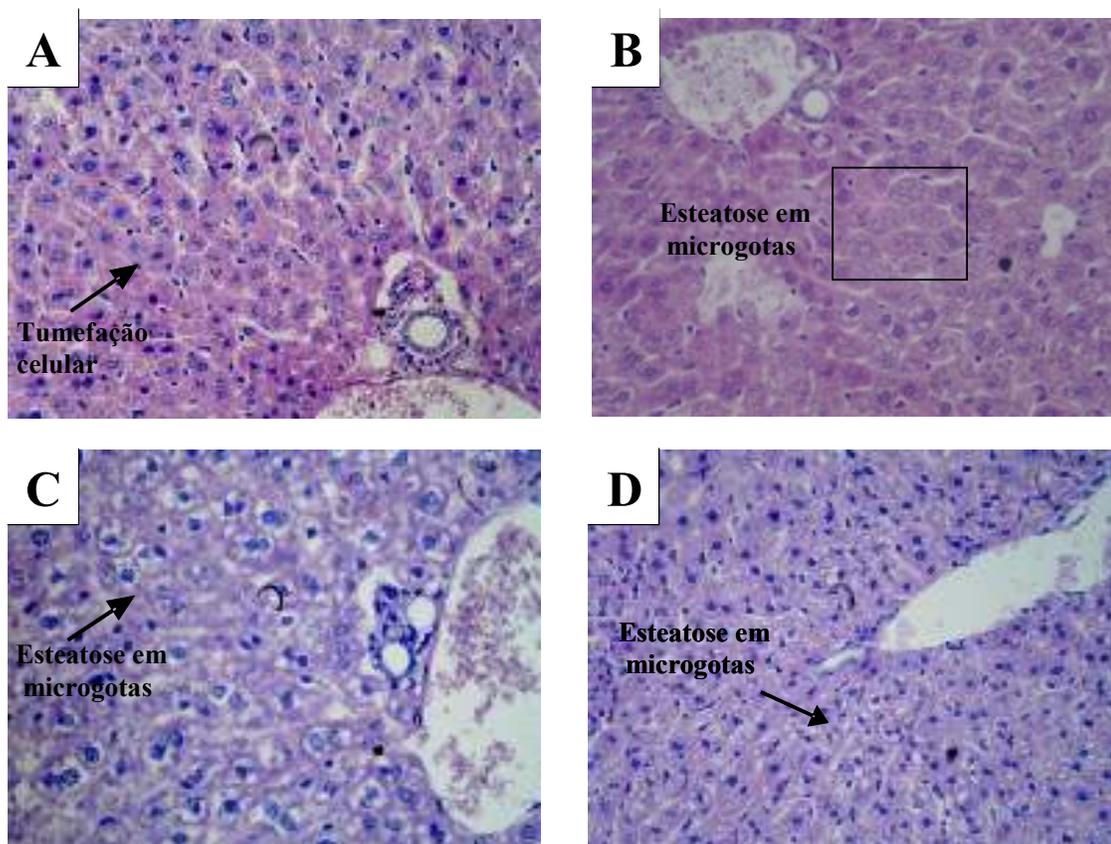
Na análise histopatológica dos órgãos dos animais tratados com a vitafisalina F apenas no fígado e nos rins foram encontradas alterações microscópicas (Figuras 28 e 29). No fígado os efeitos foram um pouco mais severos, com a presença de focos de necrose de hepatócitos, esteatose e tumefação celular. Já nos rins, foram encontrados cilindros hialinos e hemorragia glomerular. Nos animais tratados com 5-FU também foram encontrados sinais de toxicidade no fígado e nos rins, como: focos inflamatórios e intensa tumefação celular no fígado e presença de cilindros hialinos nos rins. Porém vale ressaltar que em nenhum dos grupos foi encontrado fibrose intersticial no fígado, e nos rins todos os grupos apresentavam glomérulos preservados, o que indica que esses efeitos podem ser passíveis de regeneração. No baço não foram encontradas nenhuma alteração em relação ao controle negativo (Figura 30).

Em todos os grupos o tumor era constituído por neoplasia maligna composta por células redondas, com binucleação, freqüentes figuras de mitose e diferentes graus de pleomorfismo celular e nuclear. Porém nos grupos tratados com a vitafisalina F foram encontradas diversas áreas de necrose, sendo estas mais predominantes no grupo tratado com 20 mg/Kg/dia i.p. e acompanhadas de intensa rarefação celular (Figura 31).

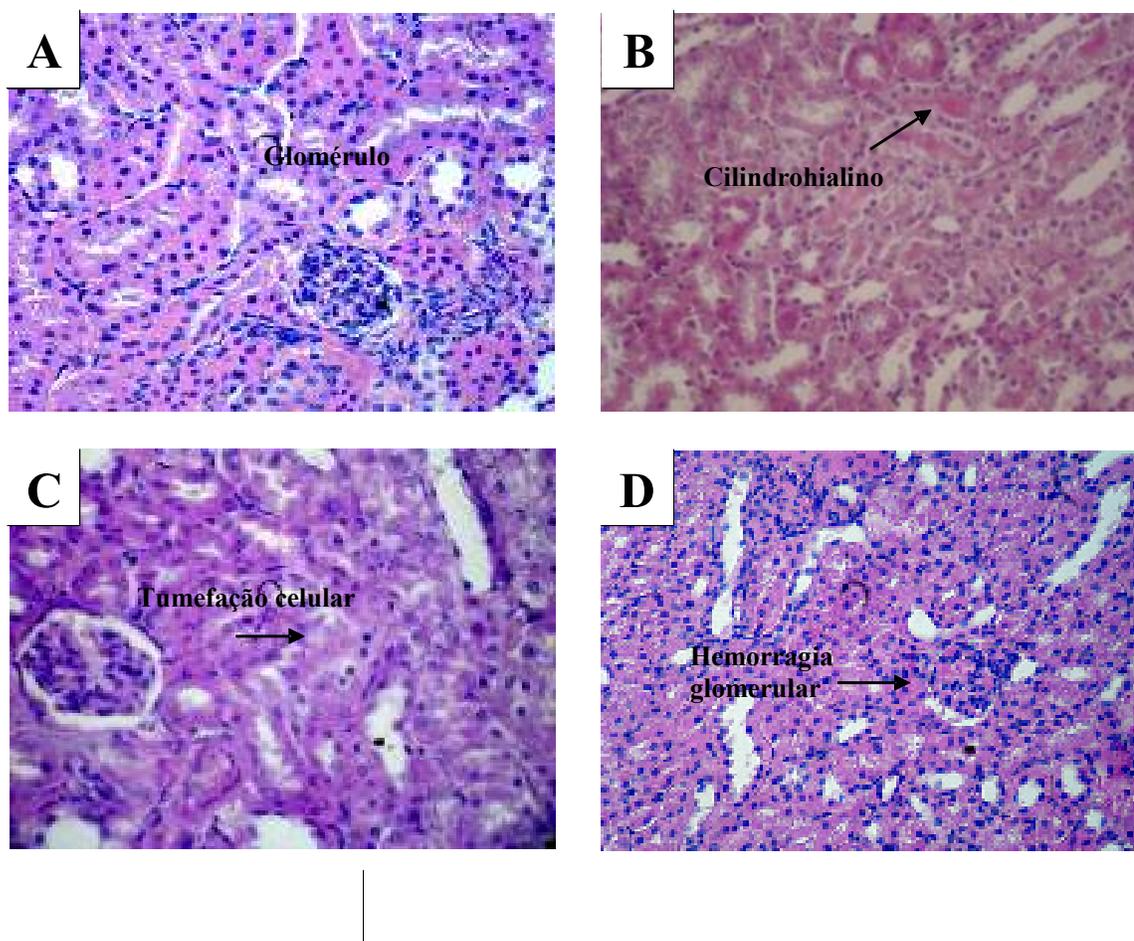
**Tabela 7** – Efeito da vitafisalina F nas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg/dia i.p. e 20 mg/Kg/dia v.o., sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento. C: o controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 4%). 5-FU: o quimioterápico 5-Fluorouracil (25 mg/Kg/dia) foi utilizado como controle positivo.

	<b>Dose</b> (mg/kg/dia)	<b>Baço</b> g/100g de massa corporea	<b>Rim</b> g/100g de massa corpórea	<b>Fígado</b> g/100g de massa corporea
<b>C</b>	-	0,35 ± 0,03	1,07 ± 0,06	4,64 ± 0,19
<b>5-FU</b>	25 i.p.	0,21* ± 0,04	1,30* ± 0,07	4,78 ± 0,24
	5 i.p.	0,71* ± 0,04	1,07 ± 0,04	4,28 ± 0,22
<b>Vitafisalina F</b>	10 i.p.	0,37 ± 0,03	1,11 ± 0,06	5,18* ± 0,28
	20 i.p.	0,55* ± 0,06	1,66* ± 0,08	5,55* ± 0,24
	20 v.o.	0,40 ± 0,04	1,20 ± 0,05	4,40 ± 0,23

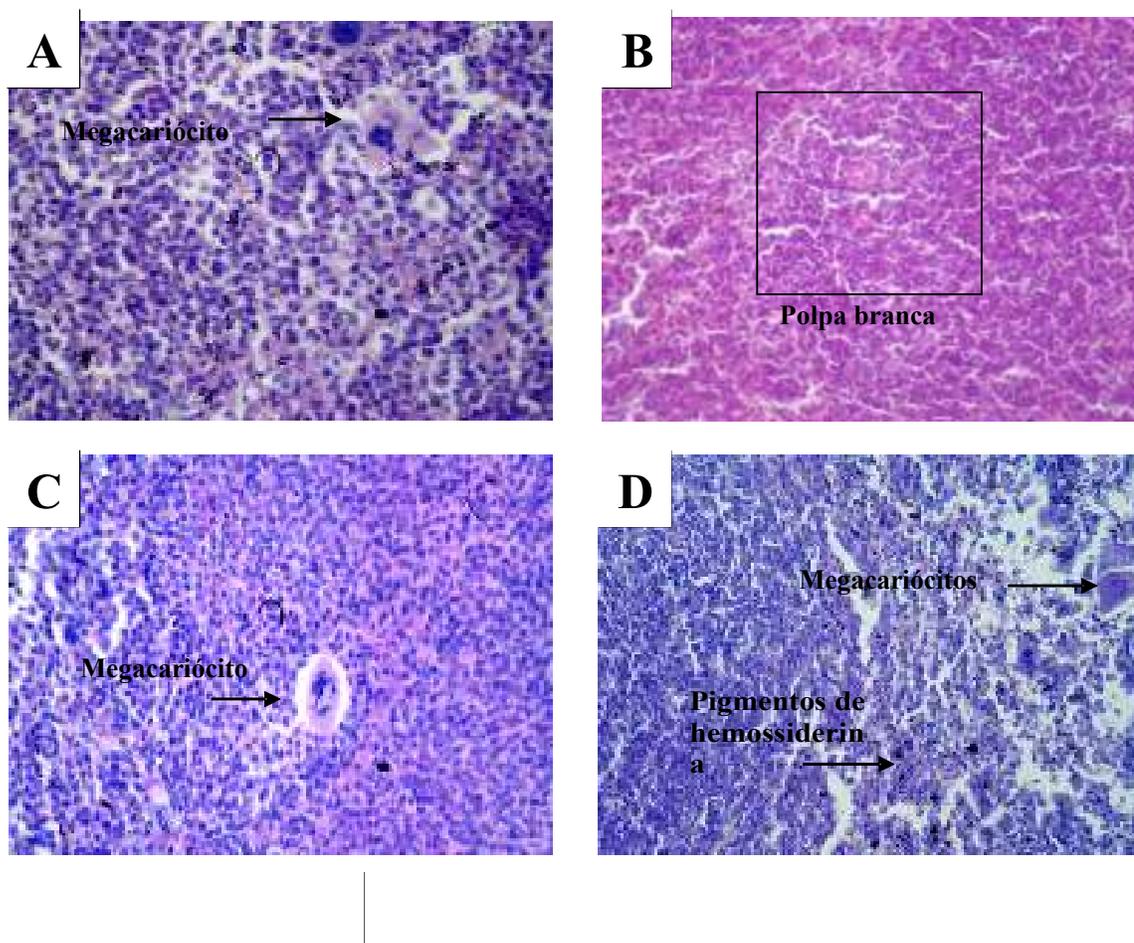
Os valores correspondem à média ± E.P.M. de 8 animais. \*,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnet.



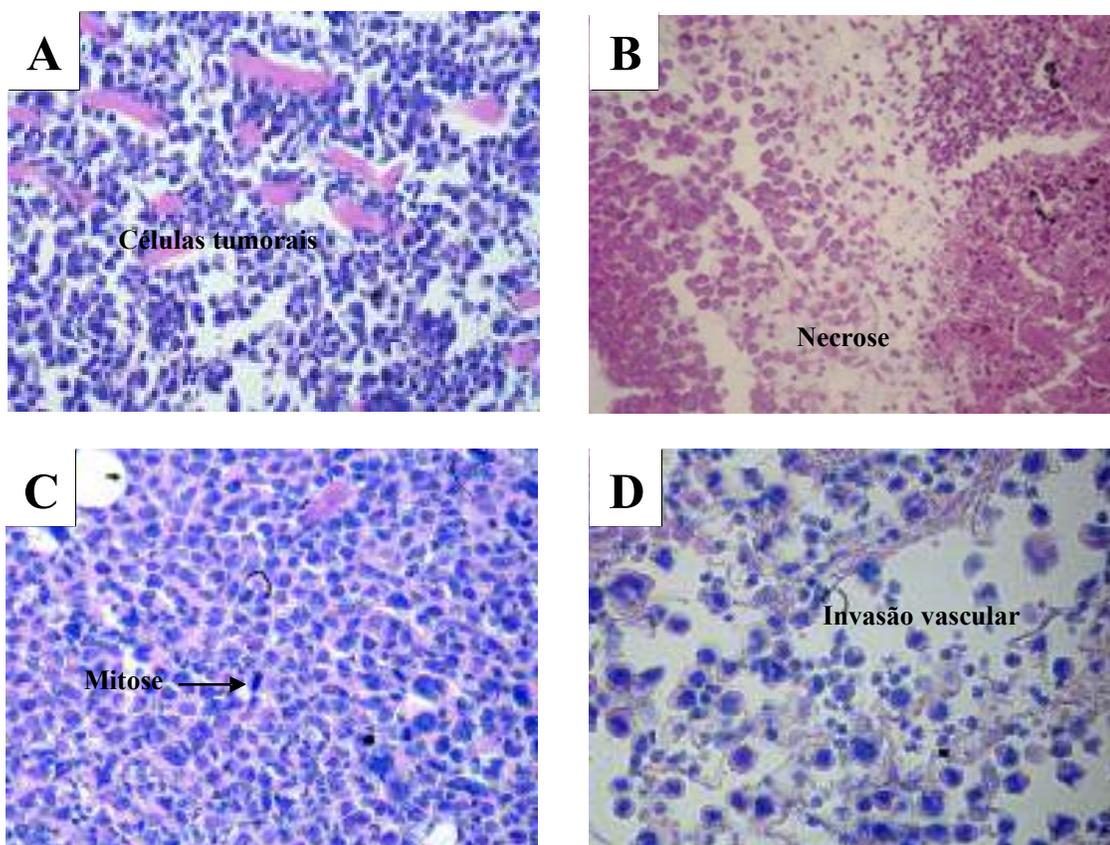
**Figura 28** - Fotomicrografia do fígado de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). A vitafisalina F foi administrada nas doses de 10 (C) e 20 (D) mg/kg/dia i.p. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.



**Figura 29** - Fotomicrografia dos rins de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). A vitafisalina F foi administrada nas doses de 10 (C) e 20 (D) mg/kg/dia i.p. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.



**Figura 30** - Fotomicrografia do baço de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). A vitafisalina F foi administrada nas doses de 10 (C) e 20 (D) mg/kg/dia i.p. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.



**Figura 31** - Fotomicrografia dos tumores de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). A vitafisalina F foi administrada nas doses de 10 (C) e 20 (D) mg/kg/dia i.p. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.

**Tabela 8** - Resumo dos resultados encontrados no estudo da atividade citotóxica das vitafisalinas.

<b>Estudo</b>	<b>Resultados</b>
<b>Atividade citotóxica <i>in vitro</i></b>	
Em células tumorais	+++
Em células normais	+++
<b>Estudo do mecanismo de ação citotóxico</b>	
Inibição da síntese de DNA	+++
Morfologia diferencial por Laranja de acridina/Brometo de etídeo	Apoptose
Morfologia diferencial por Hematoxilina/Eosina	C.R.
Morfologia diferencial por May-Grunwald-Giemsa	C.R.
Integridade de membrana	+
Análise do ciclo celular	Parada em G <sub>2</sub> /M
Indução de fragmentação do DNA	+
Potencial transmembrana de mitocôndria	+
<b>Genotoxicidade</b>	
Em células de HL-60	+++
Em células normais	+++
<b>Atividade <i>in vivo</i></b>	
Sarcoma 180	+++
Toxicidade sistêmica	++

(+) Efeito Fraco; (++) Efeito Moderado; (+++) Efeito Forte; (C.R.) Corroboração com os demais resultados.

# *Discussão*

## 5 DISCUSSÃO

A utilização de plantas no tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Hoje em dia as plantas são consideradas uma fonte inesgotável de produtos naturais, com uma diversidade de mais de 250 mil espécies no mundo, onde apenas 10% destas têm sido estudadas quanto às suas propriedades farmacológicas e fitoquímicas (BALLADRIN *et al.*, 1993). Nos últimos 25 anos, de todos os compostos bioativos descobertos, 63% são produtos naturais, derivados deles ou possuem estruturas baseadas em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Nos últimos 10 anos, plantas da família Solanaceae têm despertado um grande interesse nos cientistas, pelo fato de muitas destas plantas serem utilizadas na medicina popular. A *Withania somnifera*, popularmente conhecida como “ginseng indiano”, há séculos vem sendo utilizada na medicina ayurvedica como antitumoral, antipirético, antiinflamatório, imunomodulador, anticolinesterásico, em problemas cardiovasculares e obesidade e também por seus efeitos anti-stress (SBOHAT *et al.*, 1967; SHETI *et al.*, 1970; BUDHIRAJA *et al.*, 1987; DEVI *et al.*, 1992; AGARWAL *et al.*, 1999; ARCHANA; NAMASIVAYAM, 1999; JAYAPRAKASAM *et al.*, 2003; SENTHIL *et al.*, 2007). Muitos destes efeitos são atribuídos à presença da vitaferina A, ou ainda, a outros vitaesteróides (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2003; JAYAPRAKASAM; NAIR, 2003; MOHAN *et al.*, 2004; YOKOTA *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2007; BARGAGNA-MOHAN *et al.*, 2007). A vitaferina A, por sua vez, foi isolada pela primeira vez da *Acnistus arborescens* por Kupchan *et al.* (1965), que posteriormente atribuiu o efeito antitumoral do extrato das folhas dessa planta à presença de vitaferina A (KUPCHAN *et al.*, 1969). Desde então, outros autores reportaram a ocorrência de vitaesteróides citotóxicos nesta espécie incluindo as vitafisalinas (MINGUZZI *et al.*, 2002; VERAS *et al.*, 2004a; 2004b), contudo, não foi realizado um estudo detalhado dos mecanismos envolvidos nesta citotoxicidade. Com isso, o presente trabalho visa estudar melhor a atividade dessas vitafisalinas, e seus possíveis mecanismos de ação, utilizando células tumorais em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Inicialmente, foi avaliado o potencial citotóxico dessas vitafisalinas em 5 linhagens de células tumorais através do método do MTT. Estudos de “screening” utilizando MTT tem sido uma ferramenta essencial e eficaz para avaliar o potencial citotóxico de substâncias (ALLEY *et al.*, 1988). O parâmetro utilizado para avaliar essa toxicidade é a viabilidade celular, que no caso do MTT é determinada pela atividade de enzimas mitocondriais. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* são reprodutíveis, rápidos, baratos e

analisam vários compostos de uma só vez, e apesar de não permitirem identificar o mecanismo de ação dos compostos, eles são os primeiros testes realizados para identificar novos compostos com potencial anticâncer (TAKIMOTO, 2003; BERRIDGE *et al.*, 1996).

Os efeitos citotóxicos das vitafisalininas O, M e N em linhagens tumorais de pulmão (Lu1), próstata (LNCaP) e mama (MCF7) já haviam sido reportados em Veras *et al.* (2004a), enquanto que os efeitos das vitafisalininas F e (17*S*, 20*R*, 22*R*)-5 $\beta$ , 6 $\beta$ :18,20-2-Diepóxi-4 $\beta$ , 18-diidróxi-1-oxovita-3-24-enolido foram previamente avaliados nas linhagens B16 (melanoma), SF268 (sistema nervoso central), NCI-H-460 (pulmão), HCT-8 (colon), HL-60 e CEM (leucemias) por Veras *et al.* (2004b).

No presente trabalho, o painel de linhagens testadas foi ampliado. As vitafisalininas O, F, M e N foram citotóxicas nas linhagens tumorais testadas, com exceção das linhagens PC-3 e SF-295 em que as vitafisalininas M e N apresentaram CI<sub>50</sub> acima de 10,0  $\mu$ M, respectivamente. Vale ressaltar que a vitafisalinina N foi menos citotóxica do que a vitafisalinina M em todas as linhagens, com exceção da PC-3, onde esta última apresentou CI<sub>50</sub> de 14,6  $\mu$ M contra 6,2  $\mu$ M da vitafisalinina N. Os resultados também mostraram que a linhagem de HL-60 foi a mais sensível aos efeitos citotóxicos das vitafisalininas, onde inclusive a vitafisalinina (17*S*, 20*R*, 22*R*)-5 $\beta$ , 6 $\beta$ :18,20-2-Diepóxi-4 $\beta$ , 18-diidróxi-1-oxovita-3-24-enolido, a menos ativa dentre as cinco testadas, apresentou CI<sub>50</sub> de 6,8  $\mu$ M.

Ao fazermos uma análise estrutural das vitafisalininas estudadas, é possível observar que existem apenas duas diferenças básicas entre elas, uma que se refere à ligação dupla entre C2 e C3 e outra que se refere ao grupamento ligado ao C18 (Figura 32).

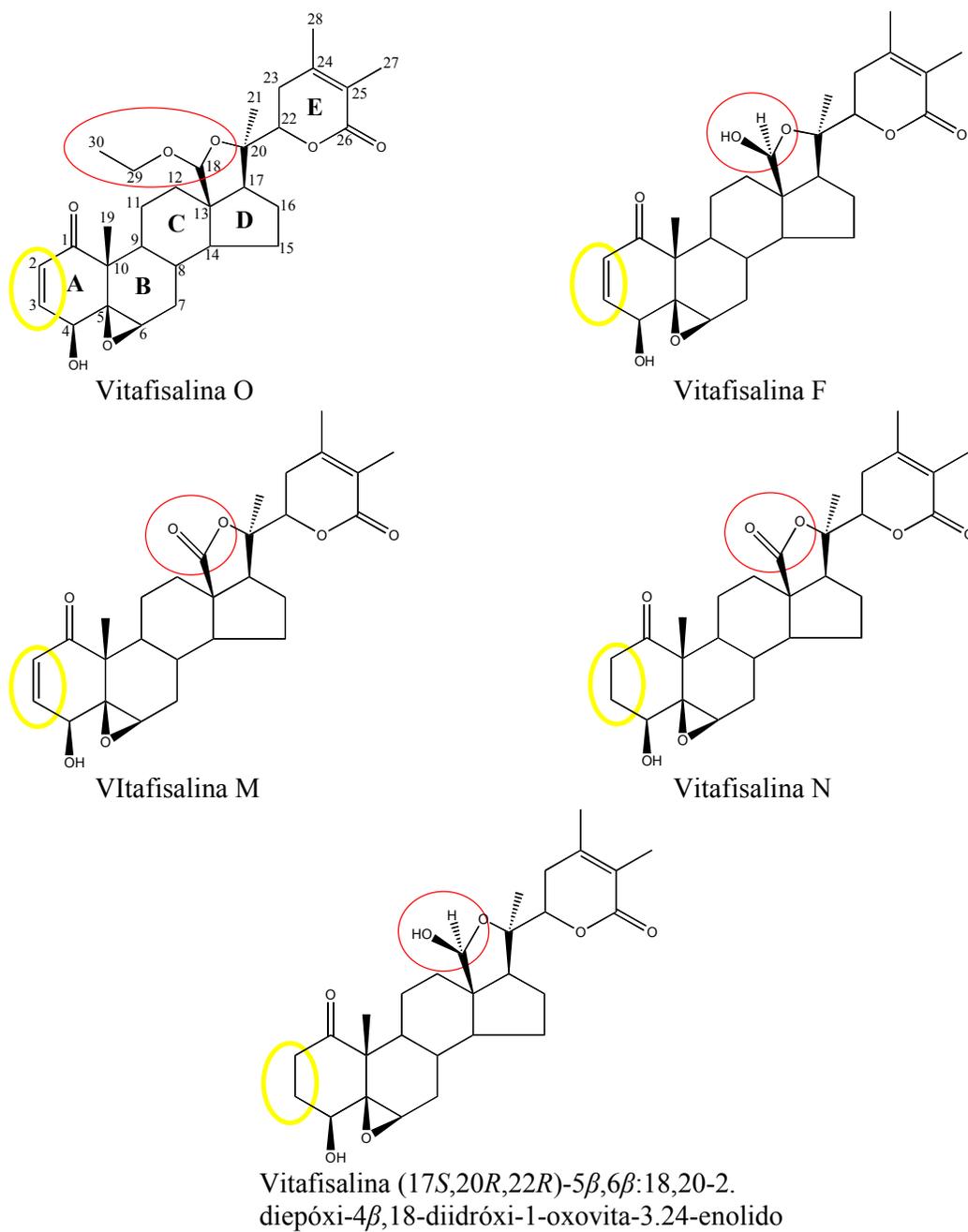
De acordo com trabalhos anteriores, a unidade 4 $\beta$ -hidroxi-2-en-1-ona, composta por uma carbonila ligada ao C1, uma ligação dupla entre C2 e C3 e uma hidroxila no C4, seriam requisitos estruturais necessários para os efeitos farmacológicos dos vitaesteróides (CARDONA *et al.*, 2006; SU *et al.*, 2002; MISICO *et al.*, 2002; KUROYANAGI *et al.*, 1999; DAMU *et al.*, 2007). Essa ligação dupla entre C2 e C3 parece ser essencial para a atividade citotóxica dos vitaesteróides, já que a quebra dessa ligação acarreta na perda de atividade desses compostos (SU *et al.*, 2002; VERAS *et al.*, 2004b; MAGALHÃES *et al.*, 2006; DAMU *et al.*, 2007). De fato esses achados corroboram com nossos resultados, já que as vitafisalininas O, F e M, que apresentam a mesma unidade 4 $\beta$ -hidroxi-2-en-1-ona no anel A, foram bem mais citotóxicas que as vitafisalininas N e (17*S*, 20*R*, 22*R*)-5 $\beta$ , 6 $\beta$ :18,20-2-Diepóxi-4 $\beta$ , 18-diidróxi-1-oxovita-3-24-enolido que não possuem a ligação dupla entre C2 e C3.

Além da unidade 4 $\beta$ -hidroxi-2-en-1-ona, a presença do anel epóxido em C5 e C6 também parece ser favorável a citotoxicidade dos vitaesteróides, pois quando esse anel é

quebrado ou os carbonos 5 e 6 se encontram ligados a outros grupamentos, a atividade citotóxica desses compostos é bastante diminuída (SU *et al.*, 2002; MAGALHÃES *et al.*; 2006; DAMU *et al.*, 2007). De acordo com Damu *et al.* (2007) a quebra simultânea dessas duas unidades (4 $\beta$ -hidroxi-2-en-1-ona e 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epóxido) acarreta na perda total de citotoxicidade dos vitaesteróides. De acordo com Gibson e Skett (2001), os epóxidos são grupamentos eletrofílicos capazes de se ligar de modo irreversível aos ácidos nucléicos e a várias proteínas celulares.

Em Cardona *et al.* (2006), esses dois grupamentos (cetona- $\alpha,\beta$  insaturada e 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epóxido) também foram relacionados como sendo os responsáveis pela atividade antiparasitária de certos vitaesteróides (NAGAFUJI *et al.*, 2004; ABE *et al.*, 2006; CHOUDARY *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2008).

Levando-se em consideração a estrutura das três vitafisalinas mais potentes (O, F e M), observamos que todas possuem a unidade 4 $\beta$ -hidroxi-2-en-1-ona e a única diferença entre elas é o grupamento ligado ao carbono 18, onde a vitafisalina O, que mostrou ser a mais citotóxica, possui uma etoxila, e as vitafisalinas F e M, que foram a segunda e terceira mais potentes, possuem uma hidroxila e uma carbonila, respectivamente. Como mencionado anteriormente, o que confere maior citotoxicidade a esses compostos é uma ligação dupla entre C2 e C3, e esse efeito pode aumentar ou diminuir dependendo do grupamento ligado ao C18. De acordo com o observado, a etoxila ligada ao C18 confere maior potência às vitafisalinas, seguido da ligação de uma hidroxila e de uma carbonila. Contudo, muito há o que se pesquisar para a maior compreensão da relação estrutura-atividade nesses compostos.



**Figura 32** - Estruturas químicas das vitafisalinas estudadas. As diferenças estruturais entre os compostos se encontram em destaque.

Um dos grandes problemas evidenciados no uso de quimioterápicos para o tratamento do câncer são os seus efeitos colaterais. Grande parte desses efeitos se deve principalmente a baixa seletividade desses fármacos por células tumorais, onde as células normais mais afetadas são as que se proliferam rapidamente, como as células da pele, do trato gastrointestinal, plaquetas, glóbulos vermelhos (hemácias) e brancos (leucócitos) (ANAZETTI *et al.*, 2003). Hoje em dia o objetivo principal da quimioterapia é destruir apenas as células tumorais, tentando preservar as células normais.

A fim de avaliar se as vitafisalinas apresentavam alguma seletividade para células normais ou tumorais, foram realizados testes utilizando células mononucleadas isoladas de sangue periférico humano. Apenas as vitafisalinas O, F e N foram avaliadas quanto à citotoxicidade sobre células PBMC, e os resultados mostraram que as vitafisalinas atuam também sobre células normais. As vitafisalinas O e F foram as mais citotóxicas, com  $CI_{50}$  de 3,8 e 1,2  $\mu\text{M}$  respectivamente, já a vitafisalina N apresentou  $CI_{50}$  de 16,4  $\mu\text{M}$ . Ao compararmos com os valores de  $CI_{50}$  de HL-60 (0,7, 0,8 e 2,7  $\mu\text{M}$  para vitafisalina O, F, e N respectivamente) observamos que esses compostos não apresentam muita seletividade em relação a células normais. Embora as  $CI_{50}$  tenham sido 4x maiores do que em células leucêmicas, esses valores ainda são considerados citotóxicos, levando-se em consideração que são células normais.

O teste do cometa tem sido bastante utilizado para se avaliar a segurança de novos fármacos (HARTMANN *et al.*, 2003), uma vez que é considerado um método bastante sensível, em relação à detecção da quebra de fitas simples ou dupla do DNA (GONTIJO; TICE, 2003). Os resultados deste teste mostraram que as vitafisalinas testadas (O, M e N) causaram dano ao DNA tanto em células leucêmicas quanto em células normais, ressaltando a baixa seletividade destes compostos.

A importância da avaliação genotóxica dos fármacos, resulta da possibilidade deles próprios induzirem mutações, elevando desta forma o risco de formação de células defeituosas. Se as células que sofreram danos em seu DNA sobreviverem, elas transmitirão essas alterações às suas células filhas, o que pode acarretar no desenvolvimento de células neoplásicas. Contudo, o ensaio do cometa não prevê necessariamente o potencial mutagênico ou carcinogênico das substâncias testadas, uma vez que detecta alterações no DNA que podem ou não ser reparadas eficientemente (ALBERTINI *et al.*, 2000). Desta maneira, os efeitos genotóxicos sobre as células normais não obrigatoriamente indicam um potencial carcinogênico das vitafisalinas, mas ressaltam sua capacidade de induzir dano ao DNA das células tratadas.

A fim de entender melhor os efeitos desses compostos, foi avaliado a cinética de crescimento de duas linhagens leucêmicas, HL-60 e K-562, sob o efeito das vitafisalinas O, F, M e N. O possível mecanismo pelo qual essas vitafisalinas exercem seu efeito citotóxico também foi analisado em células das linhagens HL-60 e K-562, utilizando os seguintes métodos: avaliação da síntese de DNA por incorporação de 5-BrdU, análise morfológica por coloração com hematoxilina/eosina e acridina laranja/brometo de etídeo, ativação de caspase e análises utilizando citometria de fluxo. Por último, foi avaliada a atividade antitumoral da vitafisalina F em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180.

Modelos celulares são ferramentas úteis e necessárias para observar a toxicidade de um composto, traduzida, inicialmente, pela sua capacidade em induzir morte celular, onde as linhagens HL-60 e K-562 são um dos modelos celulares mais utilizados (COLLINS, 1987; GRZANKA *et al.*, 2003.) As células da linhagem HL-60 são derivadas do sangue periférico de um paciente com leucemia promielocítica aguda, tendo sido caracterizada e sua cultura primeiramente estabelecida por Collins *et al.* (1977). Essa linhagem pode ser caracterizada pela predominância de neutrófilos promielocíticos proeminentemente assincrônicos na relação núcleo/citoplasma, diferenciação espontânea de 10% das células cultivadas para o estágio monocítico e atividade fagocitária e quimiotática (GALLAGHER *et al.*, 1979; COLLINS, 1987). A leucemia mielocítica crônica humana (LMC) é uma malignidade hematológica caracterizada pela translocação recíproca balanceada do protooncogene c-abl do cromossomo 9 para uma região do gene Bcr no cromossomo 22 (MARU, 2001). Isto leva à formação do cromossomo Filadélfia (cromossomo Ph). A resistência de células das linhagens de LMC, como por exemplo, K-562, à indução de apoptose por vários agentes antineoplásicos, incluindo o etoposídeo e a cisplatina, é atribuída a essa presença do cromossomo Ph (SLUPIANEK *et al.*, 2000; Di BACCO *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2002).

A construção da curva de crescimento demonstra bem os efeitos das vitafisalinas sobre a proliferação celular destas linhagens, e os resultados condizem com os do MTT, onde a vitafisalina O foi a mais potente, agindo já nas primeiras 12 horas de tratamento, seguida das vitafisalinas F, M e N, respectivamente. Interessantemente, assim como ocorreu com a linhagem PC-3 no ensaio do MTT, a vitafisalina N se mostrou mais potente que a vitafisalina M quanto à inibição da proliferação celular da linhagem K-562, o que mostra mais uma vez que cada vitafisalina pode agir de modo específico em diferentes linhagens de células.

Todas as vitafisalinas testadas causaram efeitos tanto citotóxicos, como citostáticos, dependente de concentração. Nas maiores concentrações testadas (em torno de 10

$\mu\text{g/mL}$ ) é possível observar o efeito citotóxico das vitafisalinas, através da redução do número de células viáveis e aumento das não-viáveis, a partir de 24 h de tratamento, e se estendendo até o final do tratamento. Já nas concentrações intermediárias (em torno de  $2 \mu\text{M}$ ) é possível observar um efeito citostático, pois o número de células viáveis permanece praticamente inalterado com o aumento do tempo de incubação, o que indica que as células não estão proliferando.

Desta forma, as vitafisalinas foram então avaliadas, através do método de incorporação do BrdU, quanto as suas capacidades em inibir a síntese de DNA. O ciclo celular de células em proliferação é composto pelas fases  $G_1$ , S,  $G_2$  e M. Na fase S todo material genético da célula precisa ser duplicado, para que as células filhas adquiram o mesmo DNA da célula mãe, e como o BrdU é um análogo da timina, é nesse momento da síntese do DNA que ele vai ser incorporado. Esse BrdU, então, pode ser detectado através de anticorpos específicos e de técnicas de imunocitoquímica. Células que não estão se proliferando não estão sintetizando DNA e portanto não irão incorporar o BrdU.

Nesse ensaio, as três vitafisalinas testadas (M, N e O) diminuíram de 81 a 99,5 % a síntese de DNA na linhagem de HL-60 e em torno de 60 % na linhagem de K-562. Em Veras *et al.* (2004b) também foi reportado os efeitos das vitafisalinas F e (17S, 20R, 22R)-5 $\beta$ , 6 $\beta$ :18,20-2-Diepóxi-4 $\beta$ , 18-diidróxi-1-oxovita-3-24-enolido sobre a síntese de DNA de células de HL-60, onde a vitafisalina F inibiu em 68% a síntese do DNA. Esses resultados corroboram com a diminuição na proliferação observada na curva de crescimento.

A coloração por BE/AL permite analisar as características morfológicas das células, podendo sugerir de que forma as vitafisalinas causam a morte celular, seja por necrose ou apoptose.

A apoptose, uma das formas de morte celular programada, desempenha papel fundamental na manutenção da homeostase em vários sistemas biológicos, regulando o número de células e eliminando células danificadas e senescentes. O mau funcionamento do mecanismo de apoptose pode ocasionar diversas patologias, inclusive câncer (MAJNO; JORIS, 1995; OPALKA *et al.*, 2002). Células em apoptose apresentam algumas alterações morfológicas e metabólicas características, como: diminuição do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, alteração no potencial transmembrânico da mitocôndria (Van CRUCHTEN; Van den BROECK, 2002). Diferentemente da apoptose, a morte por necrose é caracterizada pelo aumento do volume celular seguido da perda da integridade da membrana plasmática e consequente liberação dos componentes celulares e indução de inflamação (WILLEY *et al.*, 1980).

A análise morfológica, por BE/AL, das células (HL-60 e K-562) tratadas com as vitafisalinas, mostrou alterações características tanto de apoptose como de necrose, onde mais da metade das células já se encontravam em processo de morte. Embora tenha sido observado um grande número de células necróticas, a apoptose parece ser o principal mecanismo de morte das vitafisalinas, já que no final do processo de apoptose, também chamado de apoptose tardia, as células passam a apresentar lesões em suas membranas, levando a necrose secundária.

Para aprofundar os estudos dos efeitos celulares das vitafisalinas O e F, foram realizados experimentos em HL60 utilizando citometria de fluxo. Nesses experimentos foram avaliados os seguintes parâmetros: número de células, integridade de membrana, despolarização mitocondrial, ciclo celular e fragmentação de DNA. Nesses experimentos, também foi evidenciada uma diminuição significativa do número de células em todas as concentrações testadas (2, 5 e 10  $\mu\text{M}$ ), corroborando os dados da curva de crescimento e da inibição da incorporação de BrdU.

Já com relação a análise da integridade de membrana, na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , apenas a vitafisalina F causou uma leve diminuição na viabilidade das células, enquanto que na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , ambas vitafisalinas diminuíram o percentual de células com membrana íntegra. Como dito anteriormente, a perda da integridade da membrana plasmática é uma das características da morte celular por necrose, ao passo que, a fragmentação de DNA nas células com membrana íntegra seria uma alteração típica de um processo de apoptose. De fato, o número de células com DNA fragmentado aumentou significativamente também naquelas concentrações (2 e 5  $\mu\text{M}$ ) onde a integridade de membrana não estava alterada, o que é mais um indício da indução de apoptose por esses compostos.

A análise do ciclo celular também evidenciou um aumento do número de células em  $G_2/M$ , no tratamento com a concentração de 5  $\mu\text{M}$ , indicando que o bloqueio da proliferação ocorre posteriormente aos eventos envolvidos na síntese de DNA. Já na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , houve uma diminuição do número de células na fase  $G_2/M$  do ciclo acompanhado de um aumento de  $\pm 11\%$  na fragmentação de DNA, o que provavelmente aconteceu devido a morte das células e que se encontravam em  $G_2/M$  por apoptose, levando a uma diminuição do número de células.

Um outro indício da indução de apoptose pelas vitafisalinas, foi a diminuição do potencial transmembrânico da mitocôndria, que pode ser observado com o uso da rodamina 123. A mitocôndria tem papel fundamental na deflagração da via intrínseca da apoptose. Varias proteínas intracelulares participam da ativação dessa via de morte celular. As proteínas

próapoptóticas, da família Bcl-2, Bax e Bak se ligam a receptores na membrana externa da mitocôndria causando o aumento da sua permeabilidade (HENGARTNER, 2000). Outras proteínas proapoptóticas como a Bad e Bid, também da família Bcl-2, atuam ou inibindo o efeito das proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub>) ou se ligando diretamente às proteínas Bax-simili ativando-as. Alguns estímulos podem causar a formação de poros na membrana interna da mitocôndria, o que acarreta na passagem de água e de algumas moléculas para o espaço intermembrana e conseqüentemente ruptura da membrana externa mitocondrial. Com a membrana da mitocôndria rompida, uma das primeiras proteínas a serem liberadas no citoplasma é o citocromo *c*. Na presença de ATP, esse citocromo *c* logo se liga a Apaf-1 e a caspase 9, formando um complexo chamado de apoptossoma (LI *et al.*, 1997). O apoptossoma, então, é encarregado de ativar as caspases 3 e 7, também chamadas de caspases efetoras, que por sua vez vão clivar outros substratos protéicos da célula resultando no processo apoptótico.

Apesar de, tanto a fragmentação de DNA quanto a diminuição do potencial transmembrânico de mitocôndria serem característicos da apoptose, esses efeitos também podem ser encontrados em células em necrose, o que talvez colocasse em dúvida o verdadeiro mecanismo citotóxico das vitafisalinas. No entanto a indução de apoptose pôde ser confirmada pela capacidade das vitafisalinas induzirem a ativação da caspase 3, na linhagem de HL-60, uma enzima essencial para o processo de apoptose e que até então não foi evidenciada em células necróticas (DONG *et al.*, 1997; SAIKUMAR *et al.*, 1999; GUO; HAY, 1999; *apud* Van CRUCHTEN; Van de BROECK, 2002). Nesse caso, após um período de 24h de incubação com as vitafisalinas (O, M e N), apenas na linhagem de HL-60 é que houve um aumento significativo da quantidade de caspase 3, enquanto os níveis dessa enzima permaneceram inalterados na linhagem K-562, nesse mesmo período de incubação. Como mencionado anteriormente as células da linhagem K-562 são relativamente mais resistentes à indução de apoptose por vários agentes antineoplásicos (McGAHON *et al.*, 1995), e Cao *et al.* (2004) demonstrou que a ativação de caspase 3 em células de HL-60 já é evidente após as primeiras 4 horas de tratamento. No entanto, na linhagem de K-562 os níveis dessa enzima permanecem constantes até 24 horas de tratamento, e só a partir daí vão aumentando gradativamente após esse intervalo. Talvez isso explique a ausência de ativação de caspase 3 em células de K-562 tratadas com as vitafisalinas por 24 horas.

Dados da literatura (SENTHIL *et al.*, 2007) corroboram com os resultados apresentados no presente trabalho, onde outro vitaesteróide, o vitanolídeos (5 $\alpha$ -etoxi-1-oxo-6 $\beta$ ,14 $\alpha$ ,17 $\beta$ ,20-tetrahidroxi-20S-22R-vita-2,24-dienolideo), também diminuiu a viabilidade de

células HL-60 através da ativação de caspases pela liberação do citocromo *c* da mitocôndria Senthil *et al.* (2007) também observaram, por *western blot*, que as proteínas Bcl-2 estavam sendo subexpressas e que havia um aumento na expressão das proteínas Bax pelas células tratadas com esses vitaesteróides.

Apesar de vários autores ressaltarem os efeitos citotóxicos e antitumorais dos vitaesteróides, o mecanismo de ação desses compostos ainda não foi completamente elucidado.

Um dos mecanismos propostos para a vitaferina A é a sua interação com proteínas do citoesqueleto (FALSEY *et al.*, 2006; BARGAGNA-MOHAN *et al.*, 2007). O citoesqueleto está envolvido na locomoção e manutenção da morfologia celular, fagocitose, transporte intracelular e formação do fuso mitótico durante a divisão celular (ALBERTS *et al.*, 2004).

Yang *et al.* (2007) reportou que o alvo primário da vitaferina A poderia ser o proteossoma das células. O proteossoma é um complexo de proteases que fazem parte de um sistema de “controle de qualidade de proteínas”, cuja função principal é a degradação de proteínas danificadas ou desnecessárias para a célula. O proteossoma tem um papel essencial na regulação do ciclo celular. O ciclo celular é regulado por um complexo de ciclina-cdk, e essas ciclina-cdks são específicas pra cada fase, de modo que elas são sintetizadas e degradadas a cada ciclo. A degradação dessas ciclinas é feita pelo proteossoma, especificamente a ciclina B, que está presente na fase M do ciclo celular, e é necessária sua degradação para que o ciclo seja completado (CHESNEL *et al.*, 2006).

Através de programas computacionais de modelagem molecular, Yang *et al.* (2007) mostrou que as duas cetonas presentes na estrutura da vitaferina A (anel A e E) se ligavam a hidroxila da porção 5 $\beta$  do proteossoma, inibindo desta forma sua ação de quimotripsina. No tratamento *in vitro*, em células de PC-3 (câncer de próstata), foi observado que, logo nas primeiras duas horas de tratamento com a vitaferina A, o proteossoma já era inibido, e após 24h as células se apresentavam com alterações morfológicas características de apoptose e ativação de caspase-3 (YANG *et al.*, 2007).

Os mecanismos propostos (inibição do citoesqueleto e do proteossoma) para ação da vitaferina A levam a efeitos semelhantes aos observados no presente trabalho para as vitafisalinas. Como foi observado, as vitafisalinas O e F causaram um acúmulo de células na fase G2/M do ciclo celular, o que talvez pudesse ser explicado pela inibição do proteossoma e conseqüente não dissociação do complexo ciclina B – cdk1, ou mesmo, por interferência nos elementos do citoesqueleto, o que acarretaria na parada do ciclo celular na mitose. A ativação de caspase-3 e alterações morfológicas características de apoptose pelas vitafisalinas também

foram evidenciadas nesse trabalho. Todos esses achados aliados à semelhança estrutural destes compostos, nos levam a sugerir que as vitafisalinas tenham alvos semelhantes a vitaferina A. Entretanto, essa hipótese necessita de outras comprovações experimentais.

Nem sempre os efeitos observados *in vitro* podem ser extrapolados para modelos *in vivo*, desta forma é necessário estudar o efeitos desses compostos em sistemas biológicos completos. Animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a compreensão da intricada patogênese do câncer em seres humanos. De fato, a maioria dos conceitos de tumorigênese atualmente aceitos é fortemente influenciada por modelos de desenvolvimento do câncer em camundongos, uma vez que esses organismos são modelos acessíveis e possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos nossos (KAMB, 2005).

Kupchan *et al.* (1969) reportou pela primeira vez a atividade antitumoral de vitanolídeos isolados da *A. arborescens*. Naquela ocasião a vitaferina A foi testada nos modelos tumorais de Walker e sarcoma 180, em ratos e camundongos, respectivamente. Numa dose de 20 mg/Kg, a vitaferina A inibiu em 62% o crescimento do tumor de ambos os modelos testados.

As fisalinas B e D, isoladas da *Physalis angulata*, outra planta da família Solanaceae, também mostraram possuir efeito antitumoral sobre células de sarcoma 180 *in vivo*, inibindo o crescimento do tumor em torno de 45%, em relação ao controle negativo (MAGALHÃES *et al.*, 2006b).

Assim como em Kupchan *et al.* (1969) e em Magalhães *et al.* (2006b), o modelo utilizado para avaliar o potencial antitumoral da vitafisalina F também foi o sarcoma 180, uma das linhagens celulares mais utilizadas na pesquisa de atividade antitumoral *in vivo* (LEE *et al.*, 2003). A vitafisalina F foi administrada nas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg/dia por via intraperitoneal e 20 mg/Kg/dia por via oral. Em todas as doses testadas a vitafisalina F foi capaz de inibir significativamente o crescimento tumoral, mas foi na dose de 20 mg/Kg/dia, tanto i.p. quanto v.o., que a inibição foi mais potente, chegando a inibir 77,5% e 76,4% do crescimento tumoral, respectivamente.

As análises histopatológicas dos órgãos removidos dos animais tratados sugerem que o fígado pode ser considerado como potencial alvo da toxicidade da vitafisalina F, já que foram observados degeneração de hepatócitos com fragmentação nuclear, esteatose e pontos focais de necrose. De qualquer modo, essas alterações hepáticas observadas nos animais tratados com a vitafisalina F podem ser consideradas como alterações sugestivas de toxicidade moderada e de caráter reversível (SCHEUER; LEFKOWITCH, 2000; KUMAR, 2004; MCGEE *et al.*, 1992). Até quando há necrose hepatocelular, mas o tecido conjuntivo

permanece preservado, a regeneração do fígado acontece quase que por completa (SCHEUER; LEFKOWITCH, 2000; KUMAR, 2004). Muitos achados em biópsias sugerem que os fármacos devem ser considerados como possíveis causadores de qualquer lesão hepática *in vivo*, e a remoção ou ajuste na dosagem destes fármacos normalmente leva a uma melhoria mais rápida e a uma diminuição destes efeitos tóxicos (SCHEUER; LEFKOWITCH, 2000).

De qualquer modo, os resultados *in vivo* comprovam o potencial anticâncer dos vitaesteróides, em que a vitafisalina F, juntamente com a vitaferina A, contribuem expressivamente para a atividade antitumoral dos extratos de *A. arborescens*, justificando a eficácia antitumoral desta espécie, conforme relatado na sabedoria popular. Vale a pena também ressaltar que é extremamente importante o fato da atividade antitumoral da vitafisalina F também ser observada após administração oral, já que este é o método mais comum de administração de fármacos, por ser mais segura, econômica e mais conveniente para os pacientes, o que pode representar um avanço significativo na sua qualidade de vida (GEBBIA; PUOZZO, 2005). De fato, o produto natural não necessariamente precisa ser o melhor composto para o uso na clínica. Esses compostos podem servir como protótipo para o desenvolvimento de outros fármacos que apresentem melhores características como: o aumento da atividade, a melhora das propriedades farmacocinéticas e principalmente o aumento da seletividade e conseqüentemente da redução dos efeitos adversos (ORTHOLAND *et al.*, 2004).

Desta forma, os dados obtidos neste trabalho tornam as vitafisalininas F, O, M e N compostos bastante promissores, onde estes resultados, tanto *in vitro* como *in vivo*, reforçam o potencial anticâncer destes compostos estudados. Entretanto as vitafisalininas parecem atuar por diferentes vias, inibindo a síntese de DNA, induzindo a ativação de caspases e acumulando células na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular, o que torna necessário a realização de estudos mais detalhados para elucidar o verdadeiro mecanismo de ação destes compostos.

# *Conclusão*

## 6 CONCLUSÃO

As vitafisalinas O, F, M, N e (17*S*,20*R*,22*R*)-5 $\beta$ ,6 $\beta$ :18,20-2-diepóxi-4 $\beta$ ,18-diidróxi-1-oxovita-3-24-enolido isoladas da planta *Acnistus arborescens* possuem potente atividade citotóxica, embora apresentem pouca seletividade para células tumorais. As vitafisalinas O e F foram os compostos mais ativos dentre os cinco estudados, e a presença de uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 na estrutura molecular destes compostos é que parece ser a responsável por essa maior atividade. Esses compostos causam um bloqueio na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular, levando à ativação das caspases pela via intrínseca de apoptose. Além disso, a redução de 77 % no crescimento tumoral *in vivo*, pela vitafisalina F, e a moderada toxicidade sistêmica, ressaltam o potencial antitumoral desses compostos.

## *Referências*

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **The history of cancer**. Disponível em: <[http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI\\_2\\_6x\\_the\\_history\\_of\\_cancer\\_72.asp?sitearea=&level=](http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_6x_the_history_of_cancer_72.asp?sitearea=&level=)>. Acesso em: 30 Jan. 2008.
- ABE, F.; NAGAFUJI, S.; OKAWA, M.; KINJO, J. Trypanocidal constituents in plants 6.1-Minor withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 54, n. 8, p. 1226-1228, 2006.
- AGARWAL, R.; DIWANAY, S.; PATKI, P.; PATWARDHAN, B. Studies on immunomodulatory activity of *Withania somnifera* (Ashwagandha) extracts in experimental immune inflammation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 67, p. 27-35, 1999.
- ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A. T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E.; TICE, R.; WATERS, M. D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutat. Res.**, v. 463, p. 111-172, 2000.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAAF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004.
- ALLEY, M. C.; DOMINIC, A. S.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. **Cancer Res.**, v. 48, p. 589-601, 1988.
- 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.
- ARCHANA, R.; NAMASIVAYAM, A. Antistressor effect of *Withania somnifera*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 64, n. 1, p. 91-93, 1999
- BALADRIN, M. F.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. **Human medicinal agents from plants**. Washington, DC: Am. Chem. Soc. Books, 1993. ((ACS Symposium Series, n. 534).
- BARATA, L.; MORS, W. B.; KIRSON, I.; LAVIE, D. A new withanolide from *Acnistus arborescens* (L.) Schlecht. (Solanaceae) from state of Guanabara, Brazil. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 42, p. 401-407, 1970.
- BARGAGNA-MOHAN, P.; HAMZA, A.; KIM, Y.E.; KHUAN, HO. Y.; MOR-VAKNIN, N.; WENDSCHLAG, N.; LIU, J.; EVANS, R.M.; MARKOVITZ, D.M.; ZHAN, C.G.; KIM, K.B.; MOHAN, R. The tumor inhibitor and antiangiogenic agent withaferin A targets the intermediate filament protein vimentin. **Chem. Biol.**, v. 14, p. 623-634, 2007.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

- BISHOP, J. M. The molecular genetics of cancer. **Science**, v. 235, p. 305-311, 1987.
- BOIK, J. **Natural compounds in cancer therapy**. Minnesota, USA: Oregon Medical Press, 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2008**: incidência de câncer no Brasil. Brasília, DF, 2007.
- BUDHIRAJA, R.D.; SUDHIR, S. Review of biological activity of withanolides. **J. Sci. Ind. Res.**, v. 46, p. 488-499, 1987.
- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.
- CAO, D. X.; QIAO, B.; GE, Z. Q.; YUAN, Y. J. Comparison of burst of reactive oxygen species and activation of caspase-3 in apoptosis of K562 and HL-60 cells induced by docetaxel. **Cancer Lett.**, v. 214, p. 103-113, 2004.
- CARDONA, D.; QUINONES, W.; TORRES, F.; ROBLEDO, S.; VELEZ, I. D.; CRUZ, V.; NOTARIO, R.; ECHEVERRI, F. Leishmanicidal activity of withajardins and acnistins. An experimental and computational study. **Tetrahedron**, v. 62, n. 29, p. 6822-6829, 2006.
- CHESNEL, F.; BAZILE, F.; PASCAL, A.; KUBIAK, J. Z. Cyclin B dissociation from CDK1 precedes its degradation upon MPF inactivation in mitotic extracts of *Xenopus laevis* embryos. **Cell Cycle**, v. 5, n. 15, p. 1687-1698, 2006.
- CHOUDHARY, M. I.; NAWAZ, S. A.; ZAHEER-UL-HAQ; LODHI, M. A.; GHAYUR, M. N.; JALIL, S.; RIAZ, N.; YOUSUF, S.; MALIK, A.; GILANI, A. H.; ATTA-UR-RAHMAN. Withanolides, a new class of natural cholinesterase inhibitors with calcium antagonistic properties. **Bioch. and Bioph. Res. Comm.**, v. 334, p. 276-287, 2005.
- CHOUDHARY, M. I.; YOUSUF, S.; SAMREEN; SHAH, S. A.; AHMED, S.; ATTA-UR-RAHMAN. Biotransformation of physalin H and leishmanicidal activity of its transformed products. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 54, n. 7, p. 927-930, 2006.
- COLLINS, I.; GARRETT, M. D; Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 5, p. 366-373, 2005.
- COLLINS, S. J.; GALLO, R. C.; GALLAGHER, R. E. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. **Nature**, v. 270, p. 347-349, 1977.
- COLLINS, S. J. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. **Blood**, v. 70, p. 1233-1244, 1987.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 72-79, 2005.

CORTESE, F.; BHATTACHARYYA, B.; WOLF, J. Podophyllotoxin as a probe for the colchicine binding site of tubulin. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 1134, 1977.

DAMU, A.G.; KUO, P.C.; SU, C.R.; KUO, T.H.; CHEN, T.H.; BASTOW, K.F.; LEE, K.H.; WU, T. S. Isolation, Structures, and Structure-Cytotoxic Activity Relationships of Withanolides and Physalins from *Physalis angulata*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 1146-1152, 2007.

DEVI, P.U.; SHARADA, A.C.; SOLOMON, F.E. In vivo growth inhibitory and radiosensitizing effects of withaferin A on mouse Ehrlich ascites carcinoma. **Cancer Lett.**, v. 95, n. ½, p. 189-193, 1995.

DEVI, P.U.; SHARADA, A.C.; SOLOMON, F.E.; KAMATH, M.S. In vivo growth inhibitory effect of *Withania somnifera* (Ashwagandha) on a transplantable mouse tumor, Sarcoma 180, **Indian J. Exp. Biol.**, v. 30, p. 169–172, 1992.

Di BACCO, A.; KEESHAN, K.; MCKENNA, S. L; COTTER, T. G. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia deregulation of cell growth and apoptosis. **Oncologist**, v. 5, p. 405-410, 2000.

DONG, Z.; SAIKUMAR, P.; WEINBERG, J.M.; VENTACHALAM, M. A. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasmamembrane damage during necrotic cell death. **Am. J. Pathol.**, v. 151, p. 1205–1213, 1997.

DONNNICI, C. L.; ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; PAZ, M. T. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Quím. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

FAHY, J.; DUFLOS, A.; RIBET, J.P.; JACQUESY, J.C.; BERRIER, C.; JOUANNETAUD, M.P.; ZUNINO, F. Vinca alkaloids in superacidic media: a method for creating a new family of antitumor derivatives. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 119, p. 8576, 1997.

FALSEY, R.R.; MARRON, M.T.; GUNATHERATH, G.M.; SHIRAHATTI, N.; MAHADEVAN, D.; GUNATILAKA, A.A.; WHITESELL, L. Actin microfilament aggregation induced by withaferin A is mediated by annexin II. **Nat. Chem. Biol.**, v. 2, p. 33-38, 2006.

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

GALLAGHER, R.; COLLINS, S.; TRUJILLO, J.; MCCREDIE, K. AHEARN, M.; TSAI, S.; METZGAR, R.; AULAKH, G.; TING, R.; RUSCETTI, F.; GALLO, R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 54, p. 713 - 733, 1979.

GEBBIA, V.; PUOZZO, C. Oral versus intravenous vinorelbine: clinical safety profile. **Exp. Op. Drug Saf.**, v. 4, n. 5, p. 915-928, 2005.

- GIBSON, G. G.; SKETT, P. Assay for glutathione-S-transferase activity. *In*: GIBSON, G.G., SKETT, P. (Ed.). **Introduction to drug metabolism**. Cheltenham, UK: Nelson Thornes, 2001. p. 47–49.
- GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. *In*: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Ed.). **Mutagênese ambiental**. Canoas, RS: Ulbra, 2003. p. 247-275.
- GORDALIZA, M.; CASTRO, M. A.; MIGUEL DEL CORRAL, J.M.; FELICIANO, A.S. Antitumor properties of podophyllotoxins and related compounds, **Curr. Pharm. Design.**, v. 6, p. 1811, 2000.
- GOTTLIEB, J. A.; GUARINO, A. M.; CALL, J. B.; OLIVERIO, V. T.; BLOCK, J. B. Preliminary pharmacological and clinical evaluation of camptothecin sodium. **Cancer Chemother. Rep.**, v. 54, p. 461-470, 1970.
- GRZANKA, A.; GRZANKA, D.; OORLIKOWSKA, M. Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines. **Biochem. Pharmacol.**, v. 66, p. 1611-1617, 2003.
- GUO, M.; HAY, B. A. Cell proliferation and apoptosis. **Curr. Opin.Cell Biol.**, v. 11, p. 745–752, 1999.
- HANAHAN, D.; WEINGERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.
- 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.
- HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2003.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770–776, 2000.
- HSIEH, P. W.; HUANG, Z. Y.; CHEN, J. H.; CHANG, F. R.; WU, C. C.; YANG, Y. L.; CHIANG, M. Y.; YEN, M. H.; CHEN, S. L.; YEN, H. F.; LÜBKEN, T.; HUNG, W. C.; WU, Y.C. Cytotoxic Withanolides from *Tubocapsicum anomalum*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 5, p. 747-753, 2007.
- HSIANG, Y. H.; HERTZBERG, R.; HECHT, S.; LIU, L. F. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 148-173, 1985.
- IMBERT, T. F. Discovery of podophyllotoxins. **Biochimie**, v. 80, p. 207, 1998.
- JANUÁRIO, A. H.; RODRIGUES FILHO, E.; PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, D. N.; SATO, D. N.; FRANÇA, S. C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Phytother. Res.**, v. 16, p. 445-448, 2002.

JAYAPRAKASAM, B.; NAIR, M. G. Cyclooxygenase-2 enzyme inhibitory withanolides from *Withania somnifera* leaves. **Tetrahedron**, v. 59, p. 841-849, 2003.

JAYAPRAKASAM, B.; ZHANG, Y.; SEERAM, N.P.; NAIR, M.G. Growth inhibition of human tumor cell lines by withanolides from *Withania somnifera* leaves. **Life Sci.**, v. 74, p.125-132, 2003.

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

KINGSBURY, W. D.; BOEHM, J. C.; JAKAS, D. R.; HOLDEN, K. G.; HECHT, S. M.; GALLAGHER, G.; CARANFA, M. J.; MCCABE, F. L.; FAUCETTE, L. F.; JOHNSON, R. K.; HERTZBERG, R. P. Synthesis of water-soluble (aminoalkyl) camptothecin analogs: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity. **J. Med. Chem.**, v. 34, p. 98, 1991.

KINGSTON, D. G. V. The shape of things to come: Structural and synthetic studies of taxol and related compounds. **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 1844-1854, 2007.

KRZAKOWSKI, M.; DOUILLARD, J.; RAMLAU, R.; JASSEM, J.; SZCZESNA, A.; ZATLOUKAL, P.; PAWEL, J.; HANSEN, O.; SUN, X. Phase III study of vinflunine versus docetaxel in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) previously treated with a platinum-containing regimen. **J. Clin. Oncol.**, v. 25, p. 7511, 2007.

KSEBATI, M. B.; SCHMITZ, F. J. Minabeolides: A Group of Withanolides from a Soft Coral, *Minabea* sp. **J. Org. Chem.**, v. 53, p. 3926-3929, 1988.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: Patologia: Bases patológicas da doença**. 7. ed. Amsterdam: Elsevier, 2005.

KUPCHAN, S. M.; DOSKOTCH, R. W.; BOLLINGER, P.; MCPHAH, A. T.; SIM, G. A.; SAENZ RENAULD, J. A. The isolation and structural elucidation of a novel steroidal tumor inhibitor from *Acnistus arborescens*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 87, p. 5805-5806, 1965.

KUPCHAN, S. M.; ANDERSON, W. K.; BOLLINGER, P.; DOSKOTCH, R. W.; SMITH, R. M.; SAENZ RENAULD J. A.; SCHNOES, H. K.; BURLINGAME, A. L.; SMITH, D. H. Tumor Inhibitors. XXXIX. Active principles of *Acnistus arborescens*. Isolation and structural and spectral studies of withaferin A and withacnistin. **J. Org. Chem.**, v. 34, p. 3858-3866, 1969.

KUROYANAGI, M.; SHIBATA, K.; UMEHARA, K. Cell Differentiation Inducing Steroids from *Withania somnifera* L. (DUN.) **Chem. Pharm. Bull.**, v. 47, p. 1646-1649, 1999.

LEE, Y. L.; KIM, H. J.; LEE, M. S.; KIM, J. M.; HAN, J. S.; HONG, E. K.; KWON, M. S.; LEE, M. J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Exp. Anim.**, v. 52, p. 371-375, 2003.

LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHardJO, I.; SRINIVASULA, S. M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E. S.; WANG, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 479-489, 1997.

- LIU, H. Y.; NI, W.; XIE, B. B.; ZHOU, L. Y.; HAO, X. J.; WANG, X.; CHEN, C. X. Five New Withanolides from *Tacca plantaginea*. **Chem. Pharmacol. Bull.**, v. 54, p. 992-995, 2006.
- LIU, W. M.; STIMSON, L. A.; JOEL, S. P. The in vitro activity of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in Bcr-Abl positive chronic myeloid leukemia cells: Synergistic interactions with antileukemic agents. **Br. J. Cancer.**, v. 86, p. 1472-1478, 2002.
- LUNDBERG, A. S.; WEINBERG, R. A. Control of cell cycle and apoptosis. **Eur. J. Cancer**, v. 35, n. 4, p. 531-539, 1999.
- MATSUOKA, K.; NOMURA, K.; HASHINO, T. Mutagenic Effects of Brief Exposure to Bromodeoxyuridine on Mouse FM3A Cells. **Cell Tissue Kinet.**, v. 5, p. 495-503, 1990.
- MCGAHON, A.J.; MARTIN, S.J.; BISSONNETTE, R.P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R.J. NISHIOKA, W.K.; GREEN, D.R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Meth. Cell Biol.**, v. 46, p. 153-185, 1995.
- McGEE, J.O.D.; ISAACSON, P.A.; WRIGHT, N.A. **Oxford Textbook of Pathology: pathology of systems**. New York: Oxford University Press, 1992.
- MAGALHÃES, H. I. F.; VERAS, M. L.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Preliminary investigation of structure-activity relationship of cytotoxic physalins. **Lett. In Drug Des. Dev.**, v. 3, p. 625-632, 2006a.
- MAGALHÃES, H. I. F.; VERAS, M. L.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, C. In-vitro and in-vivo antitumour activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. **J. Phar. Pharmacol.**, v. 58, n. 2, p. 235-241, 2006b.
- MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **Americ. J. Pathol.**, v. 146, p. 3-15, 1995.
- MARU, Y. Molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Int. J. Hematol.**, v. 73, p. 308-322, 2001.
- MEHMET, H. Apoptosis: caspase Wnds a new place to hide. **Nature**, v. 403, p. 29-30, 2002.
- MINGUZZI, S.; BARATA, L.E.S.; SHIN, Y.G.; JONAS, P.F.; CHAI, H.; PARK, E.J.; PEZUTO, J.M.; CORDELL, G.A. Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 635-641, 2002.
- MISICO, R. I.; SONG, L. L.; VELEIRO, A. S.; CIRIGLIANO, A. M.; TETTAMANZI, M. C.; BURTON, G.; BONETTO, G. M.; NICOTRA, V. E.; SILVA, G. L.; GIL, R. R.; OBERTI J. C.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M. Induction of quinone reductase by withanolides. **J. Nat. Prod.**, v. 65, n. 5, p. 677-680, 2002.

MOHAN, R.; HAMMERS, H. J.; BARGAGNA-MOHAN, P.; ZHAN, X. H. ; HERBSTTRITT, C. J.; RUIZ, A.; ZHANG, L.; HANSON, A. D.; CONNER, B. P.; ROUGAS, J.; PRIBLUDA, V. S. Withaferin A is a potent inhibitor of angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 7, n. 2, p. 115-122, 2004.

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

MUGGIA, F. M.; CREAVER, P. J.; JANSEN, H. H.; COHEN, M. N.; SELAWRY, D. S. Phase I Clinical Trial of Weekly and Daily Treatment with Camptothecin. Correlation with Clinical Studies. **Cancer Chemother. Rep.**, v. 56, p. 516-521, 1972.

NAGAFUJI, S.; OKABE, H.; AKAHANE, H.; ABE, F. Trypanocidal constituents in plants 4. Withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 2, p. 193-197, 2004.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **What is cancer?** Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>>. Acesso em: 30 Jan. 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 17, p. 215 – 234, 2000.

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

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as drug over the past 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NITTALA, S. S.; LAVIE, D. Withanolides of *Acnistus breviflorus*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 12, p. 2735-2739, 1981.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000

OPALKA, B.; DICKOPP, A.; KIRCH, H.C. Apoptotic genes in cancer therapy. **Cells Tissues Organs**, v. 172, p. 126-132, 2002.

ORTHOLAND, J.Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 8, p. 271 - 280, 2004.

RIAZ, N.; MALIK, A.; AZIZ-UR-REHMAN; NAWAZ, S. A.; MUHAMMAD, P.; CHOUDHARY, M. I. Cholinesterase-inhibiting withanolides from *Ajuga bracteosa*. **Chem. Biodivers.**, v. 1, n. 9, p. 1289-1295, 2004.

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

ROCHA, D.D.; MILITÃO, G.C.G.; VERAS, M.L.; PESSOA O.D.L.; SILVEIRA, E.R.; ALVES, A.P.N.N.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V. Selective cytotoxicity of withaphysalins in myeloid leukemia cell lines versus peripheral blood mononuclear cells. **Life Sci.**, v. 79, p. 1692–1701, 2006.

SAIKUMAR, P.; DONG, Z.; MIKHAILOV, V.; DENTON, M.; WEINBERG, J.M.; VENTACHALAM, M.A. Apoptosis: definition, mechanisms and relevance to disease. **Am. J. Med.**, v. 107, p. 489–506, 1999.

SAWADA, S.; OKAJIMA, S.; AIYAMA, R.; NOKATA, K.; FURUTA, T.; YOKOKURA, T.; SUGINO, E.; YAMAGUCHI, K.; MIYASAKA, T. Synthesis and antitumor activity of 20(s)-camptothecin derivatives: carbamate-linked, water-soluble derivatives of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 39, p. 1446, 1991.

SBOHAT, R.; GITTER, S.; ABRAHAM, A.; LAVIE, D. Antitumor activity of Withaferin A, **Cancer Chem.**, v. 51, p. 271–276, 1967.

SCHABEL, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacol. Ther.**, v. 1, p. 411-435, 1977.

SCHEUER, P.J.; LEFKOWITCH, J.H. Drugs and toxins. *In*: SCHEUER, P. J.; LEFKOWITCH, J. H. (Eds.). **Liver biopsy interpretation**. 6<sup>th</sup> ed. London: WB Saunders, 2000. p. 134 – 150.

SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by Taxol. **Nature**, v. 277, p. 665–667, 1979.

SENTHIL, V.; RAMADEVI, S.; VENKATAKRISHNAN, V.; GIRIDHARAN, P.; LAKSHMI, B.S.; VISHWAKARMA, R.A.; BALAKRISHNAN, A. Withanolide induces apoptosis in HL-60 leukemia cells via mitochondria mediated cytochrome c release and caspase activation. **Chem. Biolo. Inter.**, v. 167, p.19-30, 2007.

SETHI, P.N.; THIAGARAJAN, A.R.; SUBRAMANIAN, S.S. Studies on the anti-inflammatory and anti-arthritic activity of Withaferin A. **Indian J. Pharmacol.**, v. 2, p. 165, 1970.

SHANAZBANU; SHASHIDARA, S.; BABU, V. L. A.; DHANAPAL, R. Isolation of withaferin A from *Withania somnifera* Dun leaves and its antibacterial activity. **Asian J. Chem.**, v. 18, n. 2, p. 1243-1247, 2006.

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

SLUPIANEK, A.; SCHMUTTE, C.; TOMBLINE, G.; NIEBOROWSKASKORSKA, M.; HOSER, G.; NOWICKI, M.O.; PIERCE, A.J.; FIISHEL, R.; SKORSKI, T. Bcr/Abl regulates mammalian RecA homologs resulting in drug resistance. **Mol. Cell.**, v. 8, p. 795 - 806, 2000.

SOARES, M. B.; BELLINTANI, M. C.; RIBEIRO, I. M.; TOMASSINI, T. C.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 459, n. 1, p. 107-112, 2003.

SOARES, M. B.; BRUSTOLIM, D.; SANTOS, L. A.; BELLINTANI, M. C.; PAIVA, F. P.; RIBEIRO, Y. M.; TOMASSINI, T. C.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **Int. Immunopharmacol.**, v. 6, n. 3, p. 408-114, 2006.

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

STAHELIN, H.; VON WARTBURG, A. The chemical and biological route from podophyllotoxin to etoposide. **Cancer Res.**, v. 51, p. 5-15, 1991.

SU, B. N.; MISICO, R. I.; PARK, E. J.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Isolation and characterization of bioactive principles of the leaves and stems of *Physalis philadelphica*. **Tetrahedron**, v. 58, p. 3453-3466, 2002.

SU, B. N.; PARK, E.J.; NIKOLIC, D.; SANTARSIERO, B.D.; MESECAR, A.D.; VIGO, J.S.; GRAHAM, J.G.; CABIESES, F.; VAN BREEMEN, R.B.; FONG, H.H.S.; FAMSWORTH, N.R.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. Activity-guided isolation of novel norwithanolides from *Deprea subtriflora* with potential cancer chemopreventive activity. **J. Org. Chem.**, 68: 2350-2361, 2003.

TAKIMOTO, C.H. Anticancer drug development at the US National Cancer Institute. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 52, p. 29-33, 2003.

TISHER, C.C.; BRENNER, B.M. **Renal pathology**: with clinical and functional correlations. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1994.

ULUKAN, H.; SWAAN, P.W. Camptothecins. A review of their chemotherapeutic potential. **Drugs**, v. 62, p. 2039, 2002.

Van CRUCHTEN, S.; Van den BROECK, W. Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 31, p. 214-223, 2002.

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

VERAS, M.L.; BEZERRA, M.Z.B.; LEMOS, T.L.G.; UCHOA, D.E.; BRAZ-FILHO, R.; CHAI, H.; CORDELL, G.A.; PESSOA, O.D.L. Cytotoxic withaphysalins from leaves of *Acnistus arborescens*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 710-713, 2004b.

VIEIRA, N.C.; ESPÍNDOLA, L.S.; SANTANA, J.M.; VERAS, M.L.; PESSOA, O.D.; PINHEIRO, S.M.; DE ARAÚJO, R.M.; LIMA, M.A.; SILVEIRA, E.R. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, n. 4, p. 1676-1682, 2008.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T.; SIM, G. A. Plant Antitumor Agents. 1. The Isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca ocuminata*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 88, p. 3888, 1966.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and Taxol: Discovery to clinic-Thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. **Cancer Res.**, v. 55, p. 753-760, 1995.

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. T. Plant antitumor agents V.I. The isolation and structure of taxol, a novel antileukic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 93, p. 2325-2327, 1971.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The impact of cancer in your country. Disponível em: <<http://www.who.int/infobase/report.aspx?iso=BRA&rid=119&goButton=Go>>. Acesso em: 30 Jan. 2008.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251-306, 1980.

WUBE, A. A.; WENZIG, E. M.; GIBBONS, E.; ASRES, K.; BAUER, R.; BUCAR, F. Constituents of the stem bark of *Discopodium penninervium* and their LTB4 and COX-1 and -2 inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 69, p. 982-987, 2008.

YANG, H.; SHI, G.; DOU, Q. P. The tumor proteasome is a primary target for the natural anticancer compound Withaferin A isolated from "Indian winter cherry". **Mol. Pharmacol.**, v. 71, n. 2, p. 426-437, 2007.

YOKOTA, Y.; BARGAGNA-MOHAN, P.; RAVINDRANATH, P. P.; KIM, K. B.; MOHAN, R. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 16, p. 2603-2607, 2006.

ZAVALA, F.; GUERNARD, D.; POTIER, P. Interaction of vinblastine analogues with tubulin. **Experientia**, v. 34, p. 1497, 1978.