



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA

HEMERSON IURY FERREIRA MAGALHÃES

ATIVIDADE ANTITUMORAL (*IN VITRO* e *IN VIVO*) DAS FISALINAS ISOLADAS DE  
*PHYSALIS ANGULATA* LIN.

FORTALEZA

2005

HEMERSON IURY FERREIRA MAGALHÃES

ATIVIDADE ANTITUMORAL (*IN VITRO* E *IN VIVO*) DAS FISALINAS ISOLADAS DE  
*PHYSALIS ANGULATA* LIN.

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia do Ó Pessoa

FORTALEZA

2005

HEMERSON IURY FERREIRA MAGALHÃES

ATIVIDADE ANTITUMORAL (*IN VITRO* E *IN VIVO*) DAS FISALINAS ISOLADAS DE  
*PHYSALIS ANGULATA* LIN.

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

Aprovada em: 09/09/2005

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia do Ó Pessoa (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará-UFC

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Geanne Matos de Andrade Cunha  
Universidade Federal do Ceará-UFC

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leticia Veras Costa Lotufo  
Universidade Federal do Ceará-UFC

# *Deus*

*À minha mãe pelo exemplo de coragem.*

*Aos meus pais por estarem sempre ao meu lado.*

*À Dra. Cláudia do Ó Pessoa por toda ajuda e paciência.*

## *AS TRÊS ÁRVORES*

Havia no alto de uma montanha três árvores que sonhavam o que seriam depois de grandes. A primeira olhando as estrelas disse: Eu quero ser o baú mais precioso do mundo, cheio de tesouros. A segunda, olhando o riacho suspirou: Eu quero ser um navio grande para transportar reis e rainhas. A terceira, olhou o vale e disse: Quero ficar aqui no alto da montanha e crescer tanto que quando me olharem ao levantarem os olhos e pensem em Deus.

Muitos anos se passaram e, certo dia, três lenhadores cortaram as árvores que estavam ansiosas em ser transformadas naquilo que sonhavam. Mas os lenhadores não costumavam ouvir ou entender de sonhos... Que pena...!!!

A primeira árvore acabou sendo transformada em um cocho de animais coberto de feno. A segunda virou um simples barco de pesca, carregando pessoas e peixes todos os dias. A terceira foi cortada em grossas vigas e colocada de lado num depósito.

Então, desiludidas e tristes, as três perguntaram: Por que isso? Entretanto, numa bela noite, cheia de luz e estrelas, uma jovem mulher colocou seu bebê recém-nascido naquele cocho de animais e, de repente, a primeira árvore percebeu que continha o maior tesouro do mundo. A segunda árvore estava transportando um homem que acabou por dormir no barco em que se transformara. E quando a tempestade quase afundou o barco, o homem levantou-se e disse: Paz!

E num relance, a segunda árvore entendeu que estava transportando o rei do céu e da terra. Tempos mais tarde, numa sexta feira, a terceira árvore espantou-se quando suas vigas foram unidas em forma de cruz e um homem foi pregado nela. Logo sentiu-se horrível e cruel. Mas logo no domingo seguinte, o mundo vibrou de alegria. E a terceira árvore percebeu que nela havia sido pregado um homem para a salvação da humanidade, e que as pessoas sempre se lembrariam de Deus e de seu filho ao olharem para ela.

As árvores haviam tido sonhos e desejos, mas, sua realização foi mil vezes maior do que haviam imaginado.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, por ter-me concedido saúde e paz estando ao meu lado, mesmo nas “noites traiçoeiras” e em todos os momentos imprescindíveis nessa maravilhosa jornada que é a vida;
- Aos meus pais Maria da Paz e Raimundo Nonato Magalhães, os quais muito amo;
- À grande amiga e orientadora Dra. Cláudia do Ó Pessoa por ter-me aceitado e acreditado em meu trabalho desde o início sem nenhuma restrição, sempre indicando o melhor caminho a seguir;
- À amiga Dra. Leticia Veras Costa Lotufo pela paciência, pelo apoio científico, incentivo e pela amizade;
- À Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa pelos auxílios e colaborações desde a época da iniciação científica no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, sempre disposta a colaborar no desenvolvimento dos trabalhos executados;
- Ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica na pessoa dos Doutores Edilberto Rocha Silveira e Francisco de Queiroz Monte e demais pesquisadores, colaboradores importantes para muitos projetos desenvolvidos no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC;
- À Maria Leopoldina Veras pela amizade (desde os tempos de UECE) e grandioso trabalho através do isolamento das fisalinas testadas;
- Ao Dr. Manoel Odorico de Moraes pela contribuição à pesquisa no Laboratório de Oncologia Experimental;
- À Profa. Ana Paula Negreiros, pelos esclarecimentos sobre patologia e análise histopatológica;
- À Dra. Telma Leda Gomes de Lemos pela orientação e por ter-me concedido uma chance de ingressar na iniciação científica e pela amizade;
- À professora Tereza Carvalho do Departamento de Farmácia pelo incentivo e exemplo de dedicação;

- Ao amigo Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior, pelo companheirismo e atenção, auxiliando-me como um irmão;
- À Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela colaboração, sempre disposta a ajudar a todos os pós-graduandos;
- As amigas Alessandra de Paula Sousa (a coxinha) e Márcia Rocha que sempre esteve disposta a auxiliar-me em vários experimentos;
- Aos companheiros do LOE : pós-graduandos: André Viana, Bruno Coelho Cavalcanti, Diego Wilke, Gardênia Carmen, Ivana Nogueira Dantas (pelo auxílio nas traduções), Marne Vasconcelos (a estressada), Márcio Roberto, Patrícia Maçal, Patrícia Bonavides, Raquel Montenegro, Raimundo Pajon, Rômulo Feio, e pela ajuda todos os dias e pela amizade; alunos da graduação que participam das atividades do LOE: Ana Raquel, Andrew Sá, Carla Sombra, Elthon Góes, Érika Bastos, Fernanda Castro, Hidelbrando Filho, Juliana Régia, Marcelle Nogueira, Lícia Pachêco, Lidiane Arruda, Lorena Maria, Michele Libério (a tipo), Nailana Cordeiro, Ryuga Tigre, Sabrina Ramos, pela amizade;
- Aos pós-graduandos Daniel Pereira Bezerra (o grande doquinho), Paula Christine Jimenez, Paulo Michel Ferreira (o homem limão), pelo auxílio nas traduções;
- Aos amigos Pacífica Pinheiro, Adriano Cunha pela colaboração e por todo incentivo e a todos que compõem a Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC);
- Aos técnicos Silvana França, cuja dedicação é essencial para o laboratório, Fátima Teixeira e David Gonçalves pela ajuda constante;
- À minha tia Hilnar Ferreira por todo o apoio desde meus primeiros passos na jornada do conhecimento;
- Aos meus avós Maria das Dores e Walter Cabral (*in memoriam*) meus sobrinhos, Lucas Vinícius e Ley Júnior e minhas irmãs Helaine Iara e Hérica Iris pelo incentivo;
- À minha amiga e namorada Telma Alves por toda paciência e coragem;
- Às funcionárias do Departamento de Fisiologia e Farmacologia Aura Rhanes, Sílvia Azevedo, Rose Ferreira e Irismar Ferreira, que tentam resolver ou indicar o melhor caminho para os problemas do dia a dia;
- À FUNCAP pelo apoio concedido através da bolsa de pós-graduação;
- Às instituições: Instituto Claude Bernard, BNB, CNPq e FINEP pelo financiamento da pesquisa no laboratório de oncologia experimental.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 Os Produtos Naturais e o Câncer.....	01
1.2 O Gênero <i>Physalis</i> .....	05
1.2.1 <i>Physalis angulata</i> Lin. ....	07
1.2.2 Descrição botânica de <i>Physalis angulata</i> Lin. ....	09
1.2.3. Formação dos metabólitos secundários.....	10
1.2.4 Constituintes químicos isolados do gênero <i>Physalis</i> .....	11
1.2.5 As fisalinas.....	13
1.2.6 Alguns constituintes químicos isolados do gênero <i>Physalis</i> .....	14
1.2.7 Padrões de morte celular (Apoptose e Necrose) .....	16
1.2.8 O Ciclo Celular e o Câncer .....	20
Os reguladores do ciclo celular .....	20
A ciclina D .....	21
O gene p 53 .....	21
1.2.9 Proliferação celular x indicadores de proliferação .....	21
1.2.10 Sarcoma 180 e Oncologia Experimental.....	24
1.2.11 Justificativa do estudo .....	25
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos .....	26
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
3.1. Equipamentos .....	28
3.2 Soluções e Reagentes.....	29
3.2.1 Modelos biológicos experimentais .....	31
3.3 Principais constituintes químicos isolados da espécie <i>Physalis angulata</i> Lin .....	34
3.4 Métodos.....	38
3.4.1 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais <i>in vitro</i> .....	38
3.4.2 Avaliação da atividade antimitótica em ovos do ouriço-do-mar.....	40
3.4.3 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos <i>Mus musculus</i> Swiss.....	43
3.4.4 Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán.....	44

3.4.5 Coloração diferencial por brometo de etídio/laranja de acridina .....	45
3.4.6 Avaliação da atividade antitumoral ( <i>in vivo</i> ).....	46
3.4.6.1 Obtenção e manutenção dos animais .....	46
3.4.6.2 Avaliação do efeito das fisalinas B e D em camundongos transplantados com Sarcoma 180. ....	47
3.4.7 O marcador Ki-67 .....	48
3.4.7.1 Descrição da imunohistoquímica pelo Ki-67 .....	49
3.4.8 Análise morfológica e histopatológica .....	50
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
4.1 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais.....	52
4.2 Avaliação do potencial antimetabólico em ovos de ouriço do mar <i>Lytechinus variegatus</i> .....	57
4.3 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos <i>Mus musculus</i> Swiss .....	59
4.4 Viabilidade celular pelo método de exclusão da coloração azul de tripan .....	60
4.5 Avaliação do padrão de morte celular por apoptose ou necrose .....	63
4.6 Determinação da atividade antitumoral ( <i>in vivo</i> ).....	68
4.7 Avaliação da atividade proliferativa pelo método imunohistoquímico com Ki-67.....	71
4.8 Avaliação histopatológica de órgãos e tumor.....	72
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>89</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>90</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição geográfica no Brasil de <i>Physalis angulata</i> Lin.	08
Figura 2 -	<i>Physalis angulata</i> Lin.	09
Figura 3 -	Estrutura básica das fisalinas	13
Figura 4 -	Principais diferenças de apoptose e necrose. <b>(A)</b> ; Características da Necrose <b>(B)</b> ; Características da Apoptose <b>(C)</b> .	18
Figura 5 -	Expressão do Ki-67 e PCNA na progressão do ciclo celular	23
Figura 6 -	Fotomicrografias das primeiras fases do desenvolvimento embrionário do ouriço do mar – <i>Lytechinus variegatus</i> .	42
Figura 7 -	Ação das fisalina B e D (30 µg/mL) isoladas do extrato etanólico de <i>Physalis angulata</i> sobre o desenvolvimento de ovos do ouriço do mar <i>Lytechinus variegatus</i> .	59
Figura 8 -	Avaliação da viabilidade, pelo método de exclusão por azul de tripan, em células viáveis HL-60.	61
Figura 9 -	Avaliação da viabilidade, pelo método de exclusão por azul de tripan, em células não viáveis HL-60.	62
Figura 10 -	Efeito das fisalinas D (PA-1) e fisalina B (PA-2) sobre o padrão apoptótico em cultura de células da linhagem de leucemia promielocítica (HL-60).	64
Figura 11 -	Efeito das fisalinas F (PA-3) e diidrofisalina B (PA-4) sobre o padrão apoptótico em cultura de células da linhagem de leucemia promielocítica (HL-60).	65
Figura 12 -	Efeito das fisalinas B (PA-2) 5,10 e 15 µg/mL (9,7, 19,6 e 29,4 µM); fisalina D (PA-1) 5,10 e 15 µg/mL (9,2, 18,4 e 27,5 µM), doxorubicina 0.3 µg/mL (5,5 µM) sobre o padrão apoptótico em cultura de células da linhagem linfocítica HL-60.	66
Figura 13 -	Efeito das fisalinas F (PA-3) 5,10 e 15 µg/mL (9,5, 19 e 28,5 µM); 5-α-etóxi-6-β-hidróxi-5,6-diidrofisalina B (PA-4) 5,10 e 15 µg/mL (8.7, 17,5 e 26,2 µM), doxorubicina 0.3 µg/mL (5,5 µM) sobre o padrão apoptótico em cultura de células da linhagem linfocítica HL-60.	67
Figura 14 -	Determinação do volume tumoral nos animais inoculados com o tumor Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento com 5-fluorouracil (25 mg/kg), fisalina B (10 e 25 mg/kg) e fisalina D (10 e 25mg/kg).	70
Figura 15 -	Detecção do anticorpo Ki-67 sobre as células tumorais de Sarcoma 180 expostos ao 5-FU, fisalina B e fisalina D (25 mg/kg/dia) durante 7 dias de tratamento.	72
Figura 16 -	Histopatologia dos fígados dos camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. (A) Grupo controle; (B) Grupo tratado com 5-FU (25 mg/kg); (C) Grupo tratado com fisalina B (25 mg/kg); (D) Grupo tratado com fisalina D (25 mg/kg).	75
Figura 17 -	Histopatologia de células tumorais de Sarcoma 180 removidas no 10º dia após tratamento com 5-FU (25 mg/kg/dia), fisalina B (25 mg/kg/dia) e fisalina D (25 mg/kg/dia).	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Espécies do gênero <i>Physalis</i> com uso farmacológico.	06
Tabela 2 -	Principais constituintes químicos encontrados na família Solanaceae.	12
Tabela 3 -	Diferenças básicas entre apoptose e necrose	19
Tabela 4 -	Constituintes químicos isolados da <i>Physalis angulata</i> Lin.	36
Tabela 5 -	Linhagens tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	38
Tabela 6 -	Determinação das $CI_{50}$ dos diferentes extratos e frações da <i>Physalis angulata</i> L. em diferentes linhagens de células tumorais humana, obtidos por regressão não-linear.	54
Tabela 7 -	Atividade citotóxica das fisalinas B, D e F nas linhagens de células tumorais humana. A Doxorubicina foi usada como controle positivo.	55
Tabela 8 -	Atividade citotóxica das fisalinas Diidrofisalina B, fisalina E e Diidrofisalina B (Hidrogenada) nas linhagens de células tumorais humana. A doxorubicina foi usada como controle positivo.	56
Tabela 9 -	Atividade antimetabólica das fisalinas B (PA-2) , D (PA-1), F (PA-3), diidrofisalina B (PA-4), fisalina E (PA-5) e diidrofisalina B (PA-4 H <sub>2</sub> - Hidrogenada) na concentração de 100 µg/mL sobre o desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço do mar <i>Lytechinus variegatus</i> , nas fases de 1 <sup>a</sup> divisão, 3 <sup>a</sup> divisão e blástula mostrando suas $CI_{50}$ com seus respectivos IC de 95% obtidos por regressão não-linear.	58
Tabela 10 -	Determinação dos pesos dos órgãos (fígado, rins e baço) e do percentual de inibição tumoral dos animais tratados com o 5-Fluorouracil (25 mg/Kg) e com as fisalinas: PA-1 (10 e 25 mg/Kg) e PA-2 (10 e 25 mg/Kg), durante 7 dias consecutivos (n = 8). ( <sup>a</sup> representa $p < 0,05$ ).	60

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – A formação de alguns metabólitos secundários em plantas	10
Fluxograma 2 – Possíveis rotas biossintéticas para a formação das fisalinas pelas Solanaceae	15
Fluxograma 3 – Isolamento dos constituintes químicos da <i>Physalis angulata</i> Lin.	34

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
&	E
$\chi^2$	Teste do qui-quadrado
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
[ ]	Concentração
<	Menor que
>	Maior que
AcOEt	Acetato de etila
ANOVA	Analysis of Variance (Análise de variância)
BrdU	Bromodeoxiuridina
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono (gás carbônico)
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
EHPA	Extrato hexânico da <i>P. angulata</i> L.
EEPA-H	Extrato etanólico da <i>P. angulata</i> L. – fração hexânica
EEPA-D	Extrato etanólico da <i>P. angulata</i> L. – fração diclorometano
EEPA-AE	Extrato etanólico da <i>P. angulata</i> L. – fração acetato de etila
EEPA-M	Extrato etanólico da <i>P. angulata</i> L. – fração metanólica
EEPA-Dp	Extrato etanólico da <i>P. angulata</i> L. – precipitado da fração diclorometano.
EEPA	Extrato etanólico da <i>P. angulata</i> L.
CCD	Cromatografia em camada delgada
EtOH	Álcool etílico
g	Gramas
h	Hora
H/E	Hematoxilina/Eosina
H <sub>2</sub> O	Água destilada

IC	Intervalo de confiança
INC	Instituto Nacional do Câncer
L	Litro
M	Molar
MeOH	Álcool metílico
mg	Miligrama
min	Minuto
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromido
nM	Nanomolar
n <sup>o</sup>	Número
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNM	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
TBS	Tris buffer solution (Tampão tris)
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
x	Vezes
5-FU	5-Fluorouracil
PA-1	Fisalina D
PA-2	Fisalina B
PA-3	Fisalina F
PA-4	5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B
PA-4H <sub>2</sub>	5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetrahidrofisalina B
PA-5	Fisalina E
Ki-67	Anticorpo de marcação de proliferação tumoral

## RESUMO

MAGALHÃES, H. I. F. **Potencial antitumoral (*in vitro* e *in vivo*) das physalinas B e D isoladas de *Physalis angulata* Lin.** 2005. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

*Physalis angulata* L. (Solanaceae) é uma planta considerada daninha conhecida popularmente como Camapu, dispersa em vários estados do Brasil e em vários continentes. O presente trabalho relata o estudo fitoquímico dos extratos: clorofórmico e acetato de etila, oriundos do extrato etanólico das partes aéreas de *Physalis angulata* L. A cromatografia em sílica gel resultou na separação de cinco vitaesteróides (fisalinas D, B, F, 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B, E, e uma fisalina semi-sintética denominada de 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetrahidrofisalina B). As cinco fisalinas foram avaliadas quanto ao potencial citotóxico em 9 linhagens de células tumorais (CEM, HL-60, PC-3, HCT-8, MDA-MB-231, MDA-MB 435, K-562, MCF-7, B-16), sobre o desenvolvimento de embriões de ouriço do mar e quanto à sua capacidade hemolítica. A atividade antitumoral *in vivo* para as fisalinas B e D foi avaliada em camundongos inoculados com o tumor sarcoma 180. As fisalinas apresentaram uma promissora atividade citotóxica, sendo que a fisalina D foi a mais ativa sobre as células tumorais com uma  $CI_{50} < 3,0$   $\mu\text{g/mL}$ . As fisalinas D, B, F, 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B, inibiram o desenvolvimento embrionário em uma concentração  $< 30$   $\mu\text{g/mL}$ , entretanto, na 1<sup>a</sup>. divisão e na blástula, a fisalina D (PA-1), novamente foi a mais ativa, com  $CI_{50} = 4.786$  e  $5.498$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Na 3<sup>a</sup> divisão, a fisalina B (PA-2) mostrou uma  $CI_{50}$  de  $5.308$   $\mu\text{g/mL}$ . Nenhuma fisalina apresentou atividade hemolítica na máxima concentração testada ( $200$   $\mu\text{g/mL}$ ). O estudo dos efeitos das frações sobre a viabilidade (exclusão por azul de tripan), e indução de morte (coloração por BE/LA) nas células HL-60 demonstrou que principalmente a fisalina B e D ( $10$   $\mu\text{g/mL}$ ) foram as mais fortes indutoras do fenômeno apoptótico. Porém, fisalina D ( $15$   $\mu\text{g/mL}$ ) apresentou elevado perfil na indução de necrose celular. As fisalinas D e fisalina B nas doses de  $10$  e  $25$   $\text{mg/Kg}$  apresentaram potencial de inibição do crescimento tumoral correspondente a  $45\%$  em ambas as doses para a fisalina D e de  $44$  e  $52\%$ , respectivamente para a fisalina B. Esta atividade antitumoral *in vivo* foi relacionada à inibição da taxa de proliferação do tumor, como observado pela marcação através do anticorpo Ki-67. A análise de histopatológica de rim e fígado mostrou que ambos os órgãos foram moderadamente afetados após o tratamento com as fisalinas, mas de uma maneira reversível.

Palavras chave: Physalis-efeitos adversos. Physalis-toxicidade. Physalis-quimica. Ensaio de Seleção de Medicamentos Antitumorais.

## ABSTRACT

MAGALHÃES, H. I. F. M. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of physalins B and D isolated from *physalis angulata* Lin. 2005. 117 f. (Master's Dissertation) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

The present study describes the phytochemical analysis of the chloroform and ethyl acetate partitions obtained from the ethanol extract of *Physalis angulata* L. (Solanaceae). The sílica gel chromatography resulted on the separation of 5 whytaesteroids (physalina D, B, F, 5- $\alpha$ -etoxi-6- $\beta$ -hidroxi-5,6-dihidrophysalin B, E and a semi-synthetic physalin named as 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetrahidrophysalin B). The physalins were evaluated for their cytotoxic potentials on 9 tumor cell lines (CEM, HL-60, PC-3, HCT-8, MDA-MB-231, MDA-MB 435, K-562, MCF-7, B-16), on the embryogenesis of sea-urchin eggs and for its lytic capacity in erythrocytes. Antitumoral activity *in vivo* was observed on a mouse model inoculated with Sarcoma 180. The physalins showed a promising cytotoxic effect, being physalin D the most active on the cell lines ( $IC_{50} < 3,0 \mu\text{g/mL}$ ). The physalins D, B, F, 5- $\alpha$ -etoxi-6- $\beta$ -hidroxi-5, 6-dihidrophysalin B inhibited the progression of the sea-urchin embryo's cell cycle within a concentration under  $30 \mu\text{g/mL}$ . On the 1<sup>st</sup> cleavage and blastulae stages, physalin D showed to be the most active, with the respective  $IC_{50}$  of 4.786 and 5.498  $\mu\text{g/mL}$ . On 3<sup>rd</sup> cleavage, physalin B presented an  $IC_{50}$  of 5.308  $\mu\text{g/mL}$ . None of the physalins showed any sings of lytic activity in concentrations as high as 200  $\mu\text{g/mL}$ . The study about the physalins effects upon cell viability (trypan blue daye) and death mechanisms on HL-60 cells (EB/AO staining) suggests that physalins B and D were the strongest inducers of apoptosis. Physalin D also induced cellular necrosis on a rather intense level. Physalin B, on doses of 10 and 25 mg/Kg, inhibited tumor growth on 44 e 52%, respectively, while physalin D inhibited tumor growth on 45% in both treatments. The antitumor activity *in vivo* was related to the lowest proliferation rate, as evaluated by the Ki-67 antibody marker. The histopathological analysis of kidney and liver suggests that those organs are affected, in a reversible manner, on mice treated with physalins.

Keywords: *Physalis angulata* L. Whitaesteroids. Physalins. Antitumor.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Os produtos naturais e o câncer

A Utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto à civilização humana e, por um longo período, minerais, vegetais e animais constituíam as principais fontes de drogas utilizadas no tratamento de diversas enfermidades, há pelo menos mil anos antes de Cristo, Erbes já citava em seus papiros, o uso de plantas para o tratamento do Câncer (KINGSTON, 1996). Inúmeras plantas possuem um papel vital na prevenção e no alívio sintomático de doenças. A origem de tal prática remonta ao surgimento da civilização humana e é anterior aos registros escritos, com evidências documentais de que nas antigas civilizações Egípcia e Mesopotâmica, bem como, Indiana e Chinesa; preparados de plantas já eram utilizados como curativos há pelo menos 5.000 anos. Milênios depois o uso de produtos naturais passou a ser compilado em respeitáveis farmacopéias, desde pelo menos, 2.000 anos a.C. (KINGSTON, 1996).

O advento da Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica, resultaram no uso de produtos sintéticos com atividade farmacológica. A razão para isso foi que compostos puros foram facilmente obtidos e modificações estruturais permitiram a produção de drogas cada vez mais potentes e seguras, com a rápida ascensão econômica das companhias farmacêuticas. Além disso, durante todo o desenvolvimento da cultura humana, o uso de produtos naturais tinha um significado mágico-religioso e cada cultura detinha diferentes pontos de vista em relação aos conceitos de saúde e doença. Obviamente, essa abordagem contrariava o novo modo de vida das sociedades ocidentais industrializadas, onde as drogas oriundas de fonte naturais eram consideradas como uma opção de tratamento tanto para pessoas de baixa renda e pouca educação, assim como, eram consideradas superstições religiosas sem valor farmacológico (RATES, 2001). As plantas gradualmente, vêm sendo reconhecidas por sua extraordinária habilidade em produzir vários metabólitos secundários (LUCKNER, 1990; CRAGG et al., 1999; MANN, 2002). Metabólitos secundários são biosintetizados pelas plantas por diferentes razões, que incluem a regulação do crescimento vegetal, interações inter e intra-específicas, infecções e defesa contra predadores, etc. Muito desses metabólitos têm mostrado atividades biológicas e farmacológicas interessantes e são usados como agentes quimio-terapêuticos e/ou servem como ponto de partida no

desenvolvimento dos fármacos (VERPOORTE, 1998). Além disso, servir de modelos para novos compostos, através do desenho e planejamento racional de novas drogas, atuando no desenvolvimento da síntese biomimética e na descoberta de novas propriedades terapêuticas não atribuídas aos compostos conhecidos (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991; MANN, 2002).

Dessa forma, a fitoquímica deixou de ser o alvo e foram necessários estudos mais abrangentes sobre a função, alvo molecular, regulação e a natureza desses produtos naturais. A biossíntese, reconhecida de muitas classes, foi o elo de transição para o entendimento de novos processos moleculares, levando a uma corrida vertiginosa por novos protótipos de fármacos, gerando as já conhecidas “fábricas de descoberta de produtos bioativos”, onde centenas de extratos poderiam ser testados em um dia. Nesse propósito, diversos grupos de pesquisas têm feito uso de diversos programas de *screening* de extratos de plantas para poder detectar metabólitos secundários com atividades biológicas relevantes (HOSTETTMANN, 1991).

A revisão publicada no *Natural Products in Drug Discovery and Development* (CRAGG et al., 1997), é possível avaliar o inestimável valor que os produtos naturais exercem no tratamento de várias doenças, especialmente no câncer e nas doenças infecciosas. Assim, é indiscutível a importância dos vegetais como fonte para a descoberta de novas drogas, colaborando para um dos mais antigos sonhos da humanidade, o do controle e combate de doenças e epidemias. Historicamente, a quantidade de medicamentos a base de produtos naturais tem aumentado a cada ano, principalmente no tocante aos princípios ativos presente em prescrições médicas. Um estudo realizado nos Estados Unidos mostrou que nas receitas dispensadas entre 1959 à 1980, um percentual de 25% das prescrições apresentavam princípios ativos oriundos de plantas medicinais encontradas em 90 espécies importantes em um ou mais países (CRAGG; NEWMAN, 1999).

No início da década de 90, o faturamento com medicamentos produzidos a base de plantas, foi de cerca de US\$ 15,5 bilhões de dólares (PEZZUTO, 1997). Já em 1999, das vinte drogas mais vendidas, nove eram desenvolvidas ou derivadas a partir dos produtos naturais, e o total anual de vendas foi superior a 16 bilhões de dólares (HARVEY, 2000).

A importância do câncer na área de saúde pública vem aumentando à medida que ocorre o controle progressivo de outras doenças. Estudos realizados por PARKIN et al. (2001), estimaram, para o ano de 2000, 5,3 milhões de novos casos em homens e 4,7 milhões em mulheres. A incidência mundial tem atingido mais de 10 milhões de novos casos de câncer no mundo, dentre os quais, 53% dos casos tem ocorrido nos países em desenvolvimento (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2004). No Brasil, estima-se que em 2005 surgirão mais 467.440 novos casos (BRASIL, 2005).

Porém, considerando-se grupos específicos, notadamente mulheres com idade entre 35 e 74 anos, o câncer surge como a doença responsável pelo maior índice de mortalidade. Segundo estatísticas apresentadas pela *American Cancer Society*, verificou-se que surgiram 1,3 milhões de casos de câncer em 1997, o que correspondeu a uma morte por minuto devido ao desenvolvimento de tumores malignos.

A importância crescente das neoplasias malignas no quadro sanitário do Brasil tem ampliado a discussão sobre o controle desse grupo de doenças, incluindo-as como uma das prioridades do setor de saúde. Apesar de ainda existirem áreas obscuras na compreensão da etiologia do câncer, hoje, já se tem conhecimentos suficientes para afirmar que a quimioterapia utilizada no tratamento do câncer é primordialmente oriunda de recursos naturais (PINKEL, 2000; DREWS, 2000).

Ao lado da radioterapia, a quimioterapia ainda continua sendo a principal forma de tratamento de tumores malignos. A importância da identificação de novos princípios ativos que inibam a proliferação celular torna-se evidente diante da perspectiva de sua aplicação terapêutica. O atual interesse na busca de novos agentes antimitóticos, por exemplo, é consequência de sua importância para o tratamento de diferentes formas de tumores malignos. Além dos esforços contínuos do US-NCI (United States National Cancer Institute - Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos) ao longo de quase quarenta anos buscando novos agentes antitumorais de origem natural (SUFFNESS; DOUROS, 1982; CRAGG; NEWMAN, 1999). Revisões recentes listam mais de 20 quimiotipos (substâncias de origem natural com específica origem biogenética) distintos, que apresentam seletiva atividade antimitótica. Podemos citar, entre outros, terpenos (taxol e derivados), alcalóides (rizoxina, vincristina, vinblastina e derivados), peptídeos (criptoficinas e dolastatinas), lignanas

(podofilotoxinas), policetídeo (discodermolida), bem como substâncias de origem biogenética mista (curacinas e epotilonas) (HAMELL, 1996).

Atualmente, há uma grande tendência do mercado internacional em substituir os produtos de origem sintética por outros de origem natural, principalmente no que se refere aos medicamentos e cosméticos. Esse fato tem estimulado freqüentemente os casos de biopirataria praticados na Região Norte do país, levando a uma exploração e comercialização ilegal de plantas e de material genético na Amazônia. Pois, historicamente a bioprospecção está inserida no conflito entre os países ricos, porém pobres em biodiversidade, do Hemisfério Norte, que buscam explorar a rica biodiversidade dos países pobres do Hemisfério Sul, principalmente os países tropicais. Contudo, tendo conhecimento que a composição total da biodiversidade brasileira não é conhecida e talvez nunca venha a ser, tal a sua magnitude e complexidade, e que o território nacional na plataforma continental e nas águas jurisdicionais brasileiras apresentam inúmeras espécies, tanto terrestres como marinhas, ainda não identificadas no Brasil, podendo alcançar valores da ordem de dezenas de milhões, se pode inferir sem medo, o quão relevante é conhecer as propriedades terapêuticas da nossa biodiversidade (SANT'ANA, 2002). Deste modo, com o desenvolvimento da biotecnologia foi possível observar a importância da diversidade da vida para o desenvolvimento dos mais variados produtos, principalmente os farmacológicos.

Estima-se que o número total de espécies vegetais seja de 250.000 a 500.000, dos quais apenas 5-15% foram estudados quanto à química e farmacologia de seus constituintes (RATES, 2001; MONKS et al., 2002). Sendo assim, há um vasto potencial para descoberta de novas drogas oriundas de fontes naturais. A seleção das espécies para estudos fitoquímicos e farmacológicos que podem levar a descoberta de potenciais agentes terapêuticos deve partir de dados etnofarmacológicos ou quimiosistemáticos. (MANS et al., 2000).

Plantas da família Solanaceae têm sido usadas como medicamentos desde a antigüidade como: *Mandragora officinarum* e *Atropa belladonna*. Espécies do gênero *Physalis* (Solanaceae), têm sido amplamente utilizadas na medicina popular devido as suas propriedades anticancer, antileucêmicas, Chiang et al. (1992a, 1992b), imunomodulatórias, Lin et al. (1992), dermatite e reumatismo, Pietro et al. (2000); Ismail e Alam (2001),

antipiréticas, antimicrobiana, Lorenzi et al. (2002), antiinflamatória, Soares et al. (2003), para o tratamento de malária, asma e hepatite, Wu et al. (2004).

## 1.2 O Gênero *Physalis*

O taxon *Physalis* abrange cerca de cento e vinte (120) espécies com caracteres principalmente herbáceos, que se distribuem pelas zonas temperadas do globo terrestre, especialmente nas Américas Central e do Sul, cujos principais centros de diversidade taxonômica encontram-se nos Estados Unidos e México (HAWKES et al., 1991; TOMASSINI et al., 2000).

O nome *Physalis* origina-se do grego onde “physa” significa bolha ou bexiga, referindo-se ao cálice que envolve os frutos, principal característica das plantas que compõem este taxon (HAWKES et al., 1991).

O gênero é constituído por diversas plantas de reputado valor etnofarmacológico, as quais são utilizadas para diversas finalidades e em vários sistemas de medicina tradicional do mundo. Dada à importância medicinal, algumas espécies de *Physalis* têm sido domesticadas, como por exemplo: *P. philadelphica*, *P. peruviana* e *P. pubescens*. Na Tabela 1, encontram-se listadas algumas espécies de *Physalis* e seus respectivos usos em medicina popular (HAWKES et al., 1991).

**Tabela 1** - Espécies do gênero *Physalis* com uso farmacológico

<i>Espécies</i>	<i>Emprego etnofarmacológico</i>	<i>Referências</i>
<i>P. angulata</i>	No tratamento de diabetes, malária, hepatite, doenças de pele e reumatismo. É utilizada ainda como diurético, antiinflamatório, desinfetante, sedativo, antifebril e antivômito.	LORENZI, 2002. WU et al., 2004 TOMASSINI et al., 2000.
<i>P. alkekengi</i>	Expectorante, antitussígeno, diurético e anti-tumoral.	BASEY et al., 1992.
<i>P. chenopodifolia</i>	Contra infecções gástricas e respiratórias, febres e diabetes.	MALDONADO et al., 2004.
<i>P. minima</i>	Recomendada como diurético, tônico e purgativo e no tratamento de inflamações da pele.	SINHÁ et al., 1987.
<i>P. philadelphica</i>	No tratamento de distúrbios gastrintestinais, lepra, purificação do sangue e como um antídoto contra veneno.	SU et al., 2002.
<i>P. pubescens</i>	No tratamento de diabetes, malária, hepatite, doenças de pele e reumatismo. É utilizada ainda como diurético, antiinflamatório, desinfetante, sedativo, antifebril e antivômito.	LORENZI, 2002.
<i>P. peruviana</i>	Indicada no tratamento de câncer, leucemia, malária, asma, hepatite, dermatites, reumatismo e como um agente antimicrobiano, diurético e antipirético.	WU et al., 2004.

### 1.2.1 *Physalis angulata* Lin.

*Physalis angulata* Lin. (sinonímia: *Physalis dubia* Link, *Physalis linkiana* Nees., *Physalis ciliata* Sieb. et Zucc.) é popularmente conhecida como camapum, palavra de origem tupi que significa “estalo do peito” em virtude do som reproduzido quando estalado contra o peito. Por ser uma planta amplamente dispersa em vários estados do Brasil, também é conhecida por outras denominações como bucho-de-rã, joa-de-capote, camapú, camambu, camaru, mata-fome, bate-testa, joá, juá-poca, balão-rajado e balão (LORENZI, 2002).

É uma planta anual e herbácea, cuja reprodução se dá por sementes. Nativa de quase todo o Brasil cresce espontaneamente formando pequenas populações. É considerada planta daninha, capaz de infestar lavouras agrícolas, pomares e terrenos baldios. Suas sementes apresentam grande poder germinativo e seus espécimes habitam preferencialmente solos semi-úmidos e sombreados. Seus frutos de sabor doce ou insípido são comestíveis, sendo apreciados tanto pelo homem, especialmente aqueles que habitam as zonas rurais, como por animais em geral (BRAGA, 1976; LORENZI, 2002).

*P. angulata* Lin. é, sem dúvida, a mais representativa das espécies do gênero *Physalis*, considerando seu valor medicinal. Integra o elenco de plantas curativas de diversos sistemas de medicina tradicional de varias partes do planeta, inclusive do Brasil, cujas propriedades medicinais são amplamente difundidas, especialmente no Nordeste do Brasil e Amazônia. Seu uso como medicinal remonta a antigas épocas, quando os índios já lançavam mão da infusão de suas folhas com fins diuréticos. O chá da planta é recomendado na forma de banho para o tratamento de reumatismo e males do fígado. Seus frutos são utilizados como desobstruentes e diuréticos. As folhas são aplicadas contra inflamações da bexiga, do baço e contra icterícia. Sendo ainda empregadas no tratamento de malária e hepatite. O suco é considerado calmante e depurativo, sendo empregado contra reumatismo e dores do ouvido. Algumas tribos indígenas Colombianas consideram as folhas e frutos com propriedades narcóticas, e em uso externo, o decocto destas partes é utilizado como antiinflamatório e desinfetante para doenças de pele em geral. No sistema de medicina tradicional do Peru, as raízes deixadas em repouso no rum são empregadas no tratamento de diabetes (LORENZI, 2002).



**Figura 1** - Distribuição geográfica no Brasil de *Physalis angulata* Lin.

### 1.2.2 Descrição botânica de *Physalis angulata* Lin.

Planta herbácea, glabra, ramosíssima, de caules angulosos. Folhas pecioladas, ovado-oblongas, irregularmente serrado-denteadas. Flores solitárias, pequenas, amarelas, sem mácula, com anteras azuladas ou violáceas. Baga globosa, amarelo-esverdeada, envolvida completamente pelo cálice, que é ovóide, 4-anguloso, papiráceo, pendente, lembrando pequena lanterna. Frutos doces ou insípidos, comestíveis (Figura 2).

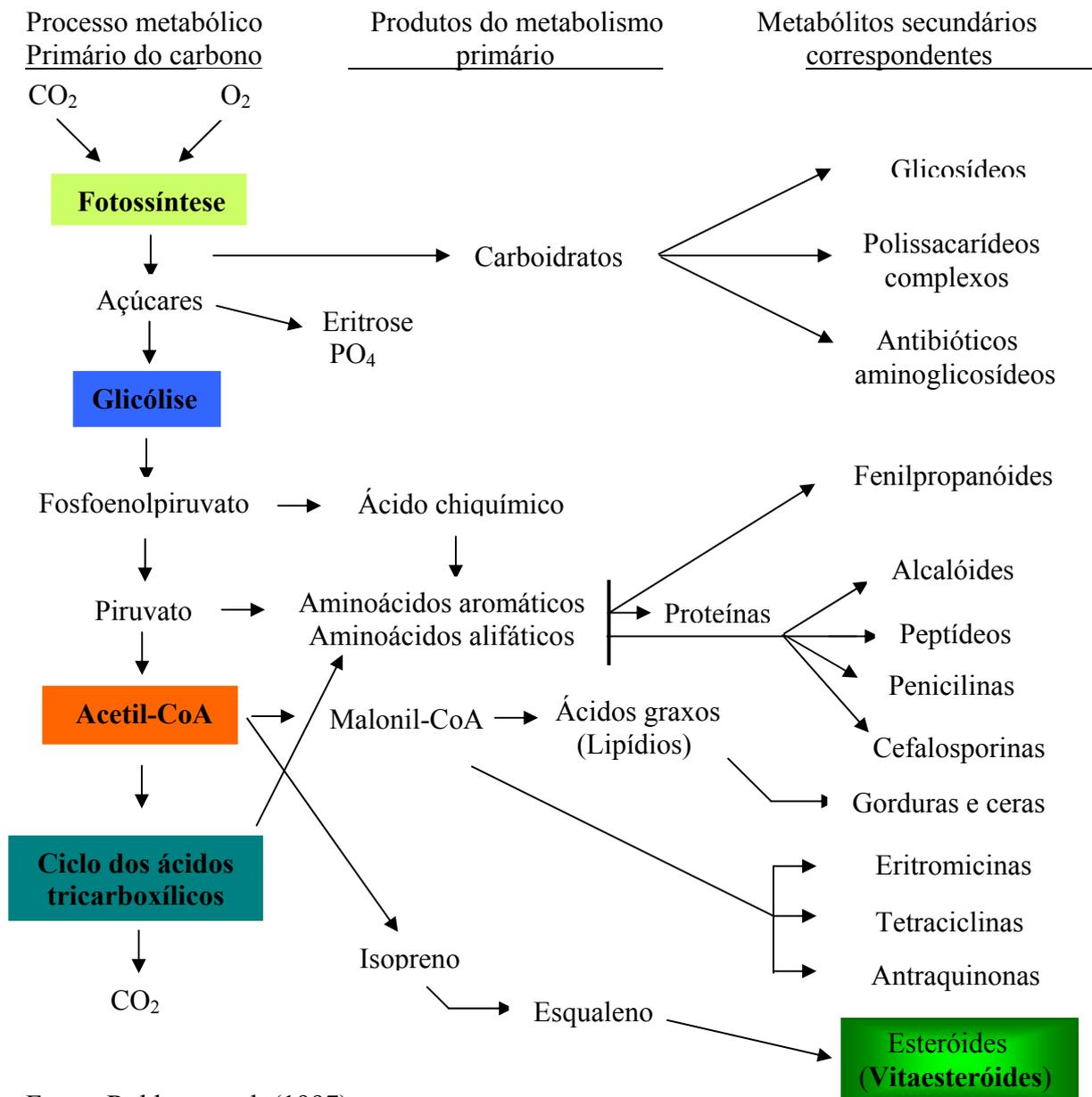


**Figura 2** - *Physalis angulata* Lin.

### 1.2.3 Formação dos metabólitos secundários

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. O metabolismo nada mais é do que o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. No caso dos vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário (Fluxograma 1).

**Fluxograma 1** - A formação de alguns metabólitos secundários em plantas.



Fonte: Robbers et al. (1997)

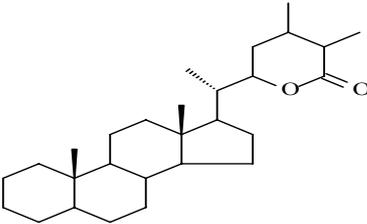
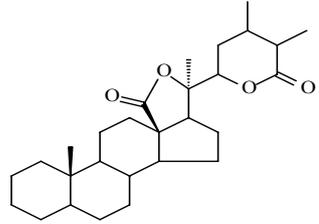
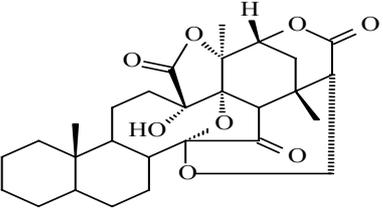
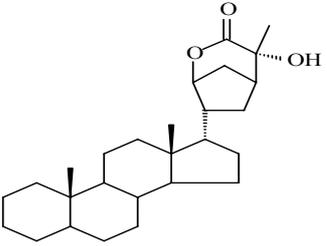
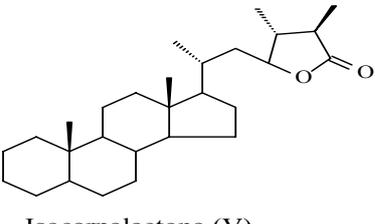
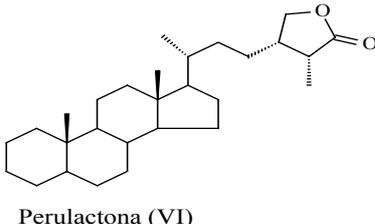
Enquanto o metabolismo primário é responsável por executar funções essenciais dos vegetais como fotossíntese e respiração do vegetal, o metabolismo secundário origina compostos formados a partir da interação da planta com o meio ambiente, dentre estes compostos podem ser citados: terpenos (sesquiterpenos como os vitaesteróides), compostos fenólicos e alcalóides (SIMÕES et al., 2002).

#### 1.2.4 Constituintes químicos isolados do gênero *Physalis*

Os vitaesteróides constituem uma classe de compostos químicos bioativos denominados lactonas esteróidais (C-28) naturais, que reproduzem o esqueleto intacto ou modificado do ergostano. Estes metabólitos secundários geralmente contêm ligação dupla e na grande maioria são polioxigenados (Figura 2). Estas peculiaridades conduzem a várias modificações da cadeia carbocíclica, bem como da cadeia lateral, resultando em compostos de exóticas e complexas feições estruturais. Como resultado desta diversidade estrutural, os vitaesteróides foram subdivididos em seis grupos principais: vitanolídeos (I), vitafisalinas (II), fisalinas (III), acnistinas (IV), ixocarpalactonas (V) e perulactonas (VI), os quais podem apresentar os anéis A ou D aromatizados (Tabela 2).

Os vitanolídeos são os mais abundantes e são considerados os precursores dos grupos III - IV. Doze membros da família Solanaceae são as principais fontes destes compostos: *Acnistus*, *Datura*, *Deprea*, *Iochroma*, *Jaborosa*, *Lycium*, *Nicanda*, *Salpichroa*, *Tubocapsicum*, *Witheringia*, *Withania* e *Physalis*. Sendo os dois últimos gêneros os maiores biosintetizadores destes produtos naturais. Entretanto, é importante ressaltar que os vitaesteróides são também produzidos por alguns membros das famílias Taccaceae e Leguminosae, e a partir de alguns organismos marinhos (CÁRDENAS et al., 1994; VERAS et al., 2004).

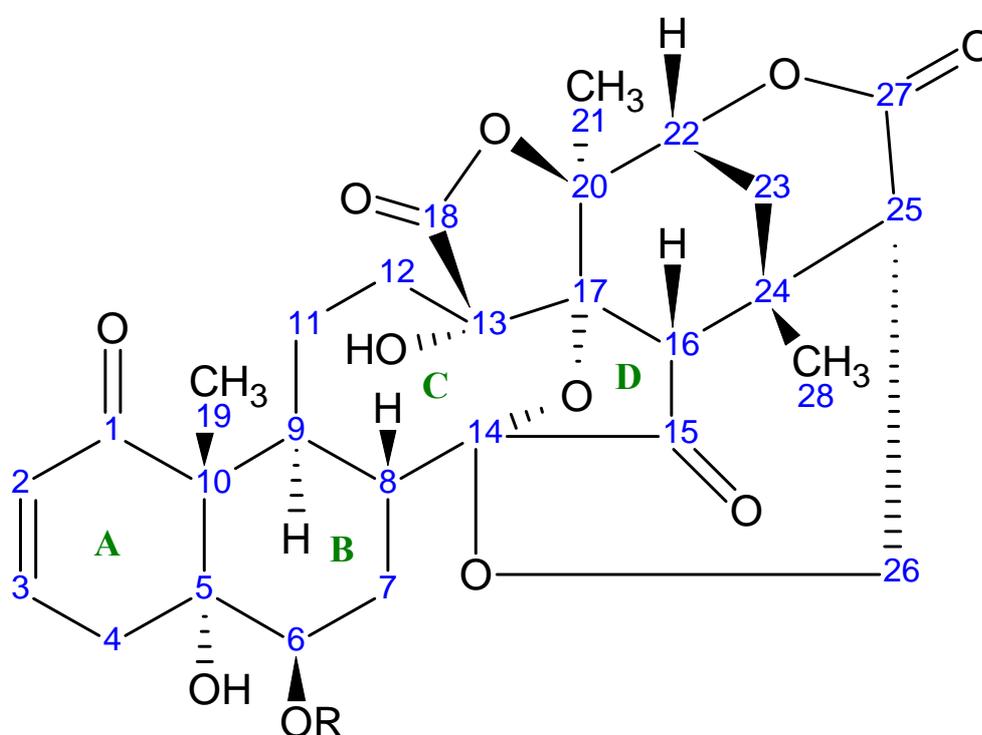
**Tabela 2 – Principais constituintes químicos encontrados na família Solanaceae**

Principais grupos de vitanosteróides	<b>Vitanolídos</b>	 <p>Vitanolido (I)</p>
	<b>Vitafisalinas</b>	 <p>Vitafisalina (II)</p>
	<b>Fisalinas</b>	 <p>Fisalina (III)</p>
	<b>Acnistinas</b>	 <p>Acnistina (IV)</p>
	<b>Ixocarplactonas</b>	 <p>Isocarpalactona (V)</p>
	<b>Perulactonas</b>	 <p>Perulactona (VI)</p>

Fonte: Tomassini et al. (2000)

### 1.2.5 As fisalinas

São vitaesteróides encontrados no gênero *Physalis*. Quimicamente são denominadas de lactonas sesquiterpênicas esteroidais. Constituem-se como moléculas de estruturas bastante complexa, pois além da lactona apresentam uma outra  $\gamma$  lactona fundida ao anel D. São derivados esteroidais do tipo 13,14 – seco 16,24 ciclo ergostano, carbonilados em C -15.



**Figura 3** – Estrutura básica das fisalinas

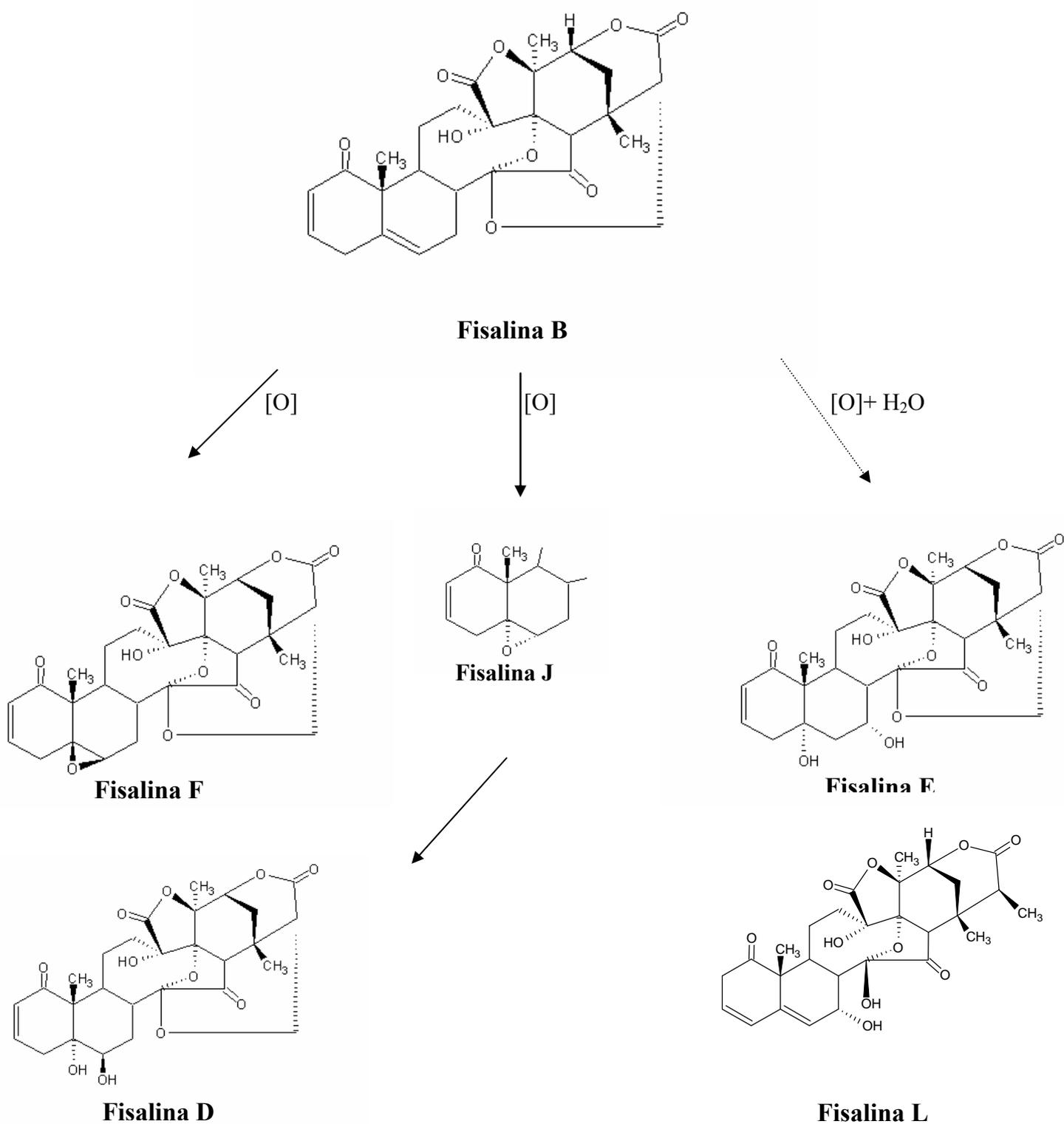
### 1.2.6 Alguns constituintes químicos obtidos do gênero *Physalis*

Como consequência da importância etnofarmacológica conferida por algumas espécies de *Physalis*, várias delas têm sido investigadas quimicamente, tendo sido isolados flavonóides, alcalóides, esteróides e ceramidas (BASEY et al., 1992; ISMAIL et al., 2001; SU et al., 2002). No entanto, um grupo de metabólitos secundários majoritários caracterizados como vitaesteróides, tem sido encontrado em raízes e folhas da *P. angulata* Lin. sendo denominadas de fisalinas (SOARES et al., 2003).

Os vitaesteróides, como por exemplo as fisalinas podem ser originados nas plantas do gênero *Physalis* a partir de reações de oxidação e/ou hidratação que ocorreriam na própria planta. Segundo ROW et al. (1980), as plantas do gênero *Physalis* são promotoras de algumas possíveis rotas biossintéticas, as quais seriam responsáveis pela formação de alguns metabólitos secundários, dentre eles as fisalinas como: fisalina F, J, E, I, D, além de outros componentes (fluxograma 2).

Muitas fisalinas tem sido descritas como substâncias potencialmente citotóxicas e a elucidação de suas estruturas tem contribuído bastante para o conhecimento das propriedades farmacológicas como a fisalina L a qual foi descrita por SEN et al. (1995), porém, somente foi definida por ROW et al. (1995). (fluxograma 2).

**Fluxograma 2** – Possíveis rotas biossintéticas para a formação das fisalinas pelas Solanaceae.



Fonte: Adaptado de Row et al. (1980)

### 1.2.7 Padrões de morte celular (Apoptose e Necrose)

Apoptose é um fenômeno singular no qual milhões de células do nosso organismo morrem a todo o momento. De acordo com pesquisas, há indicadores de que a saúde de todos os organismos multicelulares, incluindo os seres humanos, depende não somente da capacidade do corpo de produzir novas células, mas também da capacidade de cada célula se autodestruir quando tornam-se enfermas. John Kerr, Andrew Wyllie e Alaister Currie, autores que introduziram o termo em 1972, adotaram a palavra grega *apoptosis* para designar esse tipo de morte celular, com significado de “decaimento”, como o fenômeno que ocorre na queda das pétalas de uma rosa ou das folhas de uma árvore (DUKE et al., 1996).

A morte celular programada ou apoptose é um mecanismo controlado geneticamente, o qual possui um importante papel na homeostase celular (WU et al., 2004). O fenômeno apoptótico é desencadeado por vários fatores, porém o início do processo ocorre a partir da liberação do citocromo c; o qual pode ser encontrado comumente nas membranas internas e externas da mitocôndria. Após um estímulo apoptótico, o citocromo c é liberado para o citosol onde atuará como um dos principais ativadores, induzindo a atividade proteolítica da caspase 3 por ativação da caspase 9. Neste mecanismo, o citocromo c forma um complexo com duas proteínas citossólicas, Apaf-1 e Apaf-3 (*apoptotic protease-activating factor*), e o complexo formado ativa a caspase 3, que fatalmente, culminará com a apoptose. Os oncogenes Bcl-xL e Bcl-2 encontram-se na membrana externa da mitocôndria para suprimir a apoptose bloqueando a liberação do citocromo c e ligando-se a Apaf-1 para prevenir a ativação da caspase 9 (EVAN, 2001).

Na via mitocondrial são descritos outros fatores de promoção de morte, incluindo, AIF (*apoptotic initiating factor*), SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspases*) também conhecida por DIABLO, Endonuclease G e HtrA2 (*heart-inducible serine protease*) também conhecida como OMI. AIF e Endonuclease G aparecem como aptas a direcionarem a causa do dano nuclear e ao DNA (WU et al., 2004).

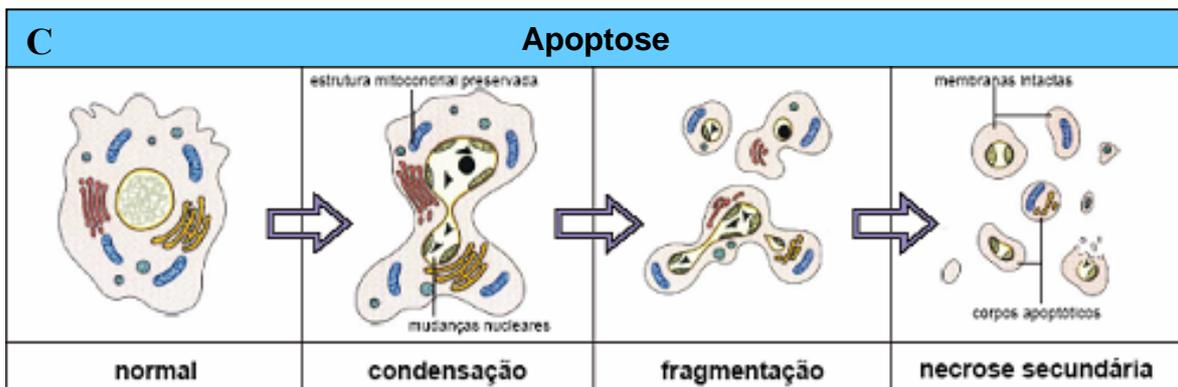
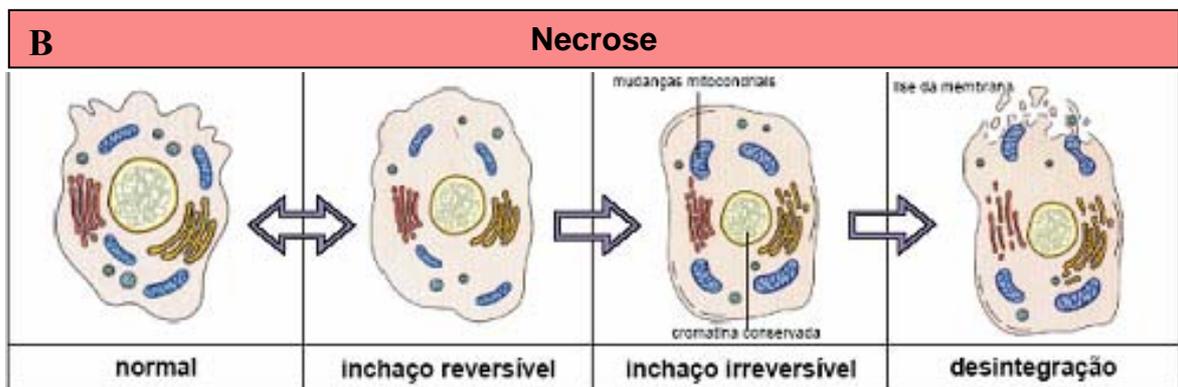
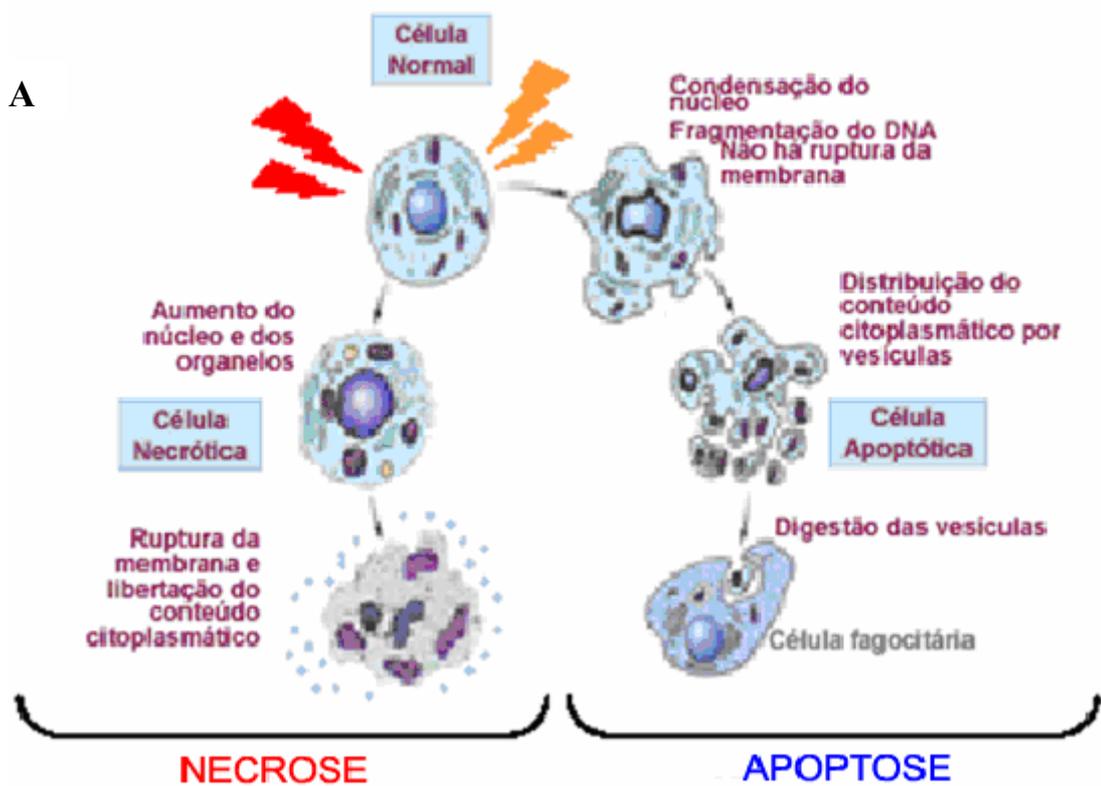
Um dos possíveis alvos na terapêutica seria a modulação da apoptose no tratamento de inúmeras doenças como o câncer, inflamação, imunodeficiências, doenças degenerativas nas quais, a apoptose leva à morte celular. Em algumas circunstâncias as “ferramentas” para o controle de regulação indutora ou inibidora da apoptose poderão ser

utilizados na tentativa de uma modulação do mecanismo de morte celular programada (WALKER et al., 1991; WEIL et al., 1996).

Por outro lado, a necrose é uma outra expressão morfológica da morte celular e está relacionada a uma gama de modificações que se seguem à morte celular, em grande parte acionada pela ação gradativa e progressiva de enzimas sobre a célula letalmente lesionada, levando a uma série de alterações morfológicas que surgem após a morte celular em um tecido vivo. Um mesmo agente etiológico pode provocar tanto necrose quanto apoptose (Figura 4 e Tabela 3); sendo que a severidade da agressão parece ser o fator determinante do tipo de morte celular. Vários agentes etiológicos são conhecidos como indutores de apoptose, entre eles podem ser citados: alguns vírus, isquemia, hipertermia e também algumas toxinas (KUMMAR et al., 2005).

A morte por necrose é freqüentemente atribuída a diversas perturbações metabólicas ou mesmo oriunda de injúrias mecânicas, onde há uma rápida desestabilização da membrana plasmática, sendo relacionada com a resposta inflamatória. Muitos agentes indutores de apoptose como: patógenos, citocinas, calor, isquemia e irradiação contribuem para que células de uma mesma população morram por necrose. Constatou-se também que o processo necrótico ocorre como morte celular programada durante a resposta imune, regeneração tecidual e no desenvolvimento embrionário. A resposta inflamatória causada pela necrose possui função adaptativa como sinal de emergência sob certas condições patológicas. O equilíbrio entre os processos de morte por apoptose e/ou necrose é de fundamental importância para o organismo, uma perturbação do balanço entre os dois processos pode induzir ao desenvolvimento de doenças (SERGEY et al., 2003).

Morfologicamente, a necrose é um pouco diferente do fenômeno apoptótico clássico. Durante a necrose, a célula primeiro aumenta de tamanho, em seguida é observada a lise da membrana plasmática. Características bioquímicas presentes durante a apoptose como: ativação de proteínas específicas, não são encontradas em células em processo de necrose. Entre os agentes que podem induzir necrose estão vários vírus, bactérias e protozoários. A necrose pode ser ativada por toxinas bacterianas, Dong et al. (1997); Warny et al. (2000) e componentes de defesa, como complemento, células *natural killer* ativadas, Blom et al. (1999) e macrófagos peritoneais, Arantes et al. (2000).



**Figura 4** – Principais diferenças de apoptose e necrose (A); Características da Necrose (B); Características da Apoptose (C).

Fonte: Bioagency, 2004.

**Tabela 3** - Diferenças básicas entre apoptose e necrose

<b>APOPTOSE</b>	<b>X</b>	<b>NECROSE</b>
<b>Estímulo</b>		
Fisiológico (Ativação de vias bioquímicas, geneticamente reguladas) ou patológico.		Patológico (Ambiente hostil ou agressão).
<b>Ocorrência</b>		
Acomete células individuais, desencadeando a eliminação seletiva de células patológicas.		Acomete um grupo de células. Fenômeno degenerativo, consequência de lesão celular severa e irreversível.
<b>Reversibilidade</b>		
Fenômeno torna-se irreversível após o “ponto de retorno”, com a deposição de material floculento e amorfo na matriz mitocondrial (liberação do citocromo c).		Irreversível, após ativação de endonucleases.
<b>Liberação de enzimas lisossômicas</b>		
Ausente		Presente
<b>Características bioquímicas</b>		
Processo envolvendo ativações e muitas vias enzimáticas.		Perda de regulação iônica com severas alterações homeostáticas.
Dependente de energia (ATP).		Processo Passivo (sem necessidade de energia).
Fragmentação de DNA definida.		Digestão do DNA por endonucleases.
Pré-fragmentação de DNA		Pós-fragmentação de DNA
<b>Características morfológicas</b>		
Membrana plasmática intacta; a estrutura encontra-se alterada, especialmente a orientação dos lipídios.		Membrana plasmática danificada com conseqüente perda de integridade.
Agregação da cromatina à membrana celular.		Floculação da cromatina.
Condensação celular (encolhimento celular).		Inchaço da célula seguido de lise (edema).
Formação de vesículas com membrana (corpos apoptóticos).		Lise completa sem formações de vesículas.
Sem desintegração das organelas.		Desintegração das organelas.
<b>Características fisiológicas</b>		
Morte de células individuais induzida por estímulos fisiológicos;(atividade programada).		Morte de grupos celulares evocado por distúrbios não fisiológicos.
Fagocitose por células adjacentes ou macrófagos.		Fagocitose por macrófagos.
Resposta não inflamatória.		Resposta inflamatória freqüente.

Fonte: Adaptado de Kummar et al. (2005)

## 1.2.8 O ciclo celular e o câncer

### 1.2.8.1 O ciclo celular

Basicamente, o ciclo celular é o programa para o crescimento e a divisão (proliferação) celular. Existem 4 fases no ciclo celular: G1, S, G2 e M. A fase G1 é caracterizada por expressão de genes e síntese de proteínas. Isto permite à célula crescer e produzir todas as proteínas necessárias para a síntese de DNA. Durante a próxima etapa, a fase S, a célula replica seu DNA possuindo, então, 2 fitas completas de DNA, entrando na terceira fase do ciclo celular: G2. Durante a fase G2, a célula novamente cresce e sintetiza proteínas necessárias ao processo de divisão celular. Completada esta fase, a célula finalmente entra na quarta fase do ciclo celular: M. Durante a fase M, a célula passa por um processo denominado citocinese, originando 2 células filhas, estando o ciclo celular completo. No ciclo de divisão celular, o alvo de fármacos capazes de atuarem na estabilização dos microtúbulos é a metáfase, impedindo a fase G2-M na anáfase, podendo ocorrer a morte celular ou a resistência das células aos fármacos utilizados, sobrevivendo e continuando a se multiplicar (FIGUEIREDO et al., 2003).

#### Os reguladores do ciclo celular

O ciclo celular é desencadeado quando um fator de crescimento atua sobre as células em repouso, induzindo a sua divisão. Os principais componentes do sistema de controle que determina a progressão celular por meio do ciclo celular é composto de duas famílias de proteínas: ciclinas e ciclinas-quinases dependentes (*cdks*, *cyclin dependent kinases*) e inibidores das *cdks*. As *cdks* são formadas por um grupo de proteíno-quinases do tipo serina-treonina, sendo expressas de modo constitutivo na célula, porém na forma inativa; Existem 8 grupos de ciclinas (as principais são A, B, D e E), as quais podem ser ativadas por meio de fosforilação (RANG; et al., 2005).

Por outro lado, as *cdks*, são sintetizadas apenas nas fases específicas do ciclo celular, enquanto às ciclinas, estimulam as *cdks*; De forma contrária seus inibidores exercem efeito inibitório no controle do ciclo celular (KUMMAN et al., 2005).

Sendo assim, os fatores de crescimento estimulam a produção de dois tipos de transdutores de sinais:

- ✓ Reguladores positivos do ciclo celular, os quais controlam as alterações necessárias para a divisão celular, como por exemplo: a ciclina D;
- ✓ Reguladores negativos, que controlam os reguladores positivos, como por exemplo: o gene p53.

#### A Ciclina D

A ciclina D regula a proliferação celular e progressão da fase G1 para S do ciclo celular. Alguns estudos relatam apenas deficiência *in situ* de ciclina D1, confundindo com diferenças não significativas entre melanomas primários e melanomas metastáticos. Estudos confirmam a utilidade da ciclina D no diagnóstico como um marcador melanocístico (FIGUEIREDO et al., 2003).

#### O Gene p53

O gene p53, denominando o “guardião do genoma”, codifica um fator de transcrição protéico, a proteína p53. É um gene supressor tumoral encontrado em células normais em baixa quantidade, podendo ser detectado em concentrações normais em muitos tumores malignos e benignos; este tem a função primária de manter as células em estado de repouso após um dano no DNA. O gene p53 pode ainda iniciar o processo de apoptose caso o defeito do DNA não seja reparado (RANG et al., 2005).

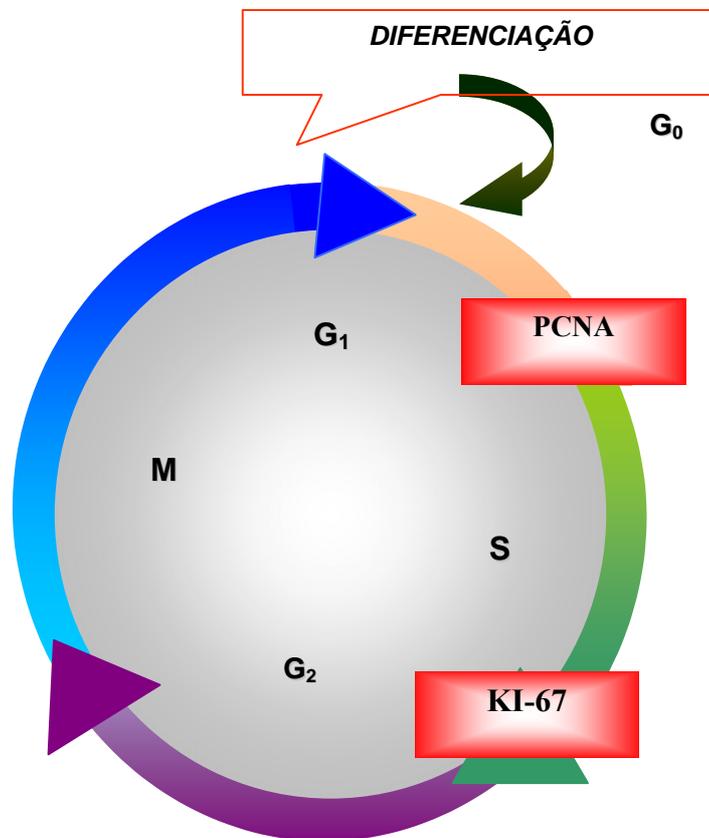
#### 1.2.9 Proliferação celular x indicadores de proliferação

A ação proliferativa desencadeada por um tumor ou tecido é ordenada pela fração de crescimento, na qual um determinado número de células encontra-se em ciclo e pelo tempo levado por estas células para completar seu ciclo celular. Existem evidências correlacionando

a taxa de proliferação tumoral e achados clínicos, principalmente em tumores sólidos (BROWN; GATTER, 1990). Novos achados sobre os mecanismos reguladores do ciclo celular têm levado cada vez mais à descoberta de vários antígenos celulares [PCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen) e Ki-67], expressos em células apresentando estado de proliferação que podem ser identificados por métodos imunohistoquímicos.

O marcador Ki-67 foi descrito por Gerdes et al. (1983). Esta molécula é um anticorpo monoclonal que identifica um antígeno nuclear presente na maioria das células em proliferação. A expressão deste antígeno está intimamente associada com o ciclo celular, podendo ser usada para medir a fração de crescimento das células. Sua expressão ocorre durante a fase G1 e progride durante o ciclo celular, alcançando o máximo em G2 e M, diminuindo rapidamente após a mitose, não sendo expresso em G0 (Figura 5) (QUINN; WRIGHT, 1990; FLENGHI et al., 1988).

O Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) é uma proteína de 36kDa acessória de polimerase, presente em todas as fases no ciclo celular, tendo seu pico de expressão em G1 tardio e S precoce. Bhawan et al. (2002), mostraram que o PCNA imunologicamente maculado é maior em melanomas metastáticos. Porém, em alguns tumores, a sua escolha como marcador de atividade proliferativa ainda é, muitas vezes, questionada.



**Figura 5** - Expressão do Ki-67 e PCNA na progressão do ciclo celular: o ciclo celular possui 4 fases (G<sub>1</sub>-S-G<sub>2</sub>-M) onde o PCNA é mais expresso no final de G<sub>1</sub> e início de S e o Ki-67 mais no final da fase S, não sendo expresso em G<sub>0</sub> e início de G<sub>1</sub>. Esquema retirado da dissertação de mestrado de Montenegro (2003).

### 1.2.10 Sarcoma 180 e a oncologia experimental

A descoberta de inúmeros compostos utilizados no tratamento clínico de neoplasias tem ocorrido devido à evolução da oncologia experimental (POTT et al., 1987). A quimioterapia do câncer, seja em animais experimentais ou em humanos, tem como objetivo a redução do número de células neoplásicas viáveis, abaixo do qual, as células que sobrevivam ao tratamento com uma determinada droga não sejam capazes de restabelecer a doença (PESSOA, 2000).

O Sarcoma 180 foi inicialmente identificado no *Crocker Laboratory* (*Columbia University, New York*) em 1914. É um tumor de natureza sólida, que foi inicialmente classificado como carcinoma mamário, por surgir espontaneamente na região axilar de camundongos. Em 1919, após muitos transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa e manteve-se sem alterações até os dias atuais. A forma sólida caracteriza-se por ter um rápido crescimento, atingindo uma média de 18 x 14 x 10 mm por volta de sete dias de transplante. Pode causar metástase para os pulmões o que pode ocorrer quando os tumores estão com mais de quatro semanas de evolução (SCHABEL et al., 1977).

Foi observado que muitos tumores a partir da 3ª semana de implante desenvolvem necrose, sendo a morte dos animais ocasionada geralmente por desnutrição, toxemia e septicemia. Em 1951, após inoculação intraperitoneal de fluido leitoso de Sarcoma 180 (sólido) em camundongos *Swiss*, Charlotte Friend desenvolveu a forma ascítica do tumor nos animais; Pessoa et al. (2000), descrevem que inicialmente são inoculados aproximadamente 1 milhão de células tumorais e após 10 dias, tem-se aproximadamente 75 a 150 milhões de células tumorais por mL. Esta metodologia tem sido largamente utilizada pelo Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará (UFC) como *screening* de novas drogas anticâncer, em que muitos agentes antitumorais empregados na clínica são submetidos a testes (PESSOA et al., 2000).

### 1.2.11 Justificativa do estudo

A busca de substâncias promissoras por meio de *screening* racional de produtos naturais como fonte de drogas antineoplásicas como subsídio alternativo para o tratamento do câncer tem nortado inúmeras pesquisas para obtenção de novos fármacos (HAUNAUSSKE, 1996; ISHIOKA et al., 1998).

Após a descoberta e o sucesso do paclitaxel, a busca de novos produtos naturais, com atividade anticâncer por mecanismos de ação similar ao deste fármaco ou por outras vias de ação, recebeu atenção especial por parte de diferentes grupos de pesquisa. Isso pode ser confirmado pelo número de promissores compostos naturais isolados de diferentes fontes (SOUZA, 2003).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antitumoral das fisalinas B e D, bem como determinar o potencial citotóxico das fisalinas: B, F, 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B, e fisalina E isoladas da *Physalis angulata* Lin., coletada no município de Pentecoste, interior do Ceará, a partir da determinação de suas atividades citotóxicas em modelos *in vitro* e da avaliação antitumoral *in vivo*.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar e comparar as atividades citotóxicas das fisalina D (PA-1), fisalina B (PA-2), fisalina F, (PA-3), 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B (PA-4), 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetraidrofisalina B (PA-4H<sub>2</sub>) e fisalina E (PA-5) em células tumorais e no desenvolvimento embrionário do ouriço do mar *Lytechinus variegatus*;
- ✓ Determinar a capacidade hemolítica das fisalinas: fisalina D (PA-1), fisalina B (PA-2), fisalina F, (PA-3), 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B (PA-4), fisalina E (PA-5);
- ✓ Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* no Sarcoma 180 dos animais tratados com as fisalinas D (PA-1) e fisalina B (PA-2), salina (controle negativo) e 5 fluorouracil (controle positivo), através da determinação do percentual de inibição do crescimento tumoral;
- ✓ Analisar o peso e as características histomorfológicas dos órgãos (rins, fígado e baço) e dos tumores obtidos ao final do 10º dia de inoculação do tumor tratados por 7 dias com as fisalinas B e D, salina (controle negativo) e 5 fluorouracil (controle positivo);

- ✓ Determinar o índice de proliferação celular no tumor, através da análise imunohistoquímica pelo Ki-67, dos animais tratados com as fisalinas B e D, salina (controle negativo) e 5 fluorouracil (controle positivo);
  
- ✓ Avaliar o padrão de morte (apoptose ou necrose) nas células tumorais HL-60, previamente incubadas com as fisalinas D (PA-1), B (PA-2), F, (PA-3) e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B (PA-4).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1 Equipamentos

Agitador de placa MLW Modelo Thys 2

Aquário marinho

Centrífuga Centrimicro FANEN Modelo 212

Centrífuga Excelsa Baby - I FANEN Modelo 206

Centrífuga de placas - Eppendorf Modelo Centrifuge 5403

Centrífuga de lâminas - Shandon Southern Cytospin

Deionizador de água Milli-Q

Espectrofotômetro de placas - Packard Spectra Count

Fluxo laminar - VECO

Frascos para cultura de células- Corning

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

Microscópio de fluorescência Olympus Modelo BX41

Microscópio óptico - Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab

Microscópio óptico de inversão - Nikon Diaphot

### 3.2 Soluções x reagentes

<b>NOMES</b>	<b>CONCENTRAÇÕES</b>	<b>MARCA</b>
Ácido Acético	32 N	REAGEN
Ácido Clorídrico	0,1 N	VETEC
Água do mar filtrada	-	-
Álcool Etílico	70%	VETEC
Anticorpo secundário biotinilado anti-imunoglobulina de camundongo	1 µL de anticorpo biotinilado	DAKO
Anticorpo monoclonal Anti - Ki-67	1 µL de anticorpo anti-Ki-67	DAKO
	BSA 5% q.s.p. 50 µL de solução	DAKO
Azul de tripan 4%	4 mg de Azul de tripan	SIGMA
	PBS q.s.p. 100 mL de solução	-
Brometo de etídio 100 µg/mL	1mg de Brometo de etideo	SIGMA
	PBS q.s.p 10 mL de solução	-
Diaminobenzidina (DAB)	5 µL de DAB	IMMUNOTECH
	1 mL de Tris-Hcl (Tris 0,05M) pH=7,6	PROQUIMIOS
	2 µL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PROQUIMIOS
Doxorrubicina	0,3 µg/mL	ZODIAC
Eosina 0,5%	0,5 g de Eosina	DOLES
	80 mL de EtOH	VETEC
	0,5 mL de Ácido acético	VETEC
	20 mL de H <sub>2</sub> O	-
Estreptavidina – peroxidase	1 µL de Estreptavidina – peroxidase	DAKO
Estreptavidina – peroxidase	BSA 5% q.s.p. 100 µL de solução	DAKO

Formalina neutra 10%	100 mL de Formaldeído 37%	VETEC
	4 g de Fosfato de sódio monobásico	LABSYNTH
	6,5 g Fosfato de sódio dibásico	LABSYNTH
	H <sub>2</sub> O q.s.p. 900 mL	-
5- Fluorouracil	250 mg/10 mL	ICN FARMACÊUTICA
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
KCl 0,5M	37,3 g de Cloreto de potássio	LABSYNTH
	H <sub>2</sub> O q.s.p 1 L de solução.	-
Laranja de Acridina	1g de laranja de acridina (100µg/mL)	FLUKA
	H <sub>2</sub> O q.s.p. 10mL de solução	-
MTT (5mg/mL)	50mg de MTT	SIGMA
	PBS q.s.p. 10 mL de solução	-
Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e esterilizada, filtrado em filtro millipore – 0,22 mm – e complementado com 10% SBF, 1% de glutamina, 1% de antibióticos, 1% de bicarbonato de sódio (0,75%) e 25 mM de HEPES.	
Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL	CULTILAB
	Estreptomicina 10 mg/mL	CULTILAB
Solução salina (para hemólise)	8,5 g de Cloreto de sódio (0,85%)	LABSYNTH
	1,11 g de Cloreto de cálcio (10 mM)	REAGEN

	H <sub>2</sub> O q.s.p 1 L de solução	-
Soro fetal bovino	-	CULTILAB
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5 M	LABSYNTH
	Citrato de sódio 0,15 M	GRUPO QUÍMICA
	H <sub>2</sub> O	-

Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio	LABSYNTH
	2,14 g de NaHPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	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	-
Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5%	CULTILAB
	0,125 g de EDTA	PROQUÍMIOS
	500 mL de PBS	-
Triton X -100 1%	1 mL de Triton X-100	ISO FAR
	H <sub>2</sub> O q.s.p. 100 mL de solução	-

### 3.2.1 Modelos biológicos experimentais

- Camundongos *Mus musculus* Swiss
- Ovos do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*
- Linhagens celulares tumorais cultivadas (Tabela 5)

### 3.3 Principais constituintes químicos isolados da espécie *Physalis angulata* Lin.

Vários espécimes de uma mesma população de *Physalis angulata* Lin. foram coletados na comunidade de Cipó, município de Pentecoste - Ceará em junho de 2003, pelo Prof. Dr. Manoel Andrade Neto, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. O material botânico foi identificado pelo

Prof. Edson Paula Nunes do Departamento de Biologia, sua exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra, sob a inscrição 33.576, na UFC.

Quanto ao isolamento e purificação dos fitocompostos oriundos da *P. angulata* Lin., este foi coordenado pela Prof(a) Dra. Otilia Desudênia Loiola Pessoa e realizado pela doutoranda em química orgânica Maria Leopoldina Veras. Todo o procedimento químico foi realizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

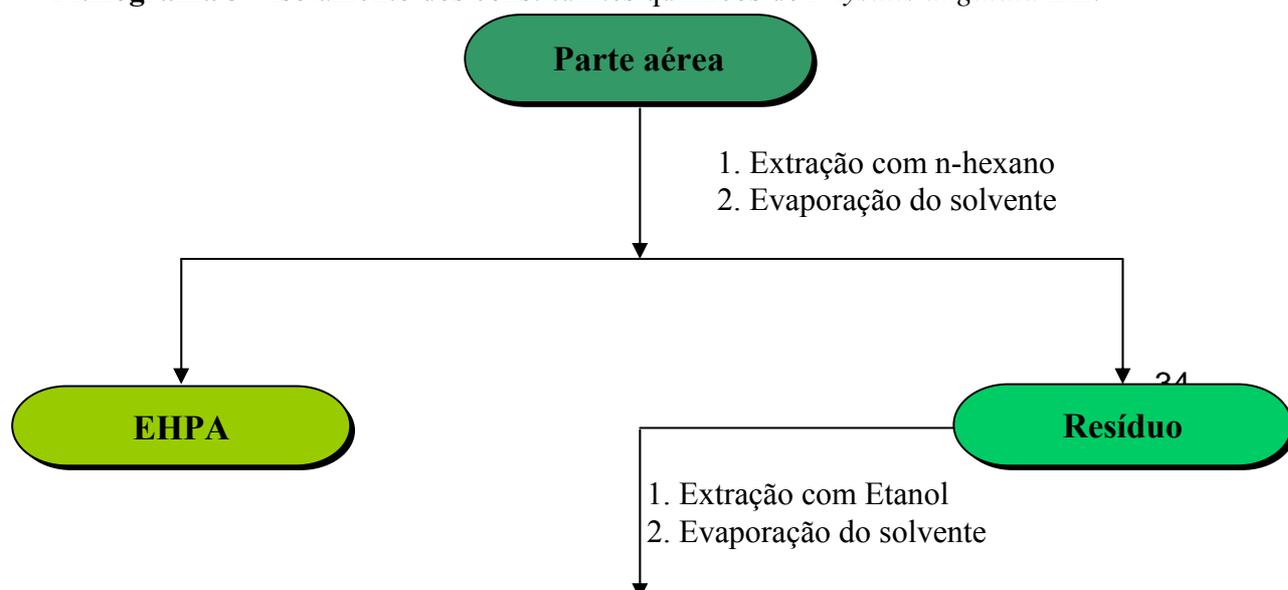
As partes aéreas de *P. angulata* (4,3 Kg) foram secas a temperatura ambiente, trituradas e submetidas à extração exaustiva com *n*-hexano, seguido de extração com etanol, obtendo-se o extrato etanólico de *P. angulata* (EEPA). Em seguida, o EEPA foi submetido a fracionamento cromatográfico em sílica gel, utilizando como eluentes o *n*-hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e MeOH. Ao final da eluição com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ocorreu à precipitação de 2 gramas de um material sólido, amorfo branco, com ponto de fusão entre 287-290 °C. Este precipitado foi filtrado a vácuo resultando em 2,0 g de material, codificado por (Extrato Etanólico de *Physalis angulata* – Diclorometano precipitado - EEPA-Dp), de onde posteriormente foi isolada e identificada a fisalina D, sendo denominada por PA-1.

Partindo-se da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi obtida: a fisalina B, caracterizando-se como um sólido amorfo branco com ponto de fusão entre 263-267 °C, sendo denominada de PA-2. O metabólito secundário denominado fisalina F também foi isolado como um sólido amorfo, com ponto de fusão variando entre 295 – 297 °C, sendo posteriormente denominada de PA-3 e a substância PA-4 a qual foi denominada 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B também como as demais, apresentou-se como um sólido amorfo branco, com ponto de fusão variando entre 229-230,8 °C.

A partir da fração AcOEt, obtida por eluição como CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (4:6) obteve-se um material sólido branco, contendo um pequeno percentual de impurezas, mas apresentando ponto de fusão variando entre 302-305 °C Assim, este material foi recristalizado em acetona fornecendo 1,2 g de sólido amorfo branco, após análise dos

dados espectrais e comparação com dados descritos na literatura foi identificada como a fisalina E, denominada por PA-5 (Fluxograma 3).

**Fluxograma 3** - Isolamento dos constituintes químicos de *Physalis angulata* Lin.



Hexano

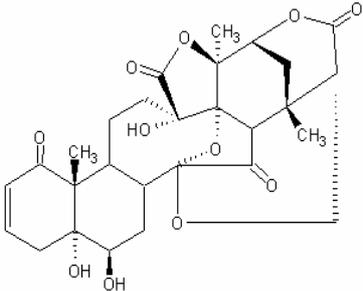
Diclorometano

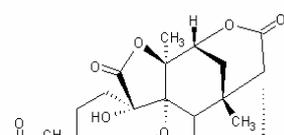
Acetato de Etila

Metanol

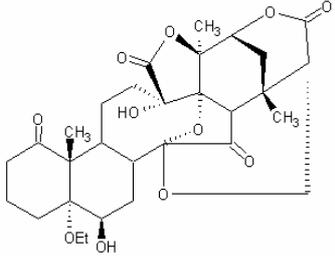
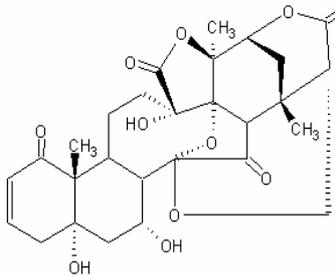
Vale salientar que todos os compostos isolados foram caracterizados segundo seus pontos de fusão e também por análises espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni e bidimensionais, como também em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (CG/EM). Os resultados foram compatíveis aos descritos na literatura (CHIANG et al., 1992a, 1992b; MAKINO et al., 1995). Sendo assim, todos os compostos químicos isolados a partir de partes aéreas da *P. angulata* Lin. mostraram-se quimicamente purificados (Tabela 4).

**Tabela 4** - Constituintes químicos isolados da *Physalis angulata* Lin.

EEPA	Substância	Massa Molecular	Ponto de Fusão (°C)	Estrutura química
EEPA-Dp	(PA-1)	544,5	287-290	



				<b>Fisalina D</b>
<b>EEPA-D</b>	<b>(PA-2)</b>	510,5	263-267	<b>Fisalina B</b>
	<b>(PA-3)</b>	526,5	295-297	<b>Fisalina F</b>
	<b>(PA-4)</b>	572,6	229-230.8	<b>Fisalina 5 <math>\alpha</math>-etóxi-6<math>\beta</math>-hidroxi-5,6-diidrofisalina B</b>

<b>EEPA</b>	<b>Substância</b>	<b>Massa Molecular</b>	<b>Ponto de Fusão (°C)</b>	<b>Estrutura química</b>
<b>EEPA-D</b>	<b>(PA-4H<sub>2</sub>)</b>	574,6	229-230.8	 <p><b>Fisolina 5-α-etóxi-6-β-hidróxi-2,3,5,6-tetrahydrofisolina B</b></p>
<b>EEPA-A</b>	<b>(PA-5)</b>	544,5	302 -305	 <p><b>Fisolina E</b></p>

Fonte: Chiang et al. (1992a, 1992b); Makino et al. (1995)

### 3.4 MÉTODOS

### 3.4.1 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais *in vitro*.

A citotoxicidade avaliada através do método do MTT, Mosmann (1983) utilizando as seguintes linhagens celulares (Tabela 5): CEM (leucemia – humana), HL-60 (leucemia – humana), HCT-8 (cólon – humana), MCF-7 (mama – humano), B-16 (melanoma – murino), PC-3 (próstata), MDA-MB-231 e MDA-MB-435 (mama) e K-562 (eritroleucemia) obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI). O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (MOSMANN, 1983), permitindo dessa forma, quantificar a porcentagem de células vivas e definir facilmente o perfil citotóxico de uma determinada substância, porém apenas o teste do MTT não é capaz de elucidar mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

**Tabela 5** - Linhagens tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*

<b>LINHAGEM CELULAR</b>	<b>TIPO DE NEOPLASIA</b>	<b>ORIGEM</b>
<b>CEM</b>	<b>Leucemia linfocítica</b>	<b>Humana</b>
<b>HL-60</b>	<b>Leucemia promielocítica</b>	<b>Humana</b>
<b>K-562</b>	<b>Eritroleucemia</b>	<b>Humana</b>
<b>HCT-8</b>	<b>Cólon</b>	<b>Humana</b>
<b>MCF-7</b>	<b>Mama</b>	<b>Humana</b>
<b>MDA-MB 231</b>	<b>Mama</b>	<b>Humana</b>
<b>MDA-MB 435</b>	<b>Mama</b>	<b>Humana</b>
<b>PC-3</b>	<b>Próstata</b>	<b>Humana</b>
<b>B-16</b>	<b>Pele</b>	<b>Murina</b>

#### 3.4.1.1 Procedimento experimental

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25cm<sup>2</sup>, volume de 50mL para células aderidas e 75cm<sup>2</sup>, volume de 250mL 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 incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas, quando necessário às células foram repicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de 0,5-1,0 x 10<sup>6</sup> céls/ mL (BUTLER; DAWSON, 1992).

As células em suspensão ou monocamadas foram plaqueadas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de 0,3 x 10<sup>6</sup> células/mL, para células suspensas (CEM, HL-60 e K-562), 0,7 x 10<sup>5</sup> células/mL para HCT-8 e MCF-7, 0,1 x 10<sup>6</sup> (MDA-MB, PC3), e 0,6 x 10<sup>5</sup> células/mL para B16. As substâncias testes, (Fisalinas B, D, E, F, 5 $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B e 5 $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-tetrahidroxifisalina B), foram incubadas durante 72 horas juntamente com a suspensão de com concentrações variando de 0,39 a 25  $\mu$ g/mL. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,003 a 0,25  $\mu$ g/mL. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (15 g/15 min. correspondente a 1500 rpm/15 min.), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200  $\mu$ L da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (30 g/10 min correspondente a 3000 rpm/10 min.), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi resuspendido em 150  $\mu$ L de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550 nm. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

#### 3.4.1.2 Análise dos dados

As drogas foram testadas em diluição seriada, em duplicata ou triplicata. Foi plotado o gráfico: absorvância x concentração, e determinado suas  $CI_{50}$  (concentração inibitória média capaz de inibir o crescimento celular em 50%) 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 dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ( $p < 0,05$ ).

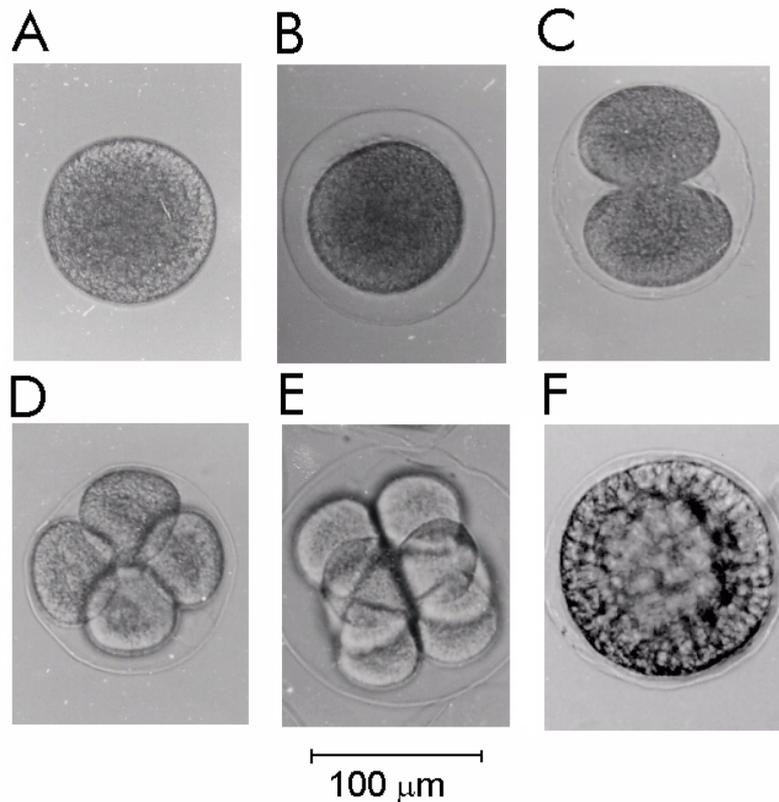
#### 3.4.2 Avaliação da atividade antimitótica em ovos do ouriço-do-mar.

Foram utilizados exemplares da espécie *Lytechinus variegatus*, coletados na praia da Lagoinha, litoral cearense. Esses animais são facilmente coletados e mantidos em aquários no laboratório de Ecotoxicologia - LABOMAR. Eles têm como vantagem apresentarem ovos não muito pigmentados, facilitando a visualização dos estágios de desenvolvimento embrionário e desse modo eles podem sugerir uma visão geral sobre o mecanismo de ação da droga, dependendo do estágio em que a droga inibe o desenvolvimento do ovo (COSTA-LOTUFO et al., 2002).

##### 3.4.2.1 Procedimento experimental

A eliminação dos gametas foi induzida pela injeção de até 3 mL de KCl 0,5 M na cavidade celômica (perivisceral) dos ouriços. Após o término da eliminação dos gametas, os óvulos foram lavados em uma proveta com água do mar filtrada. Esse processo foi repetido por mais duas vezes, para remoção da camada gelatinosa que envolve o óvulo. Após a última lavagem, os óvulos foram resuspendidos em 50 mL de água do mar filtrada. Os espermatozoides concentrados foram coletados e mantidos em baixa temperatura, 4°C, até o momento do uso. A fecundação foi realizada pela adição de 1 mL da suspensão de espermatozoides (0,05 mL de suspensão concentrada dos espermatozoides/ 2,45 mL de água do mar) à suspensão de óvulos (50 mL). Após cerca

de dois minutos, a fecundação foi confirmada pela presença da membrana da fecundação (figura 6b), através da observação de uma amostra das células em microscópio óptico. Os ovos (1 mL) foram distribuídos numa placa com 24 cavidades, contendo as substâncias teste em diferentes concentrações (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo do experimento nas concentrações de 0,1, 0,3, 1, 3 e 10 µg/mL. Os ovos foram incubados num volume final de 2 mL, mantidos à temperatura ambiente ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ) sob agitação constante. Nos intervalos correspondentes a aproximadamente 1 h e 2h após a fecundação, correspondentes respectivamente à primeira e terceira divisões (figuras 6c e 6e) foram fixadas alíquotas de 0,2 mL em formalina 10%. Já a blástula (figura 6f), foi fixada com 0,1 mL de formaldeído adicionado ao volume restante na placa 3h30 min após a fecundação. Cem embriões foram contados em cada amostra para obtenção da percentagem de células divididas (JIMENEZ et al., 2003).



**Figura 6** - Fotomicrografias das primeiras fases do desenvolvimento embrionário do ouriço *Lytechinus variegatus*. A - óvulo; B - ovo com membrana de fecundação; C - 1<sup>a</sup>. divisão; D - 2<sup>a</sup>. divisão; E - 3<sup>a</sup>. divisão; F - blástula.

#### 3.4.2.2 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de  $n$  experimentos. O cálculo da  $CI_{50}$  (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seu respectivo intervalo de confiança (IC) 95% foi 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 dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ( $p < 0,05$ ).

#### 3.4.3 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos *Mus musculus* Swiss.

Esta metodologia, segundo descrita por Costa-Lotufu et al. (2002); Dresch et al. (2005), permitiu avaliar o potencial das substâncias-teste em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

#### 3.4.3.1 Procedimento experimental

Foi coletado o sangue de três camundongos (*Mus musculus* Swiss) por via orbital, sendo diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl<sub>2</sub> 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina e centrifugados (15 g/3 min. correspondente a 1500 rpm/3 min.) para redução da contaminação plasmática e ressuspenso em solução salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Os ensaios foram realizados em multiplacas com 96 cavidades. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 100 µL de solução salina e 100 µL das substâncias teste em solução [fisalina D (PA-1), fisalina B (PA-2), fisalina F, (PA-3), 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B (PA-4), 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetrahidrofisalina B (PA-4H<sub>2</sub>) e fisalina E (PA-5)]. Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X – 100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 1,5 a 200 µg/mL. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 hora, sob agitação constante à temperatura ambiente (26  $\pm$  2°C), as amostras foram centrifugadas (50 g/3 min. correspondente a 5000 rpm/3 min.) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540 nm. A atividade do extrato foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo.

#### 3.4.4 Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán

O teste de exclusão por azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância testada. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível desta forma, observar uma coloração azulada nas células mortas (JIMENEZ et al., 2003).

##### 3.4.4.1 Procedimento experimental

Células da linhagem HL-60, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, foram incubadas por 24h com as substâncias e examinadas ao microscópio de inversão. A concentração utilizada foi estimada a partir do valor da  $CI_{50}$  (5, 10 e 15  $\mu\text{g/mL}$ ) encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular. Retirou-se 90  $\mu\text{L}$  da suspensão de células e foi adicionado a 10  $\mu\text{L}$  do azul de tripan (tripan a 10%). As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer. A Doxorrubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usada como controle positivo (VERAS et al., 2004).

##### 3.4.4.2 Análise dos dados

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

### 3.4.5 Coloração diferencial por brometo de etídio/laranja de acridina

O método de coloração pelo brometo de etídio / laranja de acridina, McGahon et al. (1995), permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da coloração diferencial por fluorescência e baseia-se na revelação das células (controle e tratadas) com a coloração de brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA) ao nível do núcleo. A laranja de acridina intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas.

O brometo de etídio é incorporado majoritariamente por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA corando-o de laranja; ligando-se fracamente ao RNA, que se mostrará com uma coloração vermelha. As células viáveis com membrana intacta apresentaram núcleo uniformemente corado de verde pela LA; O BE marca muito fracamente ou muitas vezes não marca, pois não atravessa a membrana não lisadas. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentaram 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 (KUMMAR et al., 2005).

#### 3.4.5.1 Procedimento experimental

Células da linhagem HL-60, plaqueadas na concentração de  $0,3 \times 10^6$  cél/mL, foram incubadas por 24h com as drogas. As concentrações utilizadas (5, 10 e 15  $\mu\text{g/mL}$ ) foram estimadas a partir do valor da  $\text{CI}_{50}$  encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular. A suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 5 min em baixa rotação (10 g/5 min. correspondente a 1000 rpm/5 min.). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20  $\mu\text{L}$  de solução de PBS. Em seguida, 1  $\mu\text{L}$  da solução de BE:LA foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células transferido para uma lâmina e montado com lamínula e em seguida levadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares. A Doxorrubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usada como controle positivo (GENG et al., 2003).

#### 3.4.5.2 Análise dos dados

Foram contadas 300 células, em duplicata, cada amostra para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas) e montadas em lâminas que foram fotografadas para o registro visual dos efeitos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ( $p < 0,05$ ).

#### 3.4.6 Avaliação da atividade antitumoral (*in vivo*)

##### 3.4.6.1 Obtenção e manutenção dos animais

Os testes para avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foram realizados utilizando camundongos (*Mus musculus* Swiss) machos pesando entre 20-25g oriundos do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, mantidos com água

e alimento *ad libitum*. O manejo dos animais foi realizado procurando seguir a todos princípios éticos, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento dos animais.

O animal de manutenção ou doador foi anestesiado com éter etílico e sacrificado por meio de deslocamento cervical. Fez-se o procedimento asséptico com álcool iodado e em seguida coletou-se o líquido ascítico da cavidade abdominal, tendo sido preparada uma suspensão de células com 4,0 mL de Ringer lactato, 0,5 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem das células. Conforme aprovado pelo comitê de ética de pesquisas em animais da UFC (CEPA).

#### 3.4.6.2 Avaliação do efeito das fisalinas B e D 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 sensíveis ao composto ou ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os não tratados. Ficou demonstrado que o melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado até 48 h após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral (SCHABEL et al., 1977). O tumor utilizado foi o Sarcoma 180 o qual foi descoberto em 1914 no Crocker Laboratory (Columbia University, New York), é originalmente um tumor sólido, surgido espontaneamente na região axilar de camundongos, e foi inicialmente classificado como carcinoma mamário. Após vários transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa, por volta de 1919, e mantêm-se sem alterações até os dias de hoje.

#### 3.4.6.3 Procedimento experimental

Para o teste de atividade antitumoral, foi utilizado o tumor sólido do tipo Sarcoma 180, com 8 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, tendo sido preparado uma suspensão de células com 5,0 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem de células. Os animais receptores ou utilizados para o experimento de atividade antitumoral, foram inoculados com  $4 \times 10^6$  células/0,2 mL na região axilar dos camundongos e o tratamento foi iniciado 24 horas após o implante dos tumores e continuou durante 7 dias consecutivos, com as fisalinas B e D nas doses de 10 e 25 mg/kg, 5-Fluorouracil (5FU) – 25 mg/Kg (controle positivo) e solução salina (controle negativo). Todos os grupos foram tratados por via intraperitoneal. No terceiro dia após o término do tratamento os animais foram sacrificados, sendo em seguida retirados os tumores, rins, fígado e baço para pesagem, análise histológica e realização da imunohistoquímica dos tumores através do marcador para proliferação tumoral: Ki-67.

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.

#### 3.4.6.4 Análise dos dados

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

### 3.4.7 O marcador Ki-67

O marcador denominado Ki-67 foi descrito por GERDES et al., em 1983. A quantificação deste antígeno é útil para avaliar proliferação celular. A expressão deste antígeno está intimamente associada com o ciclo celular, podendo ser usado para medir a fração de crescimento das células. Sua expressão ocorre durante a fase G1 e progride durante o ciclo celular, alcançando o máximo em G2 e M, diminuindo rapidamente após a mitose, não sendo expresso em G0 (FALINI et al., 1989; QUINN; WRIGHT, 1990).

#### 3.4.7.1 Descrição da imunohistoquímica pelo Ki-67

#### 3.4.7.2 Procedimento experimental

Após o sacrifício dos animais, ocorreu a retirada e pesagem de órgãos e tumores, os quais foram armazenados em formol a 10%. As peças foram retiradas do formol, seccionadas em pequenas fatias e montadas em parafina para posterior preparação das lâminas: controle negativo (Salina), controle positivo (5-FU, 25 mg/Kg), animais tratados com fisalinas B e D (10 e 25 mg/kg). O material foi fixado em formol a 10% por 24 horas, desparafinado em xilol por 15 minutos, e desidratado em concentrações crescentes de álcool até 70% (mergulhando-se rapidamente as lâminas), sendo posteriormente reidratado, sendo lavadas em água destilada até ter sido removido todo o álcool. Posteriormente uma parte dessas lâminas foi corada com Hematoxilina/Eosina, sendo analisadas com ajuda do microscópio.

Uma outra parte foi seguida, sendo as lâminas acondicionadas em jarras plásticas de Colpe (furadas no fundo) com tampão citrato em pH 6,0 cobrindo todas as lâminas dentro de um becher. O becher foi levado ao microondas em potência máxima por 10 minutos até atingir ebulição, a partir daí deixou-se por mais 7 minutos. Retirou-se o becher com o material sendo deixado por 20 minutos em temperatura ambiente. O tampão citrato foi descartado e as lâminas foram lavadas com TBS (de forma indireta e com cuidado para não remover os cortes histológicos).

Acrescentou-se peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% em metanol com a finalidade de bloquear a peroxidase endógena (interferente do experimento) por 10 minutos. As lâminas foram novamente lavadas com TBS e enxugando-as em seguida e retirando o excesso de parafina oriunda do processo de fixação. As lâminas foram circundadas com caneta hidrofóbica adicionando o TBS sobre a região circundada. Posteriormente, o TBS foi aspirado e as lâminas foram incubadas em câmara úmida com soro normal de coelho – BSA (1:5) por 20 minutos (70 µL de soro/lâmina). O BSA foi aspirado e o material foi incubado novamente em câmara úmida com anticorpo primário (1:5), sendo mantido em overnight (16-24 horas) em refrigerador (± 8°C).

Após o período determinado, o material foi retirado da geladeira deixando-se por 15 minutos em temperatura ambiente. Removeu-se o anticorpo primário, lavando-se o material com TBS (deixando-se por 5 minutos) sendo retirado, e em seguida incubou-se novamente as lâminas com anticorpo secundário (coelho anti-mouse biotilado), onde foi deixado por 30 minutos; As lâminas foram lavadas com TBS, acrescentou-se então Estreptavidina e 30 minutos depois o material foi lavado com TBS por 5 minutos em borel vertical com ranhura.

Adicionou-se o fotoreagente (DAB) por 3 minutos (ou até os fragmentos adquirirem coloração mais escura). Retirou-se então o DAB e corou-se o material em hematoxilina na concentração de 1:1, deixando-se o material secar a temperatura ambiente. Posteriormente as lâminas foram lavadas 3 vezes em etanol absoluto 100% e em xilol 100% para desidratação. Finalmente as lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá.

#### 3.4.7.3 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da contagem de células Ki67 positivo presente em cada 4-6 campos por lâmina de cada grupo. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os

dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ( $p < 0,05$ ).

#### 3.4.8 Análise morfológica e histopatológica

O método de coloração por hematoxilina e eosina (H/E) permite diferenciar o citoplasma do núcleo, possibilitando, assim, a análise de algumas estruturas celulares. A análise morfológica e histopatológica de tecidos dos animais tratadas permitem identificar alterações que possam estar ocorrendo e fornecer subsídios para sugerir os efeitos tóxico causados pela droga.

##### 3.4.8.1 Procedimento experimental

Após o sacrifício dos animais, ocorreu a retirada e pesagem de órgãos e tumores, os quais foram armazenados em formol a 10%. As peças foram retiradas do formol e seccionadas em pequenas fatias para posterior preparação das lâminas. O material foi fixado em formol a 10% por 24 horas, desparafinado em xilol por 15 minutos, e desidratado em concentrações crescentes de álcool até 70% (mergulhando-se rapidamente as lâminas), sendo posteriormente lavadas em água destilada até ter sido removido todo o álcool. Posteriormente as lâminas foram coradas com Hematoxilina 0,1%.

##### 3.4.8.2 Análise dos dados

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (Salina). Em seguida as alterações celulares foram registradas por fotografia.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais

A atividade antiproliferativa foi inicialmente avaliada para os extratos e as frações da *P. angulata* Lin. pelo método do MTT e estão representados na Tabela 6. O destaque deu-se para o precipitado obtido do extrato diclorometano que apresentou elevada citotoxicidade com  $CI_{50}$  correspondente a 8,4 (6,9-10,1), 6,1 (5,2-7,1), 3,6 (2,7-4,7), 5,8 (2,2-15,2) e 5,2  $\mu\text{g/mL}$  (4,4-6,2) nas linhagens CEM, HL-60, HCT-8, MCF-7, Melanoma-B-16 (murino) respectivamente, enquanto o precipitado oriundo do mesmo extrato apresentou um elevado potencial citotóxico, cujas  $CI_{50}$  foram  $< 0,8 \mu\text{g/mL}$  em todas as linhagens testadas: leucemia humana (CEM e HL-60), cólon (HCT-8), mama (MCF-7) e pele (B-16). Também a fração acetato de etila apresentou uma citotoxicidade nas linhagens CEM, HL-60, HCT-8, MCF-7, Melanoma-B-16 (murino), cuja  $CI_{50}$  foi  $< 8,0 \mu\text{g/mL}$  em todas as linhagens .

A partir do precipitado diclorometano foi obtido o fitocomposto, denominado por fisalina D, o qual apresentou potencial citotóxico, tendo demonstrado elevada citotoxicidade na maioria das linhagens testadas. Partindo-se da fração diclorometano foram isoladas três fisalinas, as quais foram denominadas por fisalina B, fisalina F e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B, enquanto a partir da fração acetato de etila obteve-se a fisalina E.

Dentre as seis fisalinas obtidas, a 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetrahidrofisalina B e a fisalina E não apresentaram citotoxicidade, cujas  $CI_{50}$  foram  $> 6 \mu\text{M}$  nas células CEM, HL-60, HCT-8 e B-16. Por outro lado, a fisalina D e F mostraram perfil citotóxico semelhante cujas  $CI_{50}$  foram  $< 1.5 \mu\text{M}$  (1,0  $\mu\text{g/mL}$ ) nas células CEM, HL-60, HCT-8 e B16 (Tabela 8). Enquanto, a fisalina B e a fisalina 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B, também apresentaram elevado potencial citotóxico, cujos

valores das  $CI_{50}$  variaram entre  $\geq 1,7$  e  $\leq 3,4$   $\mu\text{M}$  respectivamente nas células HL-60 (Tabelas 7 e 8).

Desse modo, a fisalina D e B mereceram destaque por seus potenciais citotóxicos, sendo por isso, selecionadas e correlacionadas em seus perfis citotóxicos em 9 linhagens celulares. Podemos observar que a fisalina D foi potencialmente citotóxica nas linhagens CEM, HL-60, K-562, HCT-8, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435 e B-16 com  $CI_{50} < 1,40$   $\mu\text{M}$ , porém foi observado uma moderada capacidade citotóxica nas células PC-3 cuja  $CI_{50}$  foi de 4,47  $\mu\text{M}$  (Tabela 7). Já a fisalina B mostrou baixa citotoxicidade para as linhagens MDA-MB-435, MDA-MB-231, PC-3 cujas  $CI_{50}$  foram de 15,53; 13,82; 29,76  $\mu\text{M}$  respectivamente, porém apresentou citotoxicidade para as linhagens CEM, HL-60, HCT-8, MCF-7, e B-16 com  $CI_{50} < 1,72$   $\mu\text{M}$  (Tabela 7).

Dessa maneira, fazendo-se uma correlação em  $\mu\text{M}$  com as fisalinas B e D (através da razão das fisalinas B/D), observou-se uma variação no espectro de atividade citotóxica, onde a fisalina D foi de 1,69 à 20,16 vezes mais ativa do que a fisalina B (valores entre parênteses na Tabela 7). Comparando-se a fisalina B com a F podemos observar uma superioridade no grau citotóxico da fisalina F variando de 1,14 à 2,40 vezes mais ativa que a fisalina B. Fazendo-se ainda uma analogia do grau de citotoxicidade das fisalinas D e F podemos observar uma certa equivalência entre os efeitos citotóxicos de ambas as fisalinas, com uma pequena vantagem para a fisalina F, onde os valores variam de 0,67 à 1,14 mais ativa que a fisalina D nas linhagens HL-60, HCT-8 e B-16, enquanto para a linhagem celular CEM ambas as fisalinas mostraram-se igualmente citotóxicas. Sendo assim, as fisalina D e F foram as mais citotóxicas dentre as fisalinas testadas no MTT, com  $CI_{50} < 3,0$   $\mu\text{g/mL}$  (5,5  $\mu\text{M}$  para fisalina D e 5,7  $\mu\text{M}$  para a fisalina F para as linhagens HL-60, HCT-8 e B-16 e CEM). Vale a pena salientar que enquanto as linhagens CEM, HL-60 e B-16 foram mais sensíveis às fisalinas B, D e F, a linhagem PC-3 mostrou uma maior resistência para ação destas substâncias (Tabela 7).

A análise realizada com a doxorrubicina (controle positivo) para o MTT, apresentou valores que variaram entre 0,06  $\mu\text{M}$  para a linhagem melanoma B-16 à 0,83  $\mu\text{M}$  para a linhagem MDA-MB 435. Quando é feita uma analogia entre as fisalinas B, D e F com a doxorrubicina (controle positivo) é possível observar uma equivalência no potencial citotóxico para a fisalina D na linhagem MDA-MB 435 (com 0,83  $\mu\text{M}$  para a doxorrubicina e 0,77  $\mu\text{M}$  para a fisalina D). É importante ressaltar que considera-se uma substância potencialmente citotóxica aquela que possui  $\text{CI}_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$  (em  $\mu\text{M}$  varia de acordo com do peso molecular da substância) (Tabela 7).

**Tabela 6** - Determinação das  $\text{CI}_{50}$  dos diferentes extratos e frações da *Physalis angulata* Lin. em diferentes linhagens de células tumorais humana, obtidas por regressão não-linear.

Extratos	Linhagem celular				
	CEM	HL-60	HCT-8	MCF-7	B16
Hexânico	52,3 (45,0-60,8)	33,1 (29,4-37,1)	67,9 (63,9-72,2)	59,4 (54,8-64,3)	37,2 (27,2-50,7)
Etanólico	7,9 (3,6-17,4)	6,4 (5,3-7,7)	6,4 (5,9-6,9)	5,5 (4,6-6,6)	7,5 (6,4-8,7)
<b>Frações</b>					
Hexânica	> 50	> 50	> 50	42,04 (38,4-46,0)	> 50
Diclorometano	8,4 (6,9-10,1)	6,1 (5,2-7,1)	3,6 (2,7-4,7)	5,8 (2,2-15,2)	5,2 (4,4-6,2)
Precipitado obtido da F. diclorometano	< 0,8	< 0,8	< 0,8	< 0,8	< 0,8
Ac. de etila	7,1 (5,4-9,3)	7,9 (6,3-9,9)	6,7 (5,5-8,3)	3,7 (2,5-4,6)	3,6 (2,7-4,9)
Metanólica	> 50	> 50	> 50	21,2 (13,1-34,3)	40,1 (35,1-45,8)

Cada amostra foi testada em triplicata, e as análises foram realizadas em duas determinações.  $\text{CI}_{50}$  corresponde à concentração que inibe 50% do crescimento celular (média – Intervalo de confiança)

**$\text{CI}_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ , Intervalo de confiança).**

**Tabela 7 -** Atividade citotóxica das fisalinas B, D e F nas linhagens de células tumorais humanas. A doxorubicina foi usada como controle positivo.

A/B (*)	Doxo (**) CI <sub>50</sub> µg/mL(µM)	Fisalina B CI <sub>50</sub> µg/mL(µM)	Fisalina D CI <sub>50</sub> µg/mL(µM)	Fisalina F CI <sub>50</sub> µg/mL(µM)	Fisalina B /Fisalina D CI <sub>50</sub> (***)	Fisalina B /Fisalina F CI <sub>50</sub> (***)	Fisalina D /Fisalina F CI <sub>50</sub> (***)
<b>CEM</b>	0,02 (0,04) 0,02 – 0,03	0,63 (1,23) 0,54 – 0,73	0,28 (0,51) 0,25 – 0,31	0,28 (0,50) 0,24 – 0,33	2,25 (2,41)	2,25 (2,46)	1 (1,02)
<b>HL-60</b>	0,02 (0,03) 0,01 – 0,02	0,87 (1,71) 0,59 – 1,29	0,55 (1,01) 0,42 – 0,74	0,81 (1,5) 0,67 – 0,97	1,58 (1,69)	1,07 (1,14)	0,67 (0,67)
<b>K-562</b>	0,14 (0,24) 0,09 – 0,23	4,70 (9,21) 2,88 – 7,67	0,75 (1,38) 0,67 – 0,85	–	6,26 (6,67)	–	–
<b>HCT-8</b>	0,01 (0,02) 0,01 – 0,02	0,58 (1,14) 0,39 – 0,86	0,34 (0,62) 0,30 – 0,39	0,27 (0,50) 0,23 – 0,31	1,70 (1,83)	2,14 (2,28)	1,25 (1,24)
<b>MCF-7</b>	0,20 (0,34) 0,17 – 0,24	1,03 (2,02) 0,98 – 1,08	0,43 (0,79) 0,35 – 0,53	–	2,39 (2,55)	–	–
<b>MDA-MB 435</b>	0,48 (0,83) 0,34 – 0,66	7,92 (15,53) 6,13 – 10,22	0,42 (0,77) 0,28 – 0,63	–	18,85 (20,16)	–	–
<b>MDA-MB 231</b>	0,10 (0,17) 0,07 – 0,13	7,05 (13,82) 5,23 – 9,49	0,59 (1,08) 0,47 – 0,75	–	11,94 (12,79)	–	–
<b>PC-3</b>	0,24 (0,41) 0,21 – 0,27	15,18 (29,76) 12,46 – 18,50	2,43 (4,47) 2,17 – 2,68	–	6,24 (6,65)	–	–
<b>B-16</b>	0,03 (0,06) 0,02 – 0,04	0,61 (1,20) 0,54 – 0,70	0,31 (0,57) 0,25 – 0,37	0,28 (0,50) 0,21 – 0,36	1,96 (2,10)	2,17 (2,40)	1,10 (1,14)

Cada amostra foi testada em triplicata, e as análises foram realizadas em duas determinações. CI<sub>50</sub> corresponde à concentração que inibe 50% do crescimento celular (média – Intervalo de confiança) CI<sub>50</sub> (µg/mL, Intervalo de confiança).

(\*) A – Linhagens celulares

B – Substâncias

(\*\*) Doxorubicina

(\*\*\*) N° de vezes mais potente que a substância do numerador

**Tabela 8** - Atividade citotóxica das fisalinas E, 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidroffisalina B (PA-4) e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetrahidroffisalina B (PA-4H<sub>2</sub>) nas linhagens de células tumorais humanas. A doxorubicina foi usada como controle positivo.

A/B (*)	Doxo (**) CI <sub>50</sub> $\mu$ g/mL ( $\mu$ M)	PA-5 CI <sub>50</sub> $\mu$ g/mL ( $\mu$ M)	PA-4 CI <sub>50</sub> $\mu$ g/mL ( $\mu$ M)	PA-4H <sub>2</sub> CI <sub>50</sub> $\mu$ g/mL ( $\mu$ M)	PA-4/PA-4H <sub>2</sub> CI <sub>50</sub> (***)
<b>CEM</b>	0.02 (0.04)	> 25	0,69 (1,20)	9,33 (16,20)	13,52 (13,50)
	0.02 – 0.03	(> 45,90)	0,61 – 0,78	6,48 – 13,45	
<b>HL-60</b>	0.02 (0.03)	> 25	2,02 (3,50)	10,70 (18,60)	5,29 (5,31)
	0.01 – 0.02	(> 45,90)	1,54 – 2,65	7,96 – 14,37	
<b>HCT-8</b>	0.01 (0.02)	> 25	0,60 (1,00)	3,54 (6,10)	5,90 (6,10)
	0.01 – 0.02	(> 45,90)	0,51 – 0,69	2,28 – 5,49	
<b>B-16</b>	0.03 (0.06)	> 25	0,58 (1,00)	13,32 (23,10)	22,90 (23,10)
	0.02 – 0.04	(> 45,90)	0,47 – 0,71	11,50 – 15,43	

Cada amostra foi testada em triplicata, e as análises foram realizadas em duas determinações. CI<sub>50</sub> corresponde à concentração que inibe 50% do crescimento celular. (média – Intervalo de confiança) CI<sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL, Intervalo de confiança).

(\*) A – Linhagens celulares

(\*\*)Doxorubicina

B - Substâncias

PA-4H<sub>2</sub> - 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetrahidroffisalina B  
(\*\*\*) N° de vezes mais potente que a substância do numerador

#### 4.2 Avaliação do potencial antimitótico em ovos de ouriço do mar *Lytechinus variegatus*.

O ensaio avaliou o desenvolvimento embrionário do ouriço do mar, determinando o potencial antimitótico das fisalinas (vitaesteróides) isoladas da *Physalis angulata* Lin. Foram avaliadas as fisalinas B, D, E, F, 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B, e a 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetraidrofisalina B.

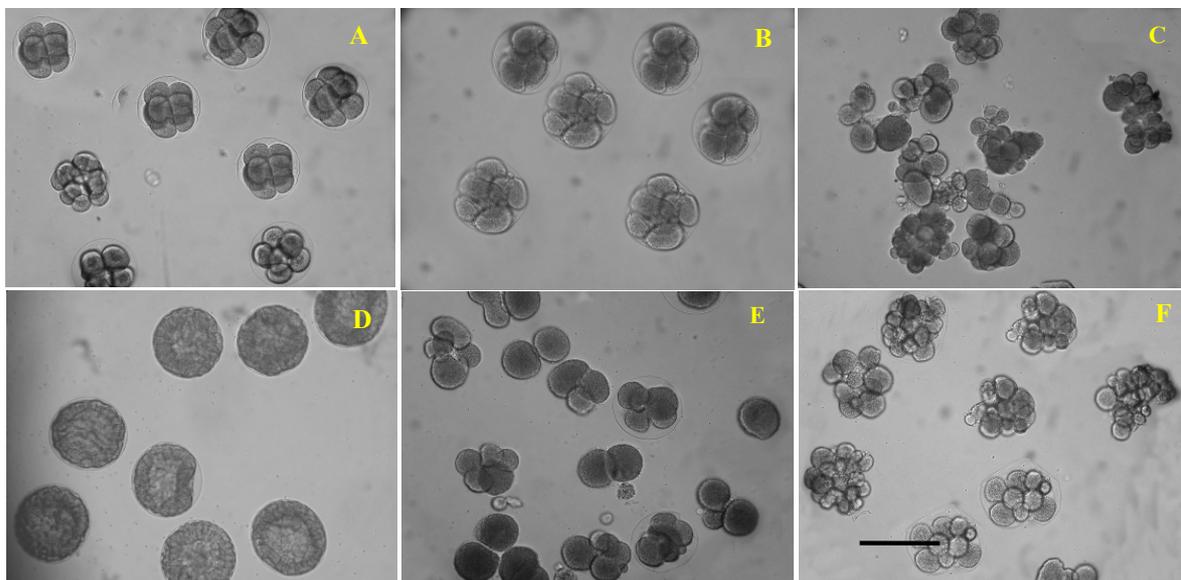
As fisalinas B, D, F e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B inibiram o desenvolvimento embrionário em concentração menor que 52  $\mu$ M, porém a fisalina D foi a que teve a menor  $CI_{50}$  na 1ª divisão e na blástula, correspondentes a 8,7  $\mu$ M e 10  $\mu$ M respectivamente, e na 3ª divisão foi de 13,4  $\mu$ M, tendo demonstrado o seu elevado potencial antimitótico. Enquanto a fisalina B mostrou-se a mais ativa na 3ª divisão com uma  $CI_{50}$  correspondente 10,5  $\mu$ M, valores esses menores do que os encontrados na 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B e fisalina E; Por outro lado, fisalina 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetraidrofisalina B não apresentou potencial antimitótico, uma vez que a sua  $CI_{50}$  foi maior do que 174  $\mu$ M em todas as divisões (Tabela 9). Já os controles doxorubicina e etoposide tiveram uma  $CI_{50}$  de 10,8 e 13,3 na 1ª divisão respectivamente, valores esses superiores ao encontrado com a fisalina D. Vale ressaltar que ambos os controles positivos foram mais ativos que as seis fisalinas testadas para a 3ª divisão e blástula.

A ordem decrescente de atividade para as fisalinas na 1ª divisão foi: fisalina D > B > F > 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B > E > 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetraidrofisalina. Na 3ª divisão foi: fisalina B > D > F > 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B > E > 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetraidrofisalina B e a na fase blástula a ordem foi: fisalina D > F > B > 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B > E > 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetraidrofisalina B. A Figura 7, mostra o efeito da ação das fisalina B (58,8  $\mu$ M) e D (55,1  $\mu$ M) correspondente as fases de 3ª divisão e blástula do desenvolvimento embrionário dos ovos do ouriço. Pode-se observar que as fisalinas B e D inibiram completamente as clivagens observadas na terceira divisão evoluindo para ocorrência de divisões anômalas na fase de blástula.

**Tabela 9** - Atividade antimetabólica das fisalinas **D (PA-1/183,0  $\mu\text{M}$ )**, **B (PA-2/195,9  $\mu\text{M}$ )**, **F (PA-3/189,9  $\mu\text{M}$ )**, 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-**diidrofisalina B (PA-4/174,6  $\mu\text{M}$ )**, **E (PA-5/183,7  $\mu\text{M}$ )** e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-**tetrahidrofisalina B (PA-4 H<sub>2</sub>/ 174,0  $\mu\text{M}$ )** no intervalo de concentração de 1 à 100  $\mu\text{g/mL}$ . Os controles positivos doxorrubicina e etoposide na concentração de 58,0  $\mu\text{g/mL}$  correspondendo (106,7  $\mu\text{M}$ ) para a doxorrubicina e (92  $\mu\text{M}$ ) para o etoposide sobre o desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço do mar *Lytechinus variegatus*, nas fases de 1ª divisão 3ª divisão e blástula com as  $\text{CI}_{50}$  e com seus respectivos intervalos de confiança de 95% obtidos por regressão não-linear.

<b>(PA - 1) - 183,0 (<math>\mu\text{M}^*</math>)</b>	<b>Fase da divisão</b>	<b><math>\text{CI}_{50}</math> - <math>\mu\text{g/mL}(\mu\text{M})</math></b>	<b>IC 95%</b>
	1ª Divisão	4,786 (8,70)	3,556 – 6,424
	3ª Divisão	7,323 (13,4)	5,579 – 9,613
	Blástula	5,498 (10,0)	5,498 – 7,374
<b>(PA - 2) – 195,9 (<math>\mu\text{M}^*</math>)</b>	<b>Fase da divisão</b>	<b><math>\text{CI}_{50}</math> - <math>\mu\text{g/mL}(\mu\text{M})</math></b>	<b>IC 95%</b>
	1ª Divisão	6,431 (12,5)	3,405 – 12,15
	3ª Divisão	5,308 (10,5)	4,232 – 6,657
	Blástula	7,631 (14,9)	6,356 – 9,649
<b>(PA - 3) – 189,9 (<math>\mu\text{M}^*</math>)</b>	<b>Fase da divisão</b>	<b><math>\text{CI}_{50}</math> - <math>\mu\text{g/mL}(\mu\text{M})</math></b>	<b>IC 95%</b>
	1ª Divisão	8,284 (15,7)	6,479 – 10,59
	3ª Divisão	7,572 (14,3)	5,872 – 9,765
	Blástula	7,281 (13,8)	6,077 – 8,723
<b>(PA - 4) – 174,6 (<math>\mu\text{M}^*</math>)</b>	<b>Fase da divisão</b>	<b><math>\text{CI}_{50}</math> - <math>\mu\text{g/mL}(\mu\text{M})</math></b>	<b>IC 95%</b>
	1ª Divisão	16,54 (28,8)	10,68 – 25,63
	3ª Divisão	29,48 (51,4)	19,24 – 45,17
	Blástula	10,51 (18,3)	8,181 – 13,51
<b>(PA - 5) – 183,7 (<math>\mu\text{M}^*</math>)</b>	<b>Fase da divisão</b>	<b><math>\text{CI}_{50}</math> - <math>\mu\text{g/mL}(\mu\text{M})</math></b>	<b>IC 95%</b>
	1ª Divisão	> 100 (> 183,6)	
	3ª Divisão	72,28 (132,7)	33,43 - >100
	Blástula	15,40 (28,2)	11,55 – 20,55
<b>(PA - 4 H<sub>2</sub>) – 174,0 (<math>\mu\text{M}^*</math>)</b>	<b>Fase da divisão</b>	<b><math>\text{CI}_{50}</math> - <math>\mu\text{g/mL}(\mu\text{M})</math></b>	<b>IC 95%</b>
	1ª Divisão	> 100 (174)	
	3ª Divisão	> 100 (174)	
	Blástula	> 100 (174)	
<b>(Doxorrubicina) – 106,7 (<math>\mu\text{M}^*</math>)</b>	<b>Fase da divisão</b>	<b><math>\text{CI}_{50}</math> - <math>\mu\text{g/mL}(\mu\text{M})</math></b>	<b>IC 95%</b>
	1ª Divisão	6,28 (10,84)	4,34 – 9,09
	3ª Divisão	0,34 (0,66)	0,16 – 0,73
	Blástula	0,54 (0,94)	0,27 – 1,07
<b>(Etoposide) – 92 (<math>\mu\text{M}^*</math>)</b>	<b>Fase da divisão</b>	<b><math>\text{CI}_{50}</math> - <math>\mu\text{g/mL}(\mu\text{M})</math></b>	<b>IC 95%</b>
	1ª Divisão	7,85 (13,34)	1,210 – 48,84
	3ª Divisão	0,30 (0,52)	0,200 – 0,460
	Blástula	0,85 (1,44)	0,530 – 1,370

(\*) – Valor correspondente em  $\mu\text{M}$  a 5, 10 e 15  $\mu\text{g}$  para as fisalinas e 58  $\mu\text{g}$  para doxorrubicina e etoposide.



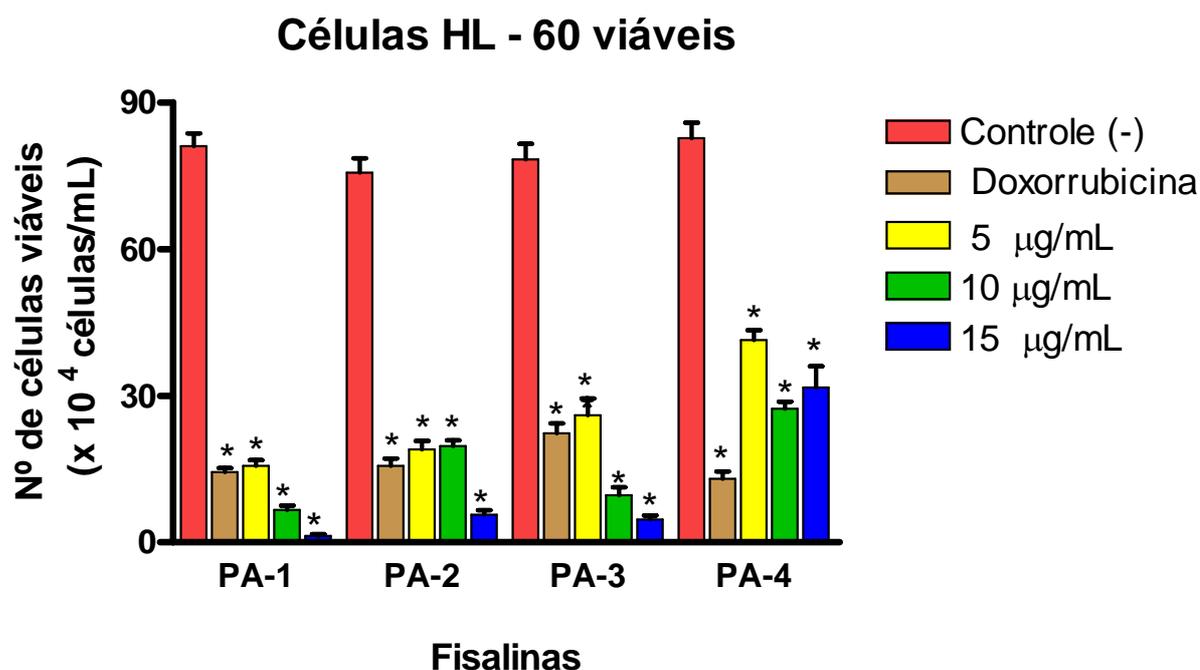
**Figura 7** - Ação das fisalina B (58,8  $\mu\text{M}$ ) e D (55,1  $\mu\text{M}$ ), correspondente a 30  $\mu\text{g/mL}$ , isoladas do extrato etanólico de *Physalis angulata* sobre o desenvolvimento de ovos do ouriço do mar *Lytechinus variegatus*. Em **A** – Controle na terceira divisão, **B** – fisalina B, **C** – fisalina D, **D** – Controle na blástula, **E** – fisalina B e **F** – fisalina D. As substâncias foram adicionadas 2 min após a fecundação.

#### 4.3 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos *Mus musculus* Swiss

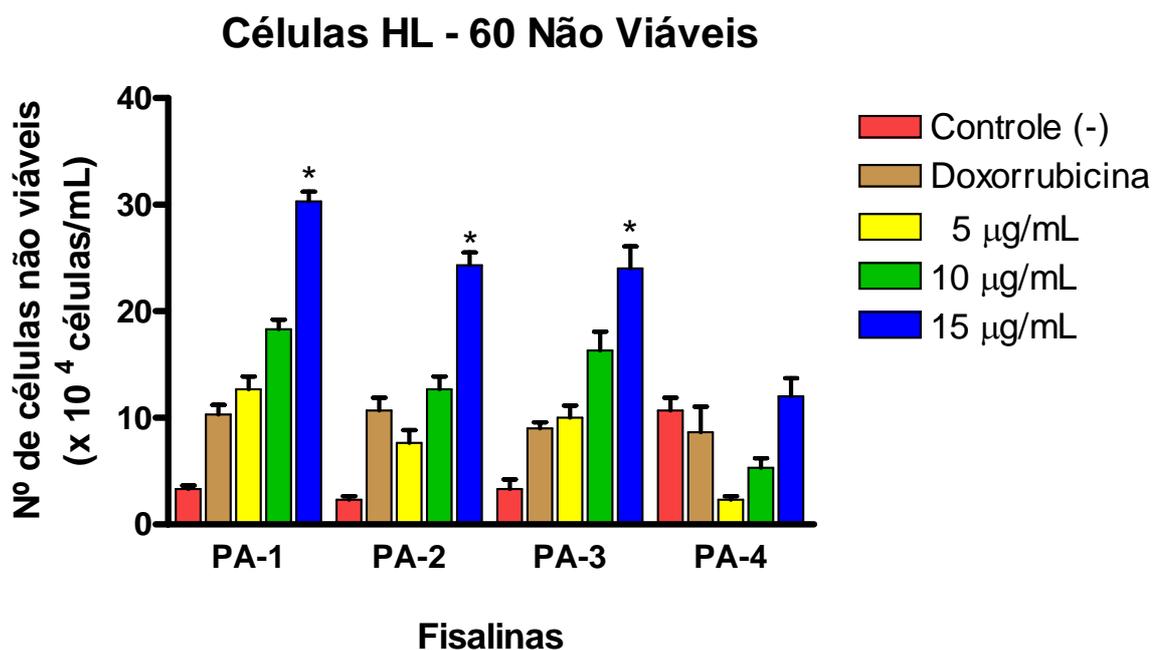
Na aplicação metodologia, foi observada ausência de atividade hemolítica das seis fisalinas nas concentrações testadas na curva ( $\leq 200 \mu\text{g/mL}$  ou  $< 392 \mu\text{M}$ ). Para este ensaio, foram consideradas ativas aquelas substâncias que apresentaram  $\text{CE}_{50} < 200 \mu\text{g/ml}$ .

#### 4.4 Viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripan

Nesse ensaio, as células HL-60 foram diferenciadas em células viáveis (transparente) e células não-viáveis (azul), o que permitiu quantificar a redução da viabilidade nas células tratadas, sugerindo uma diminuição do crescimento. As fisalinas B, D, F e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B reduziram de forma significativa o número de células viáveis em todas as concentrações testadas (5, 10 e 15  $\mu\text{g/mL}$ ), quando comparadas ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). Na concentração de 15  $\mu\text{g/mL}$  (27,5  $\mu\text{M}$ ), a fisalina D foi o composto mais ativo, quando comparada aos controles negativo e positivo, com redução do número de células viáveis em 98,5 %, e em torno de 75% o número de células consideradas não viáveis (Figuras 8 e 9), seguida pela fisalina F 94,5 %, fisalina B 93,3 % enquanto 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B reduziu em apenas 64 % ( $P < 0,05$ ) (Figura 8). A doxorubicina foi testada como controle positivo na concentração de 58,0  $\mu\text{g/mL}$  (106,7  $\mu\text{M}$ ) causando 85,5 % de redução no número de células viáveis (Figura 9).



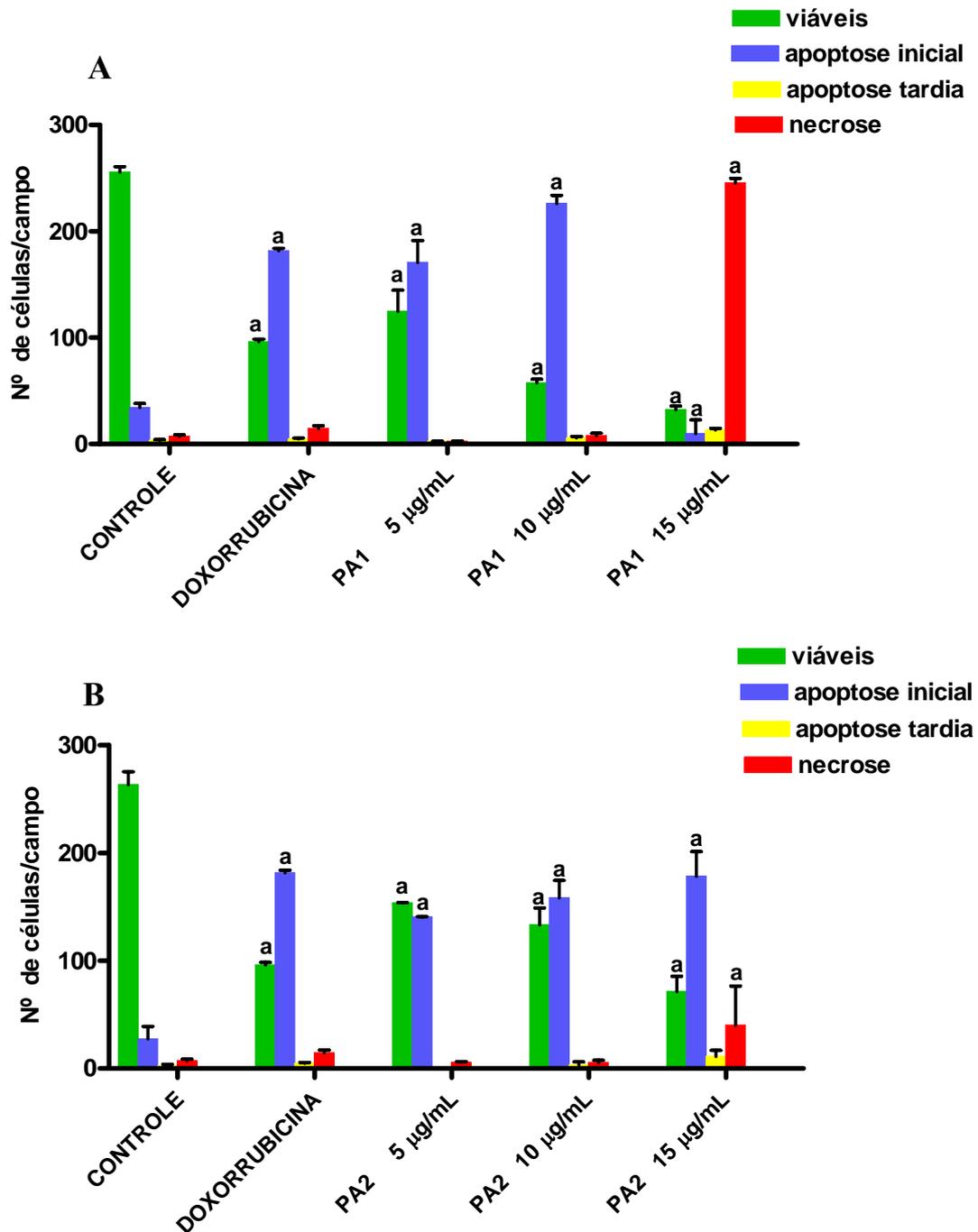
**Figura 8** - Avaliação da viabilidade, pelo método de exclusão por azul de tripan, em células HL-60 controles (C) e tratadas com as frações selecionadas nas concentrações 5, 10 e 15µg/mL. Fisinolinas D (PA-1), fisalina B (PA-2), fisalina F (PA-3) e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisinolina B (PA-4) células viáveis. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. a,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.



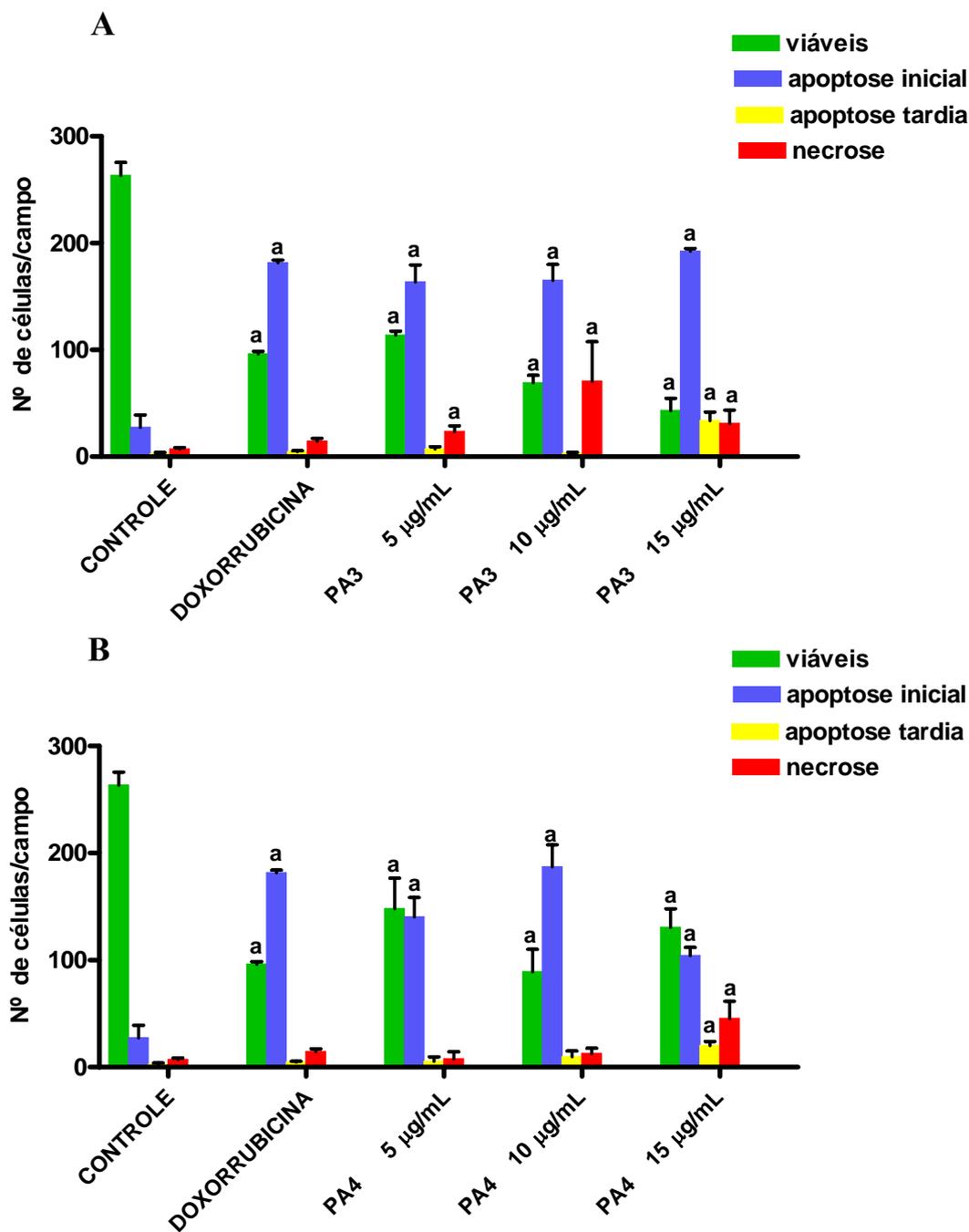
**Figura 9** - Avaliação da viabilidade, pelo método de exclusão por azul de tripan, em células HL-60 controle (C) e tratadas com as frações selecionadas nas concentrações 5, 10 e 15µg/mL. Fisalinas D (PA-1), fisalina B (PA-2), fisalina F (PA-3) e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B (PA-4) células não viáveis. O gráfico apresenta o número de células não viáveis. (C -), controle negativo e (C +), doxorubicina 0,3 µg/mL. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. a,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

#### 4.5 Avaliação do padrão de morte celular por apoptose ou necrose

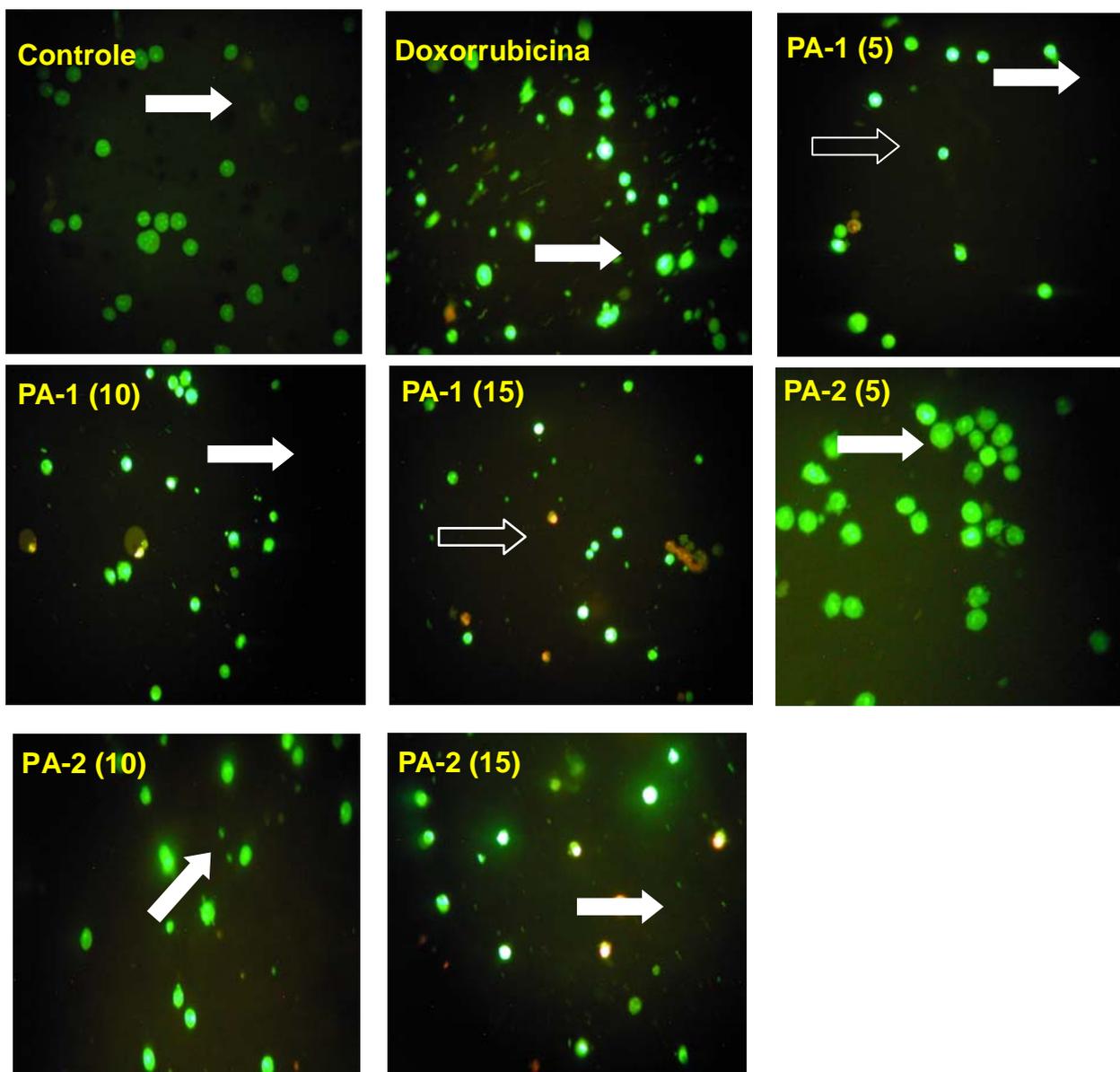
Em relação ao padrão de morte celular estudado neste trabalho, foram selecionadas apenas as fisalinas B, D, F e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B, por terem exibido atividade no tocante ao potencial citotóxico das mesmas. A fisalina D nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  (9,2 e 18,4  $\mu\text{M}$  respectivamente) apresentou um padrão dose-resposta para apoptose inicial, sendo verificado um baixo número de células em apoptose tardia (Figuras 10 A e 12). Na concentração de 15  $\mu\text{g/mL}$  (27,5  $\mu\text{M}$ ) verificou-se um grande aumento no número de células em processo de necrose. O tratamento das células com a fisalina B indicou um número crescente de células apoptóticas em estágio inicial, segundo as respectivas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  (9,79 e 19,6  $\mu\text{M}$ , respectivamente), sendo mais evidente esta ação na concentração de 15  $\mu\text{g/mL}$  (29,4  $\mu\text{M}$ ), (Figura 10 B e 12). Em relação ao tratamento das células com a fisalina F nas concentrações de 10 e 15  $\mu\text{g/mL}$  (19,6 e 29,4  $\mu\text{M}$ , respectivamente) foi observado um elevado número de células em fase inicial de apoptose, enquanto a concentração de 15  $\mu\text{g/mL}$  (28,5  $\mu\text{M}$ ) induziu a uma discreta elevação na quantidade de células em apoptose tardia e necrose (Figuras 11 A e 13). Por outro lado, a 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B mostrou uma maior quantidade de células em apoptose inicial na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  (17,5  $\mu\text{M}$ ), enquanto na concentração de 15  $\mu\text{g/mL}$  (26,2  $\mu\text{M}$ ) foi observado um discreto aumento de células em apoptose tardia e também em estágio de necrose (Figuras 11 B e 13).



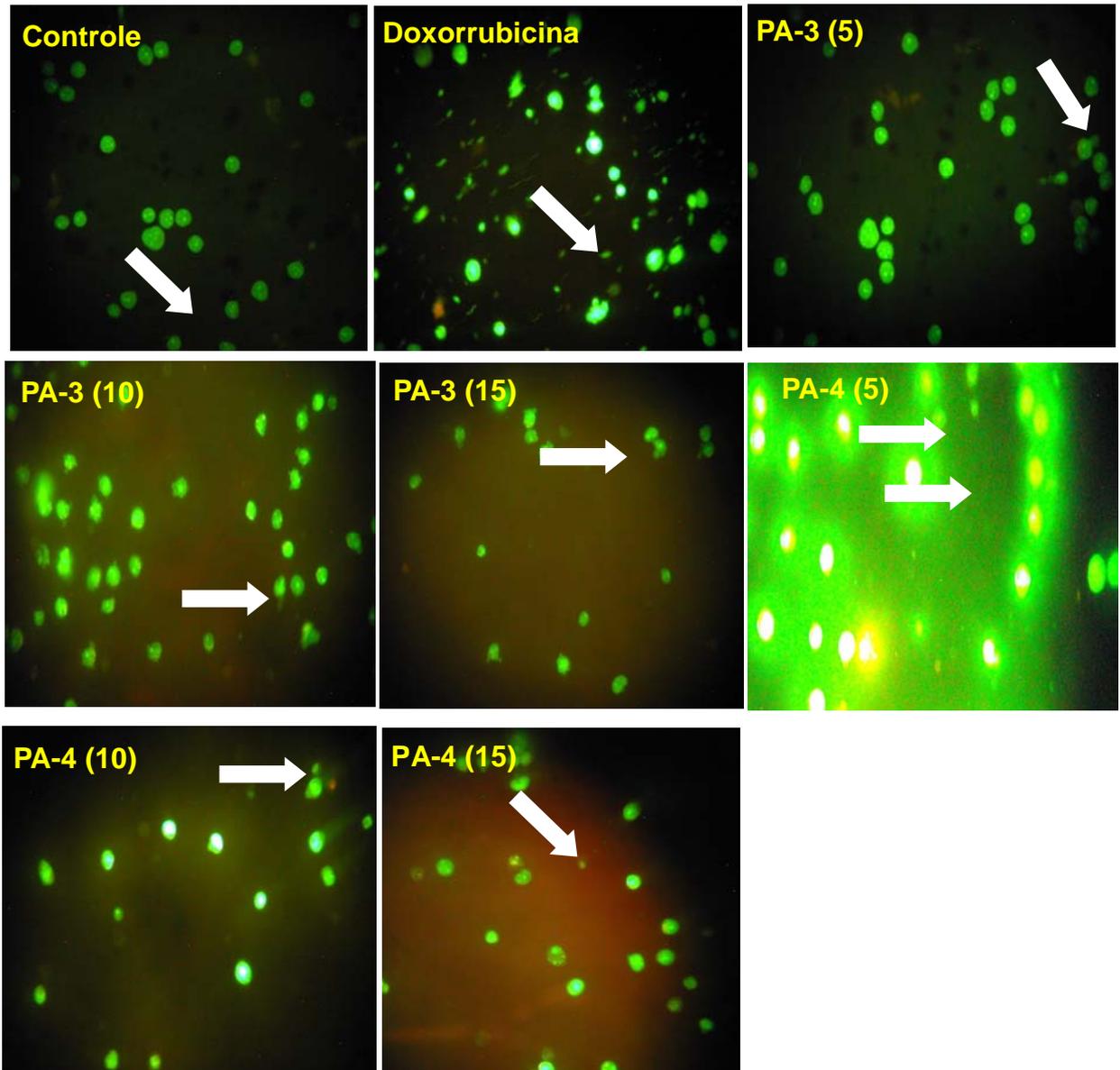
**Figura 10 (A)** - Efeito da fialina D (PA-1) e **(B)** Efeito da fialina B (PA-2) sobre o padrão apoptótico em cultura de células da linhagem de leucemia promielocítica (HL-60). As células foram cultivadas e pré-incubadas com as fialinas D (PA-1) nas concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL (9,2, 18,4 e 27,5 µM respectivamente) e fialina B (PA-2) nas concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL (9,7, 19,6 e 29,4 µM respectivamente), permanecendo em incubação por 24 horas. Doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo. O padrão apoptótico foi evidenciado pela coloração laranja de acridina/brometo de etídio. Os experimentos foram realizados em 3 dias diferentes, sendo contadas 300 células por lâmina. Os valores estão expressos como média ± EPM, **a** vs controle, (dentro de cada padrão morfológico) ( $p < 0.05$ , ANOVA e teste de Turkey).



**Figura 11 (A)** - Efeito da fisalinas F (PA-3) e **(B)** 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B (PA-4) sobre o padrão apoptótico em cultura de células da linhagem de leucemia promielocítica (HL-60). As células foram cultivadas e pré-incubadas com as fisalinas F (PA-3) nas concentrações de 5, 10 e 15  $\mu\text{g/mL}$  (9,5, 19,0 e 28,5  $\mu\text{M}$  respectivamente) e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B (PA-4) nas concentrações de 5, 10 e 15  $\mu\text{g/mL}$  (8,7, 17,5 e 26,2  $\mu\text{M}$  respectivamente), permanecendo em incubação por 24 horas. Doxorubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usada como controle positivo. O padrão apoptótico foi evidenciado pela coloração laranja de acridina/brometo de etídio. Os experimentos foram realizados em 3 dias diferentes, sendo contadas 300 células por lâmina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM, **a** vs controle, (dentro de cada padrão morfológico) ( $p < 0.05$ , ANOVA e teste de Turkey).



**Figura 12** – Efeito das fisalinas B (PA-2) 5,10 e 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (9,7, 19,6 e 29,4  $\mu\text{M}$ ); fisalina D (PA-1) 5, 10 e 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (9,2, 18,4 e 27,5  $\mu\text{M}$ ), doxorubicina 0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (5,5  $\mu\text{M}$ ) sobre o padrão apoptótico em cultura de células da linhagem linfocítica HL-60. Após 24 horas do tratamento o padrão apoptótico foi avaliado pela técnica da laranja de acridina/brometo de etídio. Seta larga fechada (▴): corpúsculos apoptóticos, seta larga aberta (⏏): células necróticas. Microscópio de fluorescência (40 X).



**Figura 13** – Efeito das fisalinas F (PA-3) 5, 10 e 15  $\mu\text{g/mL}$  (9,5, 19 e 28,5  $\mu\text{M}$ ); 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B (PA-4) 5, 10 e 15  $\mu\text{g/mL}$  (8,7, 17,5 e 26,2  $\mu\text{M}$ ), doxorubicina 0,3  $\mu\text{g/mL}$  (5,5  $\mu\text{M}$ ) sobre o padrão apoptótico em cultura de células da linhagem linfocítica HL-60. Após 24 horas do tratamento o padrão apoptótico foi avaliado pela técnica da laranja de acridina/brometo de etídio. Seta larga fechada (▴) :corpúsculos apoptóticos, seta larga aberta (⏏) : células necróticas. Microscópio de fluorescência (40 X).

#### 4.6 Determinação da atividade antitumoral (*in vivo*)

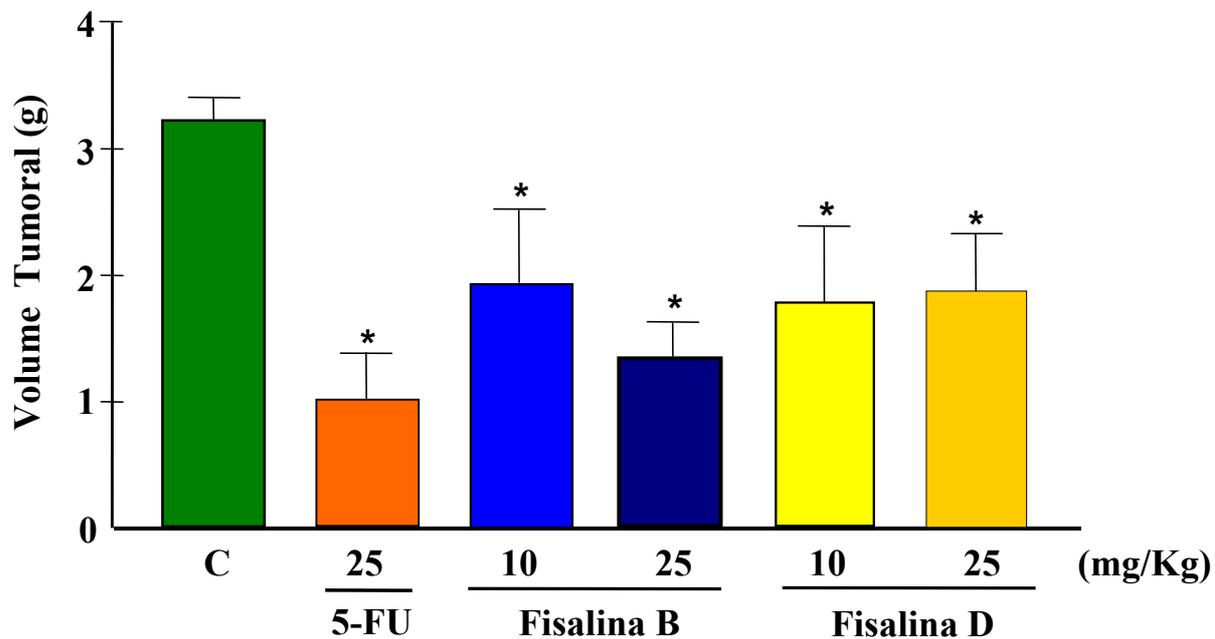
A atividade antitumoral *in vivo* das fisalinas B e D foram determinadas utilizando o modelo experimental do Sarcoma 180 transplantados em camundongos *Mus musculus* Swiss. Foi observado que ambas as fisalinas B e D inibiram o crescimento tumoral de forma significativa. No 10º dia após o implante das células de Sarcoma 180, os tumores foram retirados e em seguida, realizado o processo de pesagem. O peso dos tumores para os camundongos do grupo controle (salina) foi de  $3,42 \pm 0,24$ g, enquanto na presença da fisalina B foi de  $1,90 \pm 0,40$  e  $1,68 \pm 0,24$ g para as doses de 10 e 25 mg/kg/dia/ respectivamente; O tratamento dos animais com a fisalina D mostrou valores de  $1,86 \pm 0,47$  e  $1,89 \pm 0,29$  g para as mesmas dosagens realizadas com a fisalina B. Os percentuais para inibição do crescimento tumoral foram de 44,44 % na dose de 10 mg/kg e 50,87% na dose de 25 mg/kg para a fisalina B, enquanto a fisalina D inibiu em 45,61 e 44,73% nas mesmas doses respectivamente (Figura 14 e Tabela 10). Dessa maneira, não ocorreu nenhuma diferença significativa entre as fisalinas nas diferentes doses testadas. Já o 5 fluorouracil (5-FU, 25mg/kg), induziu uma inibição tumoral de 71,05% no tumor no sarcoma 180 (Tabela 10).

Após o tratamento com as fisalinas B e D (25 mg/kg), o peso dos rins estava reduzido significativamente ( $p < 0.05$ ), enquanto o peso dos fígados e baços não mostrou diferença em nenhuma das doses utilizadas (10 e 25mg/kg) (Tabela 10). Porém com o 5-Fluorouracil todos os pesos dos órgãos foram reduzidos significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (Tabela 10).

**Tabela 10** - Determinação dos pesos dos órgãos (fígado, rins e baço) e do percentual de inibição tumoral dos animais tratados com o 5-Fluorouracil (25 mg/kg), fisalinas: B e D (10 e 25 mg/kg), durante 7 dias consecutivos (n = 10). (<sup>a</sup> representa p < 0,05).

<b>Droga</b>	<b>Dose (mg/Kg/dia)</b>	<b>Fígado (X ± E.P.M) (g)</b>	<b>Baço (X ± E.P.M) (g)</b>	<b>Rins (X ± E.P.M) (g)</b>	<b>Tumor (X ± E.P.M) (g)</b>	<b>Inibição Tumoral (%)</b>	<b>N</b>
<b>C (*)</b>	-	2,00 ± 0,13	0,29 ± 0,02	0,42 ± 0,02	3,42 ± 0,24	-	10
<b>5-FU</b>	25	1,53 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,25 <sup>a</sup>	71,05	8
<b>Fisalina B</b>	10	1,87 ± 0,08	0,28 ± 0,03	0,40 ± 0,01	1,90 ± 0,40 <sup>a</sup>	44,44	11
	25	1,81 ± 0,09	0,25 ± 0,03	0,31 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,68 ± 0,24 <sup>a</sup>	50,87	9
<b>Fisalina D</b>	10	1,89 ± 0,09	0,32 ± 0,04	0,40 ± 0,02	1,86 ± 0,47 <sup>a</sup>	45,61	11
	25	1,76 ± 0,12	0,29 ± 0,02	0,35 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,89 ± 0,29 <sup>a</sup>	44,73	8

Os dados estão apresentados como a média ± erro padrão da media S.E.M. para um n de experimentos. Diferenças significantes para o grupo controle foram avaliadas por ANOVA seguido por Student Newman Keuls: um, p < 0,05. (\*) controle negativo.

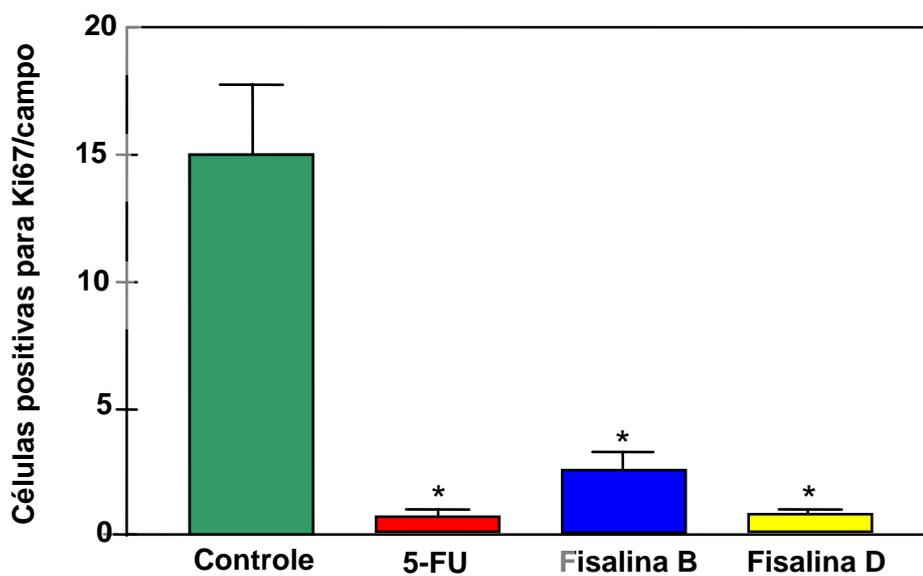


**Figura 14** - Determinação do volume tumoral nos animais inoculados com o tumor Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento com 5-Fluorouracil (25 mg/kg), faisalinas B e D (10 e 25mg/kg), Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de dez animais. (\* representa  $p < 0,05$ ) comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

#### 4.7 Avaliação da atividade proliferativa pelo método imunohistoquímico com Ki67

Ki67 é um marcador para proliferação de células tumorais. Utilizou-se este marcador para análise em tumores removidos dos animais controle, tratados com 5-FU (25 mg/kg), fialina B (25 mg/kg) e fialina D (25 mg/kg), os quais foram sacrificados no 10º dia após o início do experimento.

Observou-se uma marcação nuclear eficaz e com boa preservação de detalhes morfológicos em todas as secções de tumores marcados com o anticorpo Ki67. Em algumas das amostras examinadas, foi possível destacar células em mitose, além de uma positividade citoplasmática forte. A Figura 15 mostra a quantidade de células positivas marcadas com Ki67, onde podemos observar um número relativo de células tumorais positivas para Ki67. Foi observado que os tumores analisados dos grupos tratados com 5-FU, fialina B e fialina D, apresentaram uma quantidade de células positivas correspondentes a 1,2; 3,0 e 1,8 respectivamente. Esse percentual foi substancialmente menor quando comparado com os tumores do grupo controle, tendo a fialina D percentual semelhante ao 5-FU, não havendo diferença significativa ( $p < 0.05$ ).



**Figura 15** – Detecção do anticorpo Ki-67 sobre as células tumorais de Sarcoma 180 tratadas com 5-FU, faisalina B e faisalina D (25 mg/kg/dia) durante 7 dias de tratamento. Os valores correspondem à média ± E.P.M. da contagem de células Ki67 positivas de 4-6 campos/ tumor. a,  $p < 0,05$  comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

#### 4.8 Avaliação histopatológica de órgãos e tumor

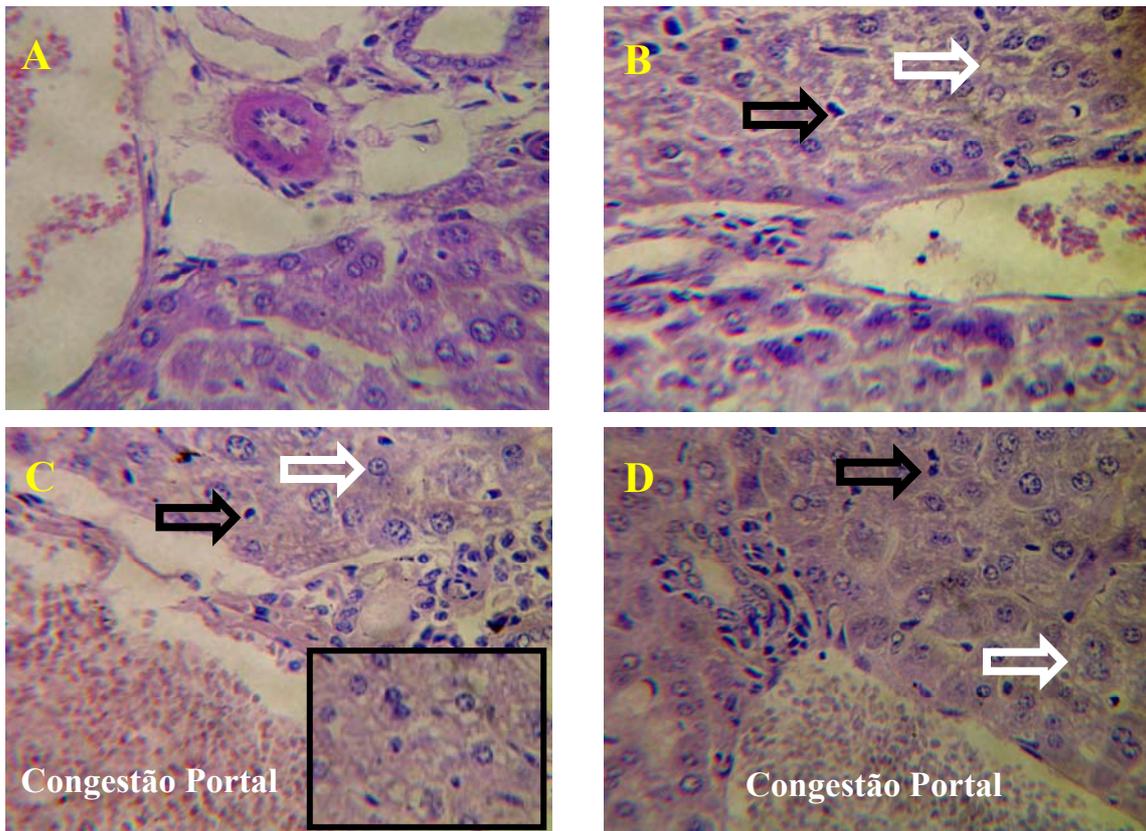
As análises histopatológicas dos rins de animais tratados com as fisalinas B e D mostraram discretas alterações no epitélio tubular proximal, com preservação da estrutura glomerular. As alterações epiteliais observadas são sugestivas de reversibilidade, não indicando quadro de nefrotoxicidade. Por outro lado, a análise histopatológica do fígado demonstrou moderada toxicidade frente as fisalinas em ambas as doses, sendo que a B (Figura 16 C) apresentou mudanças histológicas mais significativas quando comparadas ao tratamento com a fisalina D em ambas as doses. Tais aspectos histológicos incluíram hiperplasia das células de Kupffer, áreas de congestão venosa centrolobular, infiltrado local de células inflamatórias crônicas, intensa tumefação turva de hepatócitos, graus variados de esteatose em microgotas e hemorragia sinusoidal (Figura 16 D).

Em relação aos animais tratados com 5-Fluorouracil (5-FU), resultou em intensa diminuição dos pesos do fígado, baço e rim ( $p < 0.05$ ; Figura. 16 B e Tabela 10). As análises histopatológicas realizadas nos rins após tratamento com 5-FU apresentaram discretas áreas de tumefação turva do epitélio tubular. Enquanto no fígado foram observadas: congestão da veia portal e da veia centrolobular, tumefação turva dos hepatócitos (indicando intenso trabalho do fígado para a metabolização da droga), hiperplasia das células de Kupffer, além de muitos focos inflamatórios. Estas alterações indicam discreta hepatotoxicidade, porém de natureza reversível.

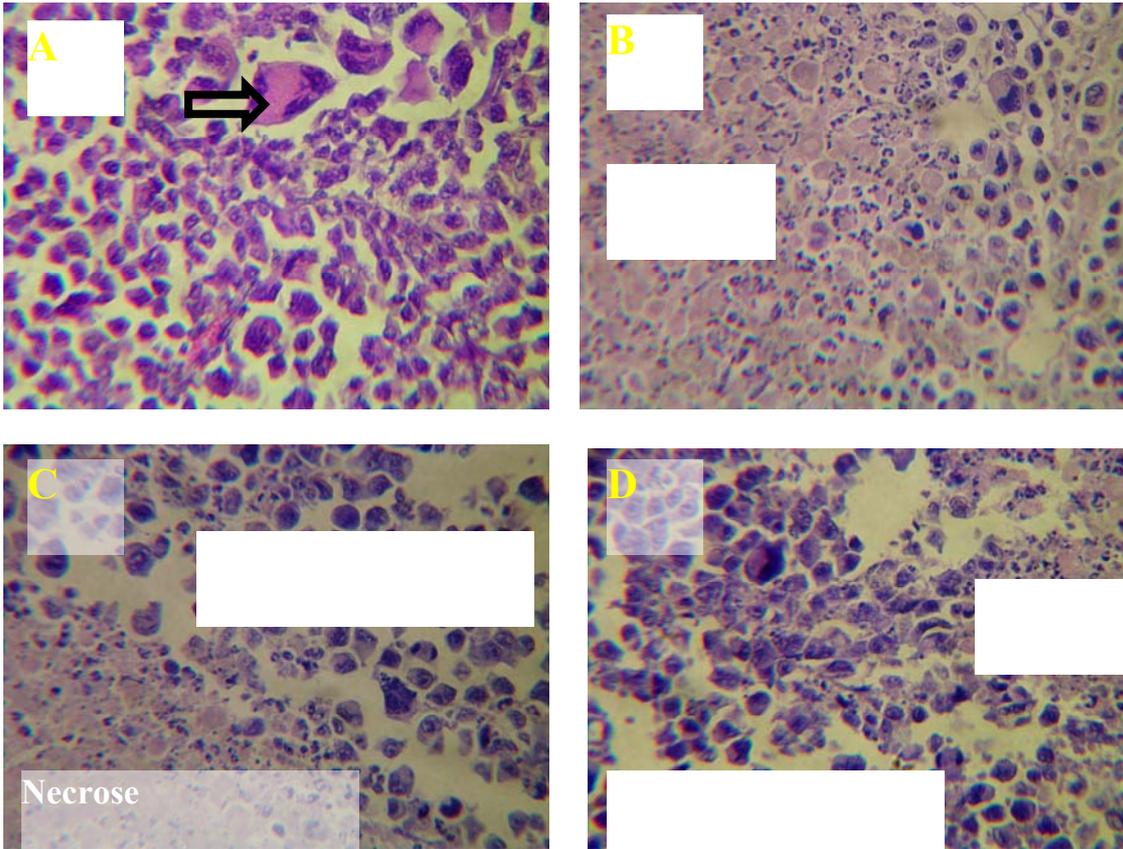
Os animais do grupo controle apresentaram o rim com estrutura glomerular preservada e sem maiores peculiaridades. Em relação ao fígado foram observados focos inflamatórios, trechos com tumefação turva dos hepatócitos e hiperplasia das células de Kupffer.

As análises histopatológicas dos tumores retirados de camundongos do grupo controle negativo mostraram neoplasia constituída por células redondas e poligonais, com núcleos hipercromáticos, exibindo por vezes binucleação e graus

variados de pleomorfismo celular e nuclear (Figura 17 C). Foram visualizadas mitoses, invasão muscular. Nos tumores dos animais tratados com 5-FU, fisalinas B e D as áreas de necrose de coagulação eram mais extensas do que as observadas no grupo controle, demonstrando morte celular (Figuras 17 B, 17 C e 17 D).



**Figura 16** – Histopatologia dos fígados de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180, tratados com: (A) Grupo controle; (B) Grupo tratado com 5-FU (25 mg/kg); (C) Grupo tratado com Fisalina B (25 mg/kg); (D) Grupo tratado com Fisalina D (25 mg/kg). Esteatose microvesicular induzida pelo tratamento com fisalina B, mostrado no detalhe da Fig C. As setas em preto mostram hiperplasia das células de Kupffer. As setas em branco apresentam degeneração de hepatócitos (40X).



**Figura 17** – Histopatologia de células tumorais de Sarcoma 180 removidas no 10º dia após tratamento com (A) Tumor não tratado, (B) tratamento com 5-FU (25 mg/kg/dia), (C) tratado com fisalina B 25 mg/kg/dia) e (D) camundongos tratados com fisalina D (25 mg/kg/dia).

## 5 DISCUSSÃO

As plantas têm sido a principal fonte altamente efetiva na obtenção de drogas para o tratamento de muitas formas de câncer. Os compostos freqüentemente isolados de plantas podem não servir como as drogas, porém servem de caminhos para o desenvolvimento de novos agentes com potencial terapêutico. Como novas tecnologias foram desenvolvidas, alguns dos agentes que falharam precocemente em estudos clínicos tem se tornado alvos de interesse na busca de renovadas ferramentas farmacológicas (CRAGG; NEWMAN, 2005).

A habilidade para ligar os agentes a carreadores de moléculas dirigidas para tumores específicos apresenta-se como promessa altamente efetiva de alvos de produtos naturais citotóxicos para os tumores tentando evitar os possíveis efeitos colaterais tóxicos em tecidos saudáveis. Com a rápida identificação de novas proteínas, as quais têm significativo efeito regulatório no ciclo de progressão de células tumorais, e a conversão destas nos alvos para *screening*, moléculas isoladas de plantas e outros organismos naturais estão provando ser importantes fontes de novos inibidores da ação destas proteínas chave, e possuem o potencial para desenvolvimento de agentes anticâncer seletivos (CRAGG; NEWMAN 2005).

A *Physalis angulata* é uma erva amplamente distribuída ao longo do Brasil, possuindo grande valor popular devido a suas propriedades medicinais informadas, inclusive atividade de anticâncer (CHIANG et al., 1992a, 1992b; TOMASSINI et al., 2000; LORENZI et al., 2002; SOARES et al., 2003; WU et al., 2004). Seus extratos tem sido objeto de diversos estudos biológicos como antimicrobiano, antiinflamatório, imunomoduladora, antitumoral, tripanossomicida, antihepatoma, antinociceptivo etc. (TOMASSINI et al., 2000; CHOI; HWANG, 2003; WU et al., 2004). Este amplo espectro de atividades é sem dúvida uma consequência da grande diversidade estrutural e funcionalização apresentada pelos vitaesteróides, lactonas esteróidais as quais são consideradas marcadores quimiotaxonômico, não só do gênero *Physalis*, como de outros gêneros da família Solanaceae (CÁRDENAS et al., 1994). O reputado potencial

biológico apresentado pelos extratos de *P. angulata* Lin. tem sido atribuído as fisalinas, constituintes químicos majoritários.

As lactonas sesquiterpênicas esteroidais são grupos de metabólitos secundários, que apresentam potencial para utilização na medicina, evidenciando-se as atividades citotóxica e antitumoral, antibacteriana, antiinflamatória, antimalárica, antifúngica, além de efeitos no sistema nervoso central e cardiovascular (RÜNGELER et al., 1999). Neste grupo de substâncias destacam-se os vitaesteróides. Os vitaesteróides são substâncias que reproduzem o esqueleto intacto ou modificado do ergostano, possuindo função lactônica no carbono C-26 (VASINA, et al., 1986; PURUSHOTHAMAN et al., 1988). Estes derivados do ergostano são constituintes polioxigenados presentes, preponderantemente, nas espécies de Solanaceae (TOMASSINI et al., 2000).

O presente trabalho avaliou, inicialmente, a citotoxicidade dos extratos de *P. angulata*, num painel de cinco linhagens de células tumorais. Essa determinação tem se mostrado eficaz na descoberta de novos agentes antitumorais (CRAGG; NEWMAN, 2005). A análise citotóxica *in vitro* tem provado ser eficiente na prospecção de potentes agentes antitumorais, entretanto alguns compostos somente tornam-se ativos após formação de metabólitos, sendo, portanto efetivos após testes *in vivo*, a exemplo da ciclofosfamida, que mostra atividade após ser transformada em metabólitos alquilantes ativos pelas enzimas microssomais do fígado (DOLFINI et al., 1973; CHING et al., 1991).

Nesse estudo a determinação da atividade das enzimas mitocondriais foi utilizada como ferramenta para se determinar a viabilidade celular, sendo um ótimo modelo para avaliar o potencial citotóxico de substâncias (GUANGJUN et al., 2002). A determinação do potencial citotóxico foi avaliada em dois extratos da *P. angulata*, sendo um hexânico e outro etanólico. O extrato hexânico apresentou baixa citotoxicidade frente às linhagens estudadas, cuja  $CI_{50}$  foi  $> 30 \mu\text{g/mL}$ , por outro lado o extrato etanólico apresentou uma  $CI_{50} < 8,0 \mu\text{g/mL}$  em todas as linhagens celulares, o que determinou o seu elevado potencial citotóxico (Tabela 6). Uma vez que foi considerado extrato com potencial citotóxico, aquele que apresentou  $CI_{50}$  menor que 20

µg/mL, em mais de duas linhagens estudadas (FÁVARO, 1990), foi priorizado o estudo químico e farmacológico do extrato etanólico (Fluxograma 3).

Os resultados iniciais obtidos em nossa pesquisa concordam com dados prontamente publicados para esta espécie, cujos principais fitocompostos isolados foram fisalinas B, D, E e F descritos por Row et al. (1978a, 1978b) em seu trabalho “New physalis from *Physalis angulata* and *Physalis lancifolia*. Part1 Physalins from *Physalis angulata* and *Physalis lancifolia*.” Inicialmente, Chiang et al. (1992a, 1992b), demonstraram que o extrato etanólico de *P. angulata* Lin. possui atividade citotóxica em várias linhagens leucêmicas, incluindo a HL-60 utilizada no presente estudo, bem como contra tumores sólidos, cujas  $CI_{50}$  variam de 3,63 a 10 µg/mL nas células HeLa (útero) e Calu (pulmão), respectivamente. Recentemente, Wu et al. (2004), demonstraram que o extrato etanólico de *P. angulata* e *P. peruviana* inibiram o crescimento de linhagens de células tumorais de fígado humano, com  $CI_{50}$  variando de 10,67 a 41,60 µg/mL para Hep G2 e PLC/PRF/5, respectivamente.

Estudos prévios já tinham demonstrado que fisalina B (PA-2), mas não fisalina D (PA-1), foi citotóxica para um painel de células tumorais em cultura (CHIANG et al., 1992a, 1992b). Em nosso estudo, foi mostrado que as fisalinas B, D, F, 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B hidrogenada foram citotóxicas de maneira concentração dependente, principalmente com as fisalinas B, D e F, frente a um painel de 4 linhagens celulares (CEM, HL-60, HCT-8, B16).

Posteriormente as fisalinas B e D foram avaliadas em mais 5 linhagens celulares, (K-562, MCF-7, MDA-MB 231, MDA-MB 435, PC-3), tendo identificado que a D foi a mais citotóxica frente as linhagens estudadas, não tendo porém demonstrado citotoxicidade para a PC-3.

As propriedades citotóxicas e antitumorais das fisalinas e vitanolídeos tem sido intensivamente investigadas por: Kupchan et al. (1969); Tomassini et al. (2000); Minguzzi et al. (2002); Veras et al. (2004). Vários estudos têm demonstrado que a presença da dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 no anel A (Figura 3) é

fundamental para essas ações (TOMASSINI et al., 2000; VERAS et al., 2004). Esse fato corrobora com os nossos achados citotóxicos, uma vez que as fisalinas B, D, F e 5 diidrofisalina B foram citotóxicas, tendo as mesmas em sua estrutura a presença da dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 do anel A (Tabela 4).

Por outro lado, com o intuito de determinar a importância da dupla ligação presente entre os carbonos C-2 e C-3 contidos no anel A da estrutura (Tabela 4), foi realizada uma reação de hidrogenação a partir do composto 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B originando um componente semi-sintético 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B hidrogenada, que não apresentava mais a dupla ligação (VERAS et al., 2004; TOMASSINI et al., 2000). O composto semi-sintético obtido mostrou-se menos ativo frente às linhagens das células tumorais estudadas, quando comparado ao composto original (Tabela 8). Este resultado mostra-se de acordo com os achados de Makino et al. (1995), demonstraram a ausência de atividade antitumoral da fisalina L por não possuir este pré-requisito estrutural (Fluxograma 2).

Vale ressaltar, que apesar da fisalina E possuir uma dupla ligação no anel A entre os carbonos 2 e 3 (Figura 3 e Tabelas 7 e 8), não exibiu potencial citotóxico. Isso nos mostra que a presença da dupla ligação contida entre os carbonos C-2 e C-3 do anel A da estrutura das fisalinas (Figura 3), realmente possui importância para o potencial citotóxico das substâncias. Porém a presença da dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 do anel A na estrutura das fisalinas não deve ser considerada a única evidência primordial envolvida com o potencial citotóxico destes compostos.

Esse fato foi confirmado por Antoun et al. (1981), quando demonstrou que o anel epóxido localizado entre os carbonos 5 e 6 das fisalinas também era responsável por aumentar a atividade antitumoral. Isto pôde ser observado na fisalina F (Tabela 4), a qual foi potencialmente citotóxica, cuja  $CI_{50}$  foi  $< 1,5\mu M$  em quatro linhagens celulares testadas. Além disso, a fisalina D mostrou-se a mais citotóxica quando comparada as outras fisalinas na linhagens: CEM, HL-60, HCT-8 e B-16 (Tabela 7), apresentando  $CI_{50} < 1,0\mu M$ , tendo na sua estrutura a presença de grupos hidroxilas nos carbonos C-5 e C-6 sendo possivelmente um fator determinante para seu elevado

potencial citotóxico, mostrando-nos novamente que não só a dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 é fundamental.

Estudos anteriores acerca da relação estrutura-atividade antileucêmica das físalinas B (PA-2) e F (PA-3) sugerem que a primeira seria menos ativa, e que isso poderia ser em decorrência da presença da dupla ligação entre C-5 e C-6 (CHIANG et al., 1992b), esses achados refletem aos encontrados por nós, já que a físalina F foi mais citotóxica quando comparada à físalina B nas linhagens leucêmicas CEM, HL-60, isso decorre possivelmente pela presença de um grupamento epóxido entre os carbonos C-5 e C-6 na estrutura da físalina F (Tabela 4).

Nesse estudo comparativo, podemos verificar que a presença do grupamento epóxido entre os carbonos C-5 e C-6 da estrutura da físalina F mostrou ser mais efetivo do que a dupla ligação apresentada pela físalina B nos respectivos carbonos, sugerindo que o epóxido presente na físalina F é uma espécie eletrofílica capaz de ligar-se de forma irreversível a proteínas e ácidos nucleicos nas células podendo contribuir para a morte celular (LEE; HOUGHTON, 2005).

De fato a físalina B também foi citotóxica, pois, a dupla ligação presente nesses carbonos, podem ser um possível sítio de oxidação formando espécies reativas e epóxidos eletrofílicos (GIBSON; SKETT, 2001). Enquanto, a físalina D que foi tão citotóxica quanto a F possui dois grupamentos hidroxilas entre nos carbonos C-5 e C-6. Tais grupamentos são considerados potencialmente reativos e tóxicos quando na forma de radicais livres, sendo causadores de danos em estruturas celulares (SLATER et al., 1995).

Na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos na citotoxicidade das físalinas B e D, testamos esses compostos no desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço e em eritrócitos de camundongos. O ensaio com os ovos de ouriço do mar, de metodologia bastante simplificada, é um modelo alternativo de um sistema celular que dispensa qualquer tipo de meio de cultura especial ou aparelhagem sofisticada, amplamente utilizado no estudo de drogas com efeitos citotóxicos, teratogênicos e antitumoral (JACOBS; WILSON, 1986). Assim como ocorre em células tumorais, os

ovos dividem-se rapidamente e apresentam uma sensibilidade seletiva a certos tipos de drogas, Munro et al. (1987), além de uma série de peculiaridades no seu ciclo de desenvolvimento que o torna bastante elucidativo no estudo de drogas com potencial antitumoral. De acordo com Munro et al. (1987), compostos que inibem a mitose em ovos de ouriço do mar devem ser, a seguir, estudados em teste *in vivo*, pois os resultados com esse bioensaio são bastante confiáveis. A inibição da divisão celular pode estar relacionada a vários eventos envolvidos no processo, como síntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA), síntese protéica e polimerização de microtúbulos. No bioensaio do ouriço do mar, esses processos podem muitas vezes serem analisados individualmente (FUSETANI, 1987).

Compostos que inibem a síntese de DNA podem mostrar seus efeitos desde a primeira clivagem, quando há um pico de produção de DNA (HAMMEL et al., 1995). No entanto, também foi observado que, em alguns casos, ovos tratados com drogas com este específico mecanismo de ação continuam a se dividir umas oito ou nove vezes antes de morrer. Os efeitos de inibidores da síntese de DNA foram descritos como retardo no desenvolvimento e o surgimento de blastômeros com tamanhos variados numa única célula (FUSETANI, 1987).

A síntese de RNA, por sua vez, não ocorre nas primeiras divisões dessas células, sendo todo o RNA utilizado na síntese protéica proveniente do gameta feminino (BRANDHORST, 1985). Drogas como a actinomicina D, que bloqueiam este processo somente inibem o desenvolvimento embrionário do ouriço a partir do estágio mórula, quando novo RNA é sintetizado (FUSETANI, 1987). A actinomicina D liga-se a radicais de guanina no DNA e bloqueia o movimento da RNA polimerase, impedindo, assim, a transcrição do DNA (CHABNER et al., 2001).

Compostos que atuam no fuso mitótico da célula inibem, tão logo, a primeira clivagem dos ovos. O tratamento com citocalasina B, um inibidor da polimerização dos microfilamentos, induz ao aparecimento de embriões unicelulares polinucleados. Manchas circulares esbranquiçadas, correspondentes à região nuclear, interrompem a homogeneidade do citoplasma e aparecem duplicadas, quadruplicadas ou em maior número numa única célula, padrão que pode ser facilmente observado ao microscópio

óptico. Isso sugere que houve a duplicação do núcleo sem a divisão do citoplasma (FUSETANI, 1987).

Pela observação ao microscópio dos ovos tratados com as fisalinas B, D, E, F, 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetrahidrofisalina B, foi possível constatar que estes se apresentavam com citoplasma homogêneo, sendo a inibição observada a partir da 1ª primeira divisão com principalmente com fisalina D e a partir da 3ª terceira divisão inicialmente com a fisalina B, e semelhantemente com as fisalinas D e F (Figuras 6, 7 e Tabela 9). Este padrão está de acordo com Fusetani (1987), o qual sugere que a fisalina D poderá estar agindo na polimerização de microtúbulos ou na síntese de DNA, um vez que, interrompeu o desenvolvimento embrionário desde a primeira divisão celular. Enquanto as fisalinas B e F poderão estar interferindo na síntese de ácidos nucleicos (RNA e DNA) por estarem interferindo na terceira divisão do desenvolvimento embrionário.

Para verificar se a citotoxicidade às células tumorais estava envolvida com a lise da membrana plasmática, um ensaio de atividade hemolítica foi realizado com eritrócitos de camundongos, os quais possuem grande semelhança com os eritrócitos humanos, principalmente quanto à sensibilidade (COSTA-LOTUFO et al., 2002). A ausência de atividade hemolítica foi observada para todas as fisalinas testadas, na concentração de 200  $\mu$ g/mL, sugerindo possivelmente que o mecanismo de atividade citotóxica desempenhado por estas substâncias, não esteja relacionado à indução de dano na membrana plasmática, mais sim devido a sua possível interferência com o DNA.

Essa interferência poderia estar levando ao fenômeno de morte celular, o chamado processo apoptótico, o qual é de fundamental importância para a homeostase em vários sistemas biológicos, desempenhando um papel essencial na regulação da resposta as drogas citotóxicas e na eliminação das células senescentes. A apoptose é identificada por uma série de alterações morfológicas na célula: diminuição do volume celular, perda de contato, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e alteração no potencial transmembrânico da mitocôndria (NAKAMURA et al., 2002; SIRAKI et al., 2002; YANG et al., 2003, KUMMAR et al., 2005). Drogas que induzem morte

celular por apoptose em linhagens de células tumorais podem ser úteis na quimioterapia (ZAMAI et al., 2001; BRADY 2004). A necrose ocorre por uma ação rápida da droga na célula e é caracterizada pelo aumento do volume celular inicial e perda da integridade da membrana plasmática, Darzynkiewicz et al. (1992), sendo freqüentemente atribuída a diversas perturbações metabólicas ou mesmo oriunda de injúrias mecânicas, onde há uma rápida desestabilização da membrana plasmática, sendo relacionada com a resposta inflamatória sem atentar à sua função fisiológica.

Assim, a viabilidade celular por integridade da membrana plasmática foi verificada pela incorporação do brometo de etídio e laranja de acridina, os quais foram analisados em microscopia de fluorescência, onde, neste caso o brometo de etídio não consegue atravessar a membrana intacta, penetrando apenas em células que apresentam dano parcial ou total na membrana celular, característico respectivamente de apoptose tardia e necrose, ligando-se ao DNA e emitindo fluorescência vermelha após incubação das células HL-60 com as fisalinas B, D, F e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B. A laranja de acridina penetra na membrana plasmática mesmo que intacta, corando principalmente células normais e em apoptose inicial e parcialmente células em apoptose tardia com fluorescência verde.

Desse modo, o tratamento de células da linhagem leucêmica HL-60 com as fisalinas B, D, F e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B nas concentrações de 5, 10 e 15  $\mu$ g/mL levaram a um aumento no número de células em apoptose inicial, necrose e em menor magnitude, apoptose tardia. Esses dados enfatizam os resultados previamente descritos por Ueda et al. (2002); Jin et al. (2002), os quais sugerem que algumas substâncias podem agir como oxidantes e pró-oxidantes indutores de apoptose e/ou necrose. De forma semelhante, as fisalinas: B, D, F e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B, podem estar agindo. Enfim, contínuos esforços têm sido desenvolvidos para determinar se as fisalinas induzem a morte celular por apoptose ou necrose já que, 50  $\mu$ g/mL de extrato etanólico de *Physalis peruviana* e da *P. angulata*, após 48 horas de incubação com as células Hep G2 humanas, induziram apoptose (CHIANG et al., 1992a, 1992b; ISMAIL; ALAM 2001; WU et al., 2004).

Em decorrência dos achados previamente descritos por Chiang et al. (1992a, 1992b); Ismail e Alam (2001); Wu et al. (2004), assim como também Ueda et al. (2002); Jin et al. (2002) pode-se sugerir que a mitocôndria desempenha um grande papel no processo apoptótico induzida pelo estresse oxidativo, especulando-se ainda que o efeito pró-apoptótico de alguns compostos, como as fisalinas, por exemplo, podem Ter como alvo a mitocôndria, visto que os esteróides (vitaesteróides), em oposição aos flavonóides podem afetar a integridade mitocondrial por modular a homeostase do cálcio e assim induzirem a apoptose (ISHIGE et al., 2001).

O ensaio de viabilidade celular por exclusão pelo azul de tripan é um ensaio que quantifica as células capazes de drenar o corante ácido azul de tripan para fora da célula em contraposição àquelas que não possuem essa capacidade. A absorção deste corante é um forte indicativo de dano na membrana plasmática que culmina na morte celular e fornece uma resposta sobre a viabilidade através da comparação do padrão de crescimento das células tratadas e não tratadas pela contagem diferencial de células viáveis e não viáveis (CHAROENPORNSOOK et al., 1998; HYNES et al., 2003; MINERVINI et al., 2004).

Os resultados verificados no teste de exclusão por azul de tripan corroboram satisfatoriamente com aqueles encontrados no ensaio do MTT. A partir das  $CI_{50}$  encontradas em células HL-60 foram utilizadas as concentrações (5, 10 e 15  $\mu\text{g/mL}$ ) para as fisalinas B, D, F e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B. Foi observado uma redução significativa na contagem de células viáveis, para as concentrações anteriormente citadas. Sendo este efeito bem pronunciado para a fisalina D (15  $\mu\text{g/mL}$ ). Sabendo que o teste de exclusão por azul de tripan avalia o efeito direto de drogas sobre as linhagens celulares em estudo, enquanto o teste do MTT analisa o metabolismo celular de forma colorimétrica, nossos achados mostraram que a fisalina D foi a mais ativa tanto no teste do MTT quanto no teste de exclusão pelo azul de tripan, apresentando as menores  $CI_{50}$ .

Todavia, a análise realizada em células não viáveis no teste de exclusão por azul de tripan, não foram observadas muitas alterações, sendo que estas células foram afetadas apenas na maior concentração 15 µg/mL para as fisalinas B (29.4 µM), D (27.5 µM), F (28.5 µM), 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B (26.2 µM). As  $CI_{50}$  determinadas para cada uma das frações incubadas com as células HL-60 por 72 horas, pelo teste do MTT foram de 2 a 4 vezes menores que aquelas obtidas com a incubação por 24 horas (dados não mostrados). Isso demonstra que o aumento do tempo de contato com as frações intensifica o efeito tóxico.

Na busca de reforçar os resultados *in vitro* foi realizado o teste de atividade antitumoral *in vivo*, uma vez que os compostos citotóxicos *in vitro* podem ou não ser ativos *in vivo*.

Apesar de muitos trabalhos terem focado o potencial anticâncer de *Physalis angulata* Lin. e de seus fitocompostos isolados, poucos são os relatos de trabalhos científicos, relacionados a esta espécie vegetal que demonstrem atividade *in vivo* utilizando tumores sólidos. Neste trabalho, foi avaliada a atividade antitumoral das fisalinas B e D em camundongos os quais foram inoculados com células tumorais de sarcoma 180. O Sarcoma 180 é um tumor de origem murina e uma das linhagens celulares mais frequentemente utilizadas em pesquisas *in vivo* para atividade antitumoral (ITO et al., 1997; LEE et al., 2003).

Tanto a fisalina B quanto a fisalina D inibiram o crescimento celular, tendo a fisalina B regredido o tumor em 50.87% na dose de 25 mg/Kg e a fisalina D na mesma dose em 44,73%, não tendo demonstrado diferença entre eles. A atividade antitumoral *in vivo* para fisalina B foi demonstrada inicialmente em modelos de leucemia *in vivo* (ANTOUN et al., 1981; CHIANG et al., 1992a). A atividade antitumoral foi constatada também nos nossos resultados com o sarcoma 180. Porém, este é o primeiro relato da atividade antitumoral *in vivo* para a fisalina D, onde seu potencial antitumoral foi demonstrado, porém não de maneira dose dependente. Vale enfatizar, que a atividade citotóxica obtida com as fisalinas B e D frente às linhagens celulares em ensaios *in vitro* mostraram-se presentes com os resultados obtidos nos ensaios de atividade antitumoral *in vivo*.

Além disso, alguns achados foram identificados através do ensaio imunohistoquímico, onde utilizou um anticorpo de proteínas nucleares de células em proliferação, a determinação da taxa de proliferação das células tumorais foi quantificada. O anticorpo monoclonal Ki-67, descrito por Gerdes et al. (1983), identifica um antígeno nuclear associado com as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular. Esta molécula é expressa ao longo de todo o ciclo celular, menos em G0 e início de G1 (GERDES et al.,1983). Assim, resultados obtidos pela marcação com Ki67 mostraram que as atividades antitumorais de ambas as fisalinas B e D estão associadas com uma redução na taxa de proliferação tumoral, possivelmente interferindo em uma das fases G1, S, G2 e M do ciclo celular. É importante destacar que esta interferência no ciclo celular, causado pelas fisalinas foi semelhante aos achados de inibição de proliferação descritos por Wu et al. (2004), ocasião na qual foi demonstrada que após tratamento de 48 horas com o extrato etanólico da *P. peruviana*, células da linhagem HepG2 acumulavam-se na fase G1 do ciclo, enquanto uma diminuição no número de células na fase S foi observada.

As análises histopatológicas dos órgãos removidos de animais tratados sugerem que o fígado pode ser considerado como alvo em potencial da toxicidade das fisalinas. As alterações hepáticas observadas após o tratamento com as fisalinas B e D foram analisadas e consideradas como modificações de caráter reversível (McGEE, 1992; SCHEUER et al., 2000; KUMMAR et al., 2004); A fisalina B mostrou tendência a uma maior toxicidade, pelo fato de promover esteatose microvesicular acompanhada por tumefação turva de hepatócitos, enquanto a fisalina D mostrou alterações hepáticas semelhantes, porém em menor intensidade que os efeitos apresentados pela fisalina B. Sugere-se que essa indução do dano causado pela hepatotoxicidade intrínseca *in vivo* ocorre quando é considerada a quantidade da dose administrada. A remoção das drogas ou ajuste na dosagem normalmente poderá conduzir a uma melhora rápida (SCHEUER et al., 2000). Além disso, os animais tratados com 5-FU também apresentaram hiperplasia das células de Kupffer, o que sugere a toxicidade da droga (KUMMAR et al., 2004). Muitos achados em biópsias sugerem que as drogas devem ser consideradas como uma possível causa de qualquer lesão *in vivo* (SCHEUER et al., 2000).

As observações histopatológicas dos rins de animais tratados com as fisalinas B e D mostraram discretas alterações no epitélio tubular proximal, com preservação da estrutura glomerular. As alterações epiteliais observadas são reversíveis não indicando quadro de nefrotoxicidade. Observamos desse modo, a boa tolerabilidade na utilização das fisalinas.

Desta forma, os dados oriundos deste estudo (*in vivo*) reforçam e ratificam o potencial anticâncer das fisalinas B e D estudadas. Além disso, os ensaios *in vitro* também comprovaram o enorme potencial citotóxico principalmente das fisalinas: B, D e F, onde o mecanismo de ação tóxico apesar de não elucidado neste estudo parece estar relacionado com a indução de apoptose, segundo achados de Wu et al. (2004). No entanto pode-se correlacionar a estrutura atividade das fisalinas: B, D, E, F, 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-5,6-diidrofisalina B e 5- $\alpha$ -etóxi-6- $\beta$ -hidróxi-2,3,5,6-tetraidrofisalina B, onde a presença da dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 do anel A parece ser um fator preponderante para a atividade das fisalinas (B e D principalmente) segundo Tomassini et al. (2000) e Veras et al. (2004).

Por tudo isso, estudos mais detalhados são necessários para elucidar o mecanismo de ação das fisalinas bem como estudos de toxicidade mais detalhados como, por exemplo, ensaios para determinação de genotoxicidade. Sendo este trabalho apenas uma pequena contribuição na incansável busca de novas moléculas oriundas de fontes naturais e que possam ser utilizadas de forma segura como alternativa terapêutica no tratamento do câncer e muitas outras patologias.

## 6 CONCLUSÃO

As lactonas sesquiterpênicas esteroidais isoladas da *P. angulata* Lin. e denominadas de fisalinas mostraram elevada atividade citotóxica (para CEM, HL-60, K-562, HCT-8, MCF-7, MDA-MB 231, MDA-MB 435, PC-3 e B-16), em experimentos *in vitro*, sendo as fisalinas B, D e F as mais ativas. Não foi observada atividade hemolítica para as fisalinas B e D, tendo as mesmas demonstrado potencial antimitótico em ovos de ouriço. As fisalinas, principalmente a B e a D comportaram-se como substâncias pró-apoptóticas. No ensaio *in vivo* para determinação da atividade antitumoral no Sarcoma 180, as fisalinas B e D demonstraram interessante atividade antitumoral, sendo maior a atividade da fisalina D frente a fisalina B.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTOUN, M. D.; ABRAMSON, D.; TYSON, R. L.; CHANG, C. J.; MCLAUGHLIN, J. L.; PECK, G.; CASSADY, J. M. Potential antitumor agents. XVII. Physalin B and 25-26-epihydrophysalin C from *Witheringia coccoloboides*. **J. Nat. Prod.**, v. 44, n. 5, p. 579-585, Sept./Oct. 1981.

ARANTES, R. M.; LOURENSSSEN, S.; MACHADO, C. R.; BLENNERHASSETT, M. G. Early damage of sympathetic neurons after co-culture with macrophages: a model of neuronal injury in vitro. **Neuroreport**, v. 11, n. 1, p. 177-181, Jan. 2000.

BASEY, K.; MCGAW, B. A.; WOOLLEY, J. G. Phygrine, an alkaloid from *Physalis* species. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4173-4176, 1992.

BERRIDGE, M. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays. That use tetrazolium salts. **Biochemical**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BIOAGENCY – **Apoptose & Inflamação – catálogos 2004**. Disponível em: <[http://www.bioagency.com.br/catalogos/09\\_apoptose\\_2004.pdf](http://www.bioagency.com.br/catalogos/09_apoptose_2004.pdf)>. Acesso em: 10 jun. 2005, 16:00.

BLOM, W. M.; DE BONT, H. J.; MEIJERMAN, P. J.; KUPPEN, G. J.; MULDER, J. F.; NAGELKERKE, J. F. Interleukin-2 activated natural killer cells can induce both apoptosis and necrosis in rat hepatocytes. **Hepatology**, v. 29, n. 3, p. 785-792, Mar. 1999.

BRADY H. J. M. **Apoptosis methods and protocols**. New Jersey: Humana Press, 2004.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. 3. ed. Fortaleza: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, (Coleção Mossoroense, v. 42), 1976.

BRANDHORST, P. B. Informational content of the echinoderm egg. In: BROWDER, L. W. (Ed.). **Developmental biology a comprehensive synthesis: oogenesis**. New York: Plenum Press, p. 525-576, 1985.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas da incidência por câncer no Brasil para o ano 2005**. Rio de Janeiro, 2004-2005.

BROWN D. C.; GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki-67:its use in histopathology. **Histopathology**, v. 17, n. 6, p. 489-503, Dec. 1990.

BUTLER; DAWSON. Cell culture. Blackwell, Scientific Publications (1992).

CÁRDENAS, J.; ESQUÍVEL, B.; GUPTA, M.; RAY, A. B.; HAHN, L.R. **Progress in the chemistry of organic natural products**. New York: Springer-Verlag, 1994. v. 63.

CHABNER, B. A.; RYAN, D. P.; PAZ-ARES, L.; GARCIA-CHABONERO, R.; CALABRESI, P. Antineoplastic agents. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.). **Goodman and Gilman`s: the pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 1389-1459.

CHAROENPORNSOOK, K.; FITZPATRICK, J. L.; SMITH, J. E. The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Mycophatologia**, v. 143, n. 2, p. 105–111, 1998.

CHIANG, H.- C.; JAW, S.- M.; CHEN, C.- F.; KAN, W.- S. Antitumor agent, Physalin F from *Physalis angulata* Lin. **Anticancer Res.**, v. 12, n. 3, p. 837-843, May/June 1992a.

CHIANG, H. C.; JAW, S.- M.; CHEN, P.- M. Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells in vitro. **Anticancer Res.**, v. 12, n. 4, p. 1155-1162, 1992b.

CHING, L. M . In vitro methods for screening agents with an indirect mechanism of antitumor activity: xanthenone analogues of flavone acetic acid. **Eur. J. Cancer** , v. 27, n.12, p.1684-1689, 1991.

CHOI, E.- M.; HWANG, J.- K. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 89, n. 1, p. 171-175, Nov. 2003.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. The Cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffi* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1231-1234, Aug. 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.**, v. 60, n. 1, p. 52-60, Jan. 1997.

CRAGG, M.G.; NEWMAN, D. J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Invest.**, v. 17, n. 2, p. 153-163, 1999.

CRAGG, M.G.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, n. ½, p. 72-79, Aug. 2005.

DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M. A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, n. 8, p. 795-808, 1992.

DOLFINI, E. Method for tissue culture evaluation of the cytotoxic activity of drugs active through the formation of metabolites. **Eur. J. Cancer**, v. 9, n. 5, p. 375-378, May 1973.

DONG, Z.; SAIKUMAR, P.; WEINBERG, J. M.; VENKATACHALAM, M. A. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death: involvement of serine but not cysteine proteases. **Am. J. Pathol.**, v. 151, n. 5, p. 1205-1213, Nov. 1997.

DRESCH, R. R.; HAESER, A. S.; LERNER, C.; MOTHES, B.; VOZÁRI-HAMPE, M. M.; HENRIQUES, A. T. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 1, p. 16-22, jan./mar. 2005.

DREWS, J. Drug discovery today-and tomorrow. **Drug Discov. Today**, v. 5, n. 1, p. 2-4, 2000.

DUKE, R. C.; OJCIUS, D. M.; DING, E.; YOUNG, J. Apoptose para o bem e para o mal. **Scientific American**, 1996. Tradução de Antonio Carlos Bandouk. Disponível em <http://intermega.com.br/biotemas/apoptose.htm>. Acesso em: 25 jul. 2005.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 342-348, May 2001.

FÁVARO, O. C. N. Seleção por meio de células KB de substâncias e extratos potencialmente ativos em quimioterapia do câncer. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v.62, n. 3, p. 217-224, 1990.

FALINI, B.; FLENGHI, L.; FAGIOLI, M.; STEIN, H.; SCHWARTING, R.; RICCARDI, C.; MANOCCHIO, I.; PILERI, S.; PELICCI, P. G.; LANFRANCONE, L. Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 37, p.1471-1478, 1989.

FIGUEIREDO, L. C.; CORDEIRO, N. L.; ARRUDA, A. P.; CARVALHO, D. F. M.; RIBEIRO, E. M.; COUTINHO, H. D. M. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.49, n. 3, p.179-183, 2003.

FALINI, B.; CANINO, S.; SACCHI, S.; CIANI, C.; MARTELLI, M. F.; GERDES, J.; STEIN, H.; PILERI, S.; GOBBI, M.; FAGIOLI, M.; MINELLI, O.; FLENGHI, L. Immunohistochemical evaluation of percentage of proliferating cells in pathological bone marrow and peripheral blood samples with the Ki-67 and anti-bromo-deoxyuridine monoclonal antibodies. **Br. J. Haematol.**, v. 69, n. 3, p. 311-320, July 1988.

FUSETANI, N. Marine metabolites which inhibit development of echinoderm embryos. In: SCHEUR, P. J. (Ed.). **Biorganic marine chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1987. p. 175.

GENG, C. X.; ZENG, Z. C.; WANG, J. Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. **World J. Gastroenterol.**, v. 9, n. 4, p. 696-700, Apr. 2003.

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int. J. Cancer**, v. 31, n. 1, p.13-20, Jan. 1983.

GIBSON, G. G.; SKETT, P. Assay for glutathione-S-transferase activity. In: GIBSON, G. G.; SKETT, P.(Ed.). **Introduction to drug metabolism**. London: Nelson Thornes, 2001. p. 47-49,

GUANGJUN, N.; CHAOFANG, J.; YUANLIN, C.; SHENGRONG, S.; BAOLU, Z. Distinct effects of tea catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. **Arc. Biochem. Biophys.**, v. 397, n. 1, p. 84-90, Jan. 2002.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HAMMEL, E. Antimitotic natural products and their interactions with tubulin. **Med. Res. Rev.**, v. 16, n. 2, p. 207-231, Mar. 1996.

HARVEY, A. L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 20, n. 5, p. 196-198, May 1999.

HAWKES, J. G. **Solanaceae III taxonomy chemistry evolution**. Richmond, Surrey, UK: The Royal Botanic Gardens Kew, 1991.

HOSTETTMANN, K. Assays for bioactivity. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1991. v. 6, p. 360.

HYNES, J., FLOYD, S., SOINI, A.E., O'CONNOR, R. & PAPKOVSKY, D.B. Fluorescence-Based Cell Viability Screening Assays Using Water-Soluble Oxygen Probes. **J. Biomolec. Screening**, 8, 264 - 272, 2003.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 30, n. 4, p. 433-446, Feb. 2001.

ISMAIL, N.; ALAM, M. A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 676-679, Aug. 2001.

ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. **Anticancer Res.**, v. 17, n. 1A, p. 277-284, Jan./Feb. 1997.

JACOBS, R. S.; WILSON, L. Fertilized sea urchin egg as a model for detecting cell division inhibitors. In: ASZALOR, A. (Ed.). **Modern analysis of antibiotics**. New York: Marcel Dekker, 1986. p. 481-493.

JIMENEZ, P. C.; FORTIER, S. C.; LOTUFO, T. M. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 287, n. 1, p. 93-101, Feb. 2003.

JIN, Q.; KANG, C.; SOH, Y.; SOHN, N. W.; LEE, J.; CHO, Y. H.; BAIK, H. H.; KANG, I. Tetrandrine cytotoxicity and its dual effect on oxidative stress-induced apoptosis through modulating cellular redox states in Neuro 2a mouse neuroblastoma cells. **Life Sci.**, v. 71, n. 17, p. 2053-2066, Sept. 2002.

KINGSTON, D. G. I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: WERMUTH, C. G. (Ed.). **The practice of medicinal chemistry**. [S.l.]: Academic Press, 1996. p. 102-114.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUPCHAN, S.M.; ANDERSON, W.K.; BOLINGER, P.; DOSKOTCH, R.W.; SMITH, R.M. RENAULD, J.A.S.; 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, n. 2, p. 3858-3866, 1969.

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, n. 5, p. 371-375, Oct. 2003.

LEE, C. C.; HOUGHTON, P. Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, n. 3, p. 237-2343, Sept. 2005.

LIN, Y. S.; CHIANG, H. C.; KAN, W. S.; HONE, E.; SHIH, S. J.; WON, M. H. Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* Lin extract. **Am. J. Chinese Med.**, v. 20, n. 3/4, p. 233-243, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. 1. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

LUCKNER, M. **Secondary metabolism in microorganisms, plants, and animals**. 3<sup>rd</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

MAKINO, B.; KAWAI, M.; KITO, K.; YAMAMURA, H.; BUTSUGAN, Y. New physalins possessing an additional carbon-carbon bond from *Physalis alkekengi* var. *francheti*. **Tetrahedron**, v. 51, n. 46, p. 12529-12538, Nov. 1995.

MALDONADO, E.; TORRES, F. R.; MARTINEZ, M.; CASTORENA, A. P. 18-acetoxywithanolides from *Physalis chenopodifolia*. **Planta Med.**, v. 70, n. 1, p. 59-64, Jan. 2004.

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

MANS, D. R.; da ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug and discovery in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **Oncologist**, v. 5, n. 3, p. 185-198, 2000.

MAYHEW, T. M.; MYKLEBUST, R.; WHYBROW, R.; JENKINS,. Epithelial integrity, cell death and cell loss in mammalian small intestine. **Histol. Histopathol.**, v. 14, n. 1, p. 257-267, Jan. 1999.

MCGAHON, A. J.; MARTIN, S. M.; 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*. **Method 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, 1992.

MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; FLYNN, K. M. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, depxynivalenol, and fumonisin B1 in a human erythro leukemia cell line. **Toxicol. In Vitro**, v. 18, n. 1, p. 21–28, Feb. 2004.

MINGUZZI, S., BARATA, L. E., SHIN, Y. G., JONAS, P. F., CHAI, H. B., PARK, E. J., PEZZUTO, J. M., CORDELL, G. A. Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. **Phytochemistry** n.59, p.635–641, 2002.

MONKS, N. R.; BORDIGNON, S. A. L.; FERRAZ, A.; MACHADO, K. R.; FARIA, D. H.; LOPES, R. M.; MONDIN, C. A.; SOUZA, I. C. C.; LIMA, M. F. S.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-tumor screening of brazilian plants. **Pharm. Biol.**, v. 40, n. 8, p. 603-616, Dec. 2002.

MONTENEGRO, R. C. **Estudo preliminar da expressão de marcadores moleculares em pacientes, do estado do Ceará, com câncer de estômago**. 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

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

MUNRO, M. H. G.; LUIBRAND, R. T.; BLUNT, J. W. The search for antiviral and anticancer compounds from marine organisms. In: SCHEUR, P. J. **Biorganic marine chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1987.

NAKAMURA, Y.; KAWAKAMI, M.; YOSHIHIRO, M. A.; MIYOSHI, N.; OHIGASHI, H.; KAWAI, K.; OSAWA, T.; UCHIDA, K. Involvement of mitochondrial death pathway in chemopreventive benzyl isothiocyanate-induced apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 10, p. 8492-8499, Mar. 2002.

PARKIN, D. M.; BRA, Y. F. I.; DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur. J. Cancer**, v. 37, Suppl 8, p. 4-66, 2001.

PESSOA, C. **Determinação do mecanismo de ação citotóxica de alguns compostos extraídos de plantas do nordeste brasileiro**. 1992. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 1992.

PEZZUTO, J. M. Plant-derived anticancer agents. **Biochem. Pharmacol.**, v. 53, n. 2, p. 121-133, Jan. 1997.

PIETRO, R. C.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; JANUARIO, A. H.; FRANCA, S. C. In vitro antimycobacterial activities of *Physalis angulata* Lin. **Phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 335-338, July 2000.

PINKELL, D. Cancer cells, chemotherapy and gene clusters. *Nature*, n. 24, p. 208-209, 2000.

POTT, P. Cirurgical observations relative to cancer of the scrotum. In: HOLLEB, A.; RANDERS-PEHRSON, M. (Ed.). **Classics in oncology**. New York: American Cancer Society, p. 9-17, 1987.

PURUSHOTHAMAN, K. K.; VASANTH, S. Chemistry and pharmacology of steroid derivatives from physalis. **J. Sci. Ind. Res.**, v. 47, n. 6, p. 326-334, June 1988.

QUINN, C. M.; WRIGHT, N. A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and application as prognostic variables. **J. Pathol.**, v. 160, n. 2, p. 93-102, Feb. 1990.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, May 2001.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobotânica**. São Paulo: Ed. Premier, 1997.

ROW, L. R.; SARNA, N. S.; MATSUURA, T. New Physalins from *Physalis angulata* and *Physalis lancifolia*. Part. 1. Physalins from *Physalis angulata* and *Physalis lancifolia*. **Phytochemistry**, v. 17, n. 9, p. 1641-1645, 1978a.

ROW, L. R.; REDDY, K. S.; MATSUURA, T.; NAKASHIMA, R. The structure of Physalin F from *Physalis angulata* and *Physalis lancifolia*. **Phytochemistry**, v. 17, n. 9, p. 1647-1650, 1978b.

ROW, L. R.; REDDY, K. S.; SARMA, N. S.; MATSUURA, T.; NAKASHIMA, R. New Physalins from *Physalis angulata* and *Physalis lancifolia*. Structure and reactions of Physalins D, I, G and K. **Phytochemistry**, v. 19, n. 6, p. 1175-1181, 1980.

RÜNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, L. H.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T. J. Inhibition of transcription factor NF- $\kappa$ B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 7, n. 11, p. 2343-2352, Nov. 1999.

SANT'ANA, P. J. P. **Bioprospecção no Brasil**: contribuições para uma gestão ética. Brasília, DF: Paralelo 15, 2002.

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. (Ed.). **Liver biopsy interpretation**. 6th ed. London: WB Saunders, 2000. p. 134-150.

SEN, G.; PATHAK, D. Physalin L, a 13,14-seco-16, 24 cyclosteroid from *Physalis minima*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1245-1246, 1995.

SERGEY, Y. A. P.; ANATOLI, G. K.; GABAI, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Exp. Cell Res.**, v. 283, n. 2, p. 1-16, 2003.

SIMÕES, O. C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2002.

SINHA, S. C.; ANIL, B.; OSHIMA, Y. Withaphysalin E, a withanolide of *Physalis minima* var. *indica*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, p. 2115-2117, 1987.

SIRAKI, A.G.; POURAHMAD, J.; CHAN, T. S.; KHAN, S.; O'BRIEN, P. J. Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 32, n. 1, p. 2-10, 2002.

SLATER, A. F. G.; NOBEL, C. S. I.; ORRENIUS, S. The role of intracellular oxidants in apoptosis. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1271, p. 59-62, 1995.

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

SU, B.; MISICO, R.; PARK, E. J.; SANTARSIERO, B. D. Isolation and characterization of bioactive of the leaves and stems of *Physalis philadelphica*. **Tetrahedron**, v. 58, n. 17, p. 3453-3466, 2002.

SUFFNESS, M.; DOUROS, J. Current status of the NCI plant and animal product program. **J. Nat. Prod.**, v. 45, n. 1, p.1-14, 1982.

TOMASSINI, T. C. B.; BARBI, N. S.; RIBEIRO, I. M.; XAVIER, D. C. D. Gênero *Physalis*- Uma revisão sobre vitaesteróides. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p.47-57, 2000.

UEDA, S.; NAKAMURA, H.; MASUTANI, H.; SASADA, T.; TAKABAYASHI, A.; YAMAOKA, Y.; YODOI, J. Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. **Mol. Immunol.**, v. 38, n. 10, p.781-791, 2002.

VASINA, O. E.; MASLEENNIKOVA, V. A.; ABDULLAEV, N. D.; ABUBAKIROV, N. K. Vitasteroids of *Physalis*. VII 14 $\alpha$ -hidroxicarpanolide D. **Khim. Prir. Soedim**, v. 5, p.596-602, 1986.

VERAS, M. L.; BEZERRA, M. Z. B.; LEMOS, T.; LIN, G.; UCHOA, D. E. A.; BRAZ-FILHO, R.; CHAI, H.- B.; CORDEL, G. A.; PESSOA, O. D. Cytotoxic Withaphysalins from the Leaves of *Acnistus arborescens*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 4, p. 710-713, 2004.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Develop. Trends**, v. 3, p. 232-238, 1998.

YANG, W.L.; ADDONA, T.; NAIR, D. G.; QI, L.; RAVIKUMAR, T. S. Apoptosis induced by cryo-injury in human colorectal cancer cells is associated with mitochondrial dysfunction. **Int. J. Cancer**, v. 103, n.3, p. 360-369, 2003.

WALKER, P.R.; SMITH, C.; YOUNDALE, T.; LEBLANC, J.; WHITFIELD, J.F.; SIKORSKA, M. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. **Cancer Res.** v. 51, n. 4, p.1078-85, Feb 1991.

WARNY, M.; KEATES, A. C. S.; KAETES, I.; CASTYAGLIUOLO, J. K.; ZACKS, S.; ABOUDOLA, A.; QAMAR, C.; POTHOUKAKIS, J. T.; LAMONT, C. P.; KELLY. Map kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 8, p.1147-1156, Apr. 2000.

WEIL, M.; JACOBSON, M. D.; COLES, H. S. R.; DAVIES, T. J.; GARDNER, R. L.; RAFF, K. D.; RAFF, M. C. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. **J. Cell Biol.**, v. 133, p. 1053–1059, 1996.

WU, S. J.; NG, L.- T.; CHEN, C. H.; LIN, D. L.; WANG, S. S.; LIN, C. C. Antihepatoma activity of *Physallis angulata* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 Cells. **Life Sci.**, v. 74, n. 17, p. 2061-2073. 2004.(a)

WU, S.J.; LEAN-TEIK, N.G.; DOUNG-LIANG, L.; SHAN-NEY, H.; SHYH-SHYAN, W.; CHUN-CHING, L. *Physallis peruviana* extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. **Cancer Lett.**, v.215, n. 2, p. 199-208, 2004.(b)

ZAMAI, L.; CANONICO, B.; LUCHETTI, F.; FERRI, P.; MELLONI, E.; GUIDOTTI, L.; CAPPELLINE, A.; CUTRONEO, G.; VITALE, M.; PAPA, S. Supravital Exposure to Propidium Iodide Identifies Apoptosis on Adherent Cells. **Cytometry**, v. 44, n. 1, p.57-64, 2001.