



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

**JOSÉ ROBERTO DE OLIVEIRA FERREIRA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE TRÊS  
NOVOS DERIVADOS DA  $\alpha$ -SANTONINA EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS *IN VITRO*.**

**FORTALEZA**

**2009**

JOSÉ ROBERTO DE OLIVEIRA FERREIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE TRÊS NOVOS DERIVADOS  
DA  $\alpha$ -SANTONINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*.

Dissertação submetida ao Programa  
de Pós-Graduação em Farmacologia  
da Universidade Federal do Ceará  
como requisito para obtenção do grau  
de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia do Ó  
Pessoa

FORTALEZA

2009

F441a Ferreira, José Roberto de Oliveira

Avaliação do potencial citotóxico de três novos derivados da  $\alpha$ -santonina em modelos experimentais *in vitro* / José Roberto de Oliveira Ferreira. – Fortaleza, 2009.

86 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2009

1. Santonina 2. Lactonas 3. Apoptose 4. Citotoxicidade I. Pessoa, Cláudia (orient.) II. Título.

CDD: 615.321

JOSÉ ROBERTO DE OLIVEIRA FERREIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE TRÊS NOVOS DERIVADOS  
DA  $\alpha$ -SANTONINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*.

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do grau de Mestre em  
Farmacologia.

A transcrição de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita  
conforme com as normas de ética científica.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Profa. Dra. Socorro Vanesca Frota Madeira  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profa. Dra. Gardenia Carmen Gadelha Militão  
Universidade Federal do Piauí – UFPI

---

Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro  
Universidade Federal do Ceará – UFC

*In memoriam* de  
Paulo Ferreira Santos, meu pai  
e Adelson dos Anjos, um segundo pai para mim

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** por minha vida, a maravilhosa família que sempre me apoiou e as pessoas que abriram e abrirão portas para mim

A minha **mãe Maria Cícera**, exemplo de fé, mulher dedicada, pelo apoio paciência e suas palavras de sempre: Vamos sentar e conversar.

A ela e a meu pai devo a prioridade dos estudos

A minha irmã, **Maria Aline**, que sempre foi um exemplo de pessoa esforçada, dedicada, honesta e amável. Sem a confiança dela e o amor não teria conseguido chegar até aqui.

A **Profa. Cláudia do Ó Pessoa** por ter aceitado ser responsável pela minha orientação, pela amizade e por estar sempre disposta a ajudar, por ser um exemplo de pessoa vitoriosa e dedicada. E pela orientação indispensável na realização deste trabalho e minha estada em Fortaleza

Ao **Prof Odorico de Moraes** por acreditar no LabNOE e nas pessoas que fazem parte dele. Ao seu sonho, já sólido, do CPDM. E as brincadeiras e bordões que animam todos.

A **Profa. Leticia Veras Costa-Lotufo** pela amizade, sinceridade e cordialidade com que trata a todos. E pela ajuda sempre bem vinda

A **Dr<sup>a</sup> Raquel Carvalho Montenegro** pela amizade e participação com sugestões e idéias sempre bem vindas

Ao prof. **Dr Luiz Claudio de Almeida Barbosa** da Universidade Federal de Viçosa por ter sintetizado e cedido as moléculas para estudo, bem como empenho na colaboração UFV-UFC

Ao doutorando, UFV, **Francisco Frederico Pelinson Arantes** por estar sempre disposto a sintetizar as moléculas e também novos derivados, sendo fundamental a sua ajuda para o trabalho

A **Bruno Coêlho Cavalcanti** pela amizade, os ensinamentos e a orientação indispensável, sem a qual não teria realizado este trabalho. E a oportunidade de participar do grupo de genotoxicidade do LabNOE

A **Carla Maria Lima Sombra** pela ajuda pessoal e profissional inestimável na minha estada no LabNOE

A **Cecília Carvalho de Oliveira** pela amizade, festas, caronas (inestimável no porre de Champagne) e o apoio logístico, pessoal e emocional em Fortaleza.

A **Kristiana Cerqueira Mousinho**, vulgo Lorinha, por me fazer rir sempre dela, de mim e dos outros. E pela amizade, desabafos e tudo mais que um amigo faz.

A **Hemerson Yuri** pela amizade, momentos de descontração, ensinamentos

A **Paulo Michel**, vulgo lorinho ou The Limon Men, pela ajuda na finalização deste trabalho, amizade e as palavras de incentivo que sempre tem quando o encontro: “bom dia Michel” “O que é que tem de bom”, “Que bom revê-lo Michel” “Só se for pra você”.

A **Danilo e Carol** pela amizade, respeito. E Danilo companheiro Fã de “Tayrone O cigano”

Aos demais caríssimos amigos do LabNOE: **Arinice, Delano Marinho, Ana Jérsia** (Meus orientadores no tempo de IC do LabNOE), **Aline, Diego, Daniel, Paula Jimenez, Paula IC, Venúncia Magalhães** (filha do Bruno e do Hemerson (isso mesmo)), **Adriana Carvalho** (companheira caucasiana e areia), **Felipe, Washington Araújo, Elthon Goés, Evelyne, Patrícia Marçal** (Ah negrinha, Isaura, irmã de cor se tu não tivesse pagado meu 1 real, ia cobrar aqui!), **Kézia, Bruno Novato, Deyse, Rafael Sucupira, Gabriela, Vanessa, Igor e Nathiel**.

A **Silvana França**, vulgo Baronesa de Araruna, Dama de Ferro, pela amizade, broncas merecidas e não merecidas, tudo que tenho a dizer é: “ você não vale ouro, não vale cobre, vale sim DIAMANTE, pela dedicação com o LabNOE, zelando pela paz e ordem, é praticamente Condoleezza Rice brasileira do LOE

A **Adelânia, Sheyla, dona Rogéria, Luciana, dona Fátima e Erlon** pela dedicação e organização do LOE.

A **todos os professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia** pela excelência acadêmica deste curso e o conhecimento oferecido

A **Dr<sup>a</sup> Gardênia Gadelha Militão** pela ajuda e orientação na finalização deste trabalho

A **Dr<sup>a</sup> Vanesca Frota** pelo apoio, incentivo e amizade

Ao **professor Armênio Aguiar** pela dedicação com o Curso de Férias em Farmacologia/Fisiologia, possibilitando que muitos, como eu, conheçam o departamento e o Programa de Pós-graduação em Farmacologia, e a amizade

A todos da **Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas**, em especial o **Professor Zenaldo Porfírio** cuja a dedicação foi e é indispensável para o reconhecimento e fortalecimento do curso

A minha querida orientadora de iniciação científica **Ana Rosa de Almeida Alves** exemplo de pesquisadora dedicada e grande amiga

Ao meu grande amigo e irmão **Gustavo Fontenele**, por me deixar fazer parte de sua família e círculo de amigos, por mostrar uma vida simples e sossegada, e o quanto a humildade é importante na vida de uma pessoa. Obrigado meu amigo pelas aventuras, momentos de sobriedade e dessobriedade (não sei nem se essa palavra existe)

A sua mãe e pai, **Fontenele Sampaio e Flávio**, por quase me adotarem aqui em Fortaleza

A dona **Ivone e a Anderson**, minha família tão querida em Fortaleza, que agora está em Brasília, longe, mas que carrego sempre no meu coração onde quer que eu vá!

Ao meu grande irmão mais velho **Darlan**, também em Brasília, cara você é o cara, sinônimo de humildade, confiança e diversão. Vô morar em Brasília!!!

Ao grande amigo **Ladson Romário** por mostrar que em uma semana você faz um amigo pra vida inteira

Aos grandes amigos dos momentos 50 cents, Ypioca Red Fruit e São Gonçalo: **Alan, Renan, Hudson e Vítor Break!!!!**

Aos grandes amigos de Maceió/Recife, companheiros do tempo da graduação e da vida toda: **Ynaiara** (a pessoa mais bruta e amável que conheço), **Ítala** (espalhafatosa e ainda compartilha o mesmo dia de nascimento), **Thiago Campos** (pessoa mais inteligente e sensata que conheço) e **Newton** (grande irmão mais velho)

Aos grandes amigos **Cíntia Yamille e sua linda família, Roberta Dalcico, Otacílio, Silvéria, Deyse, Roberto César** pelas comemorações, apoio e amizade

A **Chiquinho, Íris, Carlos, Alana, Mônica** pela cumplicidade e disponibilidade em sempre ajudar, e o zelo com que cumprem suas funções

As secretárias do Programa de Pós-graduação em Farmacologia **Aura Rhanes e Márcia** pelo zelo, dedicação e orientação de como as coisas andam

A **Dona Ivone e Perolina** pela ajuda e confiança sempre depositadas

Aos **computadores do LabNOE** por possibilitarem a digitação desta dissertação de mestrado

A todos que contribuíram para este trabalho e a caminhada até aqui



## RESUMO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE TRÊS NOVOS DERIVADOS DA  $\alpha$ -SANTONINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS IN VITRO.** José Roberto de Oliveira Ferreira. Dissertação de Mestrado. Orientadora: Cláudia do Ó Pessoa. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará.

As lactonas sesquiterpênicas apresentam estruturas químicas diversificadas, bem como uma grande variedade de atividades biológicas, dentre as quais se destaca a atividade citotóxica e antitumoral. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial citotóxico de três novos derivados da  $\alpha$ -santonina (**1**): 3-oxo-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-eudesma-1,4,11-trien-6,12-olideo (**2**), 11,13-dehidrolumissantonina (**3**) e 10 $\alpha$ -acetoxi-3-oxo-1,7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-guai-4,11-dien-6,12-olideo (**4**) e estudar seus efeitos sobre a proliferação celular, ciclo celular e eventos apoptóticos. Todos os novos derivados inibiram a proliferação das células tumorais, pelo ensaio do MTT, exceto o protótipo ( $\alpha$ -santonina), após 72 h de incubação. As linhagens HL60 (leucemia) e HCT-8 (côlon) mostraram maior sensibilidade ao tratamento com os novos derivados, cujos valores de  $CI_{50}$  para HL60 foram 1,14 (0,23-2,77); 2,30 (1,87-2,84) e 1,60 (1,09-2,35)  $\mu$ M e HCT-8 iguais a 2,92(0,98-4,86); 1,96 (1,64-2,29) e 0,36 (0,16-0,79)  $\mu$ M, para os compostos **2**, **3** e **4**, respectivamente. Dois dos três derivados foram menos citotóxicos para as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com  $CI_{50}$  igual a 10,75 (4,6-23,3)  $\mu$ M (**3**) e  $CI_{50}$  igual a 16,77 (7,3-36,8)  $\mu$ M (**4**). Porém, o composto **2** apresentou menor seletividade ( $CI_{50}$  igual a 3,24 (1,6-5,3)  $\mu$ M) em relação as células não tumorais. Nenhum dos compostos estudados induziu efeitos hemolíticos. Para estudo do mecanismo de ação foi escolhida a linhagem HL-60 como modelo experimental. Culturas de HL60 foram tratadas com os derivados (1 e 2  $\mu$ M) por 24 h. Todos os derivados foram capazes de reduzir o número de células viáveis, avaliado pelo ensaio de exclusão do azul de tripan, na maior concentração testada, sem induzir aumento na incidência de células não viáveis. A ação antiproliferativa está relacionada com a capacidade de inibir a síntese de DNA. Após o tratamento, os derivados foram capazes de induzir apoptose, como observado pelo padrão de morfologia celular: presença de condensação de cromatina e fragmentação nuclear, bem como por citometria de fluxo (manutenção da integridade de membrana plasmática, fragmentação do DNA, externalização da fosfatidilserina e ativação de caspases 3 e 7). Nenhum dos derivados causou despolarização da membrana mitocondrial, sugerindo a participação da via extrínseca no processo apoptótico. Os compostos **3** e **4** foram capazes de causar acúmulo de células na fase  $G_2/M$  do ciclo celular, indicando um mecanismo de ação diferenciado em relação ao composto **2**. Esses dados sugerem que os derivados da  $\alpha$ -santonina avaliados no presente estudo apresentam um potencial anticâncer, em especial o composto **4** pela moderada toxicidade em PBMC e por ser capaz de induzir uma maior taxa de morte celular via apoptose quando comparado aos demais derivados estudados.

Palavras-chave:  $\alpha$ -santonina, citotoxicidade, apoptose

## ABSTRACT

**EVALUATION OF THE CYTOTOXIC POTENTIAL OF THREE NEW DERIVATIVES OF  $\alpha$ -Santonin IN EXPERIMENTAL MODELS.** Master's dissertation. José Roberto de Oliveira Ferreira. Advisor: Cláudia do Ó Pessoa. Master's dissertation. Postgraduate Program on Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, UFC, 2009.

The sesquiterpene lactones have different chemical structures, and a variety of biological activities, among which stand out the cytotoxic and antitumour activities. The aim of the present study was to determine the cytotoxic effects of three new  $\alpha$ -Santonin (**1**) derivatives: 3-oxo-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-eudesma-1,4,11-trien-6,12-olide (**2**), 11,13-dehydrolumissantonin (**3**) and 10 $\alpha$ -acetoxi-3-oxo-1,7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-guai-4,11-dien-6,12-olide (**4**) and study your effects on cell proliferation, cell cycle, and apoptosis events. All new derivatives inhibited the proliferation of tumor cells, by MTT assay, except the prototype ( $\alpha$ -santonina) after 72 h of incubation. The cell lines HL60 (leukemia) and HCT-8 (colon) showed greater sensitivity to treatment with these derivatives, with values of IC<sub>50</sub> for HL60 equal to 1.14 (0.23-2.77); 2.30 (1.87-2.84) and 1.60 (1.09-2.35)  $\mu$ M and for HCT-8 equal to 2.92(0.98-4.86); 1.96 (1.64-2.29) and 0.36 (0.16-0.79)  $\mu$ M for compounds **2**, **3** and **4**, respectively.. Two derivatives were less cytotoxic to peripheral blood mononuclear cells (PBMC): IC<sub>50</sub> equal to 10.75 (4.6-23.3)  $\mu$ M (**3**) and IC<sub>50</sub> equal to 16.77 (7.3-36.8)  $\mu$ M (**4**). However, compound **2** showed lower selectivity (IC<sub>50</sub> equal to 3.24 (1.6-5.3)  $\mu$ M) on PBMC. None of the studied compounds induced hemolytic effects. To evaluate the mechanism of action promoted by these derivatives, HL60 cells was chosen as an experimental model, since this lineage was one of the most sensitive to treatment. HL60 cultures were treated with  $\alpha$ -santonin derivatives (1 and 2  $\mu$ M) during 24 h. All compounds were able to reduce the number of viable cells evaluated by the trypan blue dye exclusion test at highest concentration, without increasing the number of non-viable cells. The antiproliferative action is related to the ability to inhibit the synthesis of DNA. After treatment, the derivatives were able to induce apoptosis, as observed by cell morphology pattern (chromatin condensation, and nuclear fragmentation), and by flow cytometry (membrane integrity, DNA fragmentation, annexin positive cells, and caspases 3 and 7 activation). None of all derivatives analyzed caused depolarization of mitochondrial membrane, suggesting the involvement of the extrinsic pathway in the apoptotic process. The compounds **3** and **4** induce G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest, indicating a different mechanism of action in relation to compound **2**. These data suggest that  $\alpha$ -santonin derivatives evaluated in the present study showed a anticancer potential, especially the compound **4**, which induced moderate toxicity on PBMC, in addition this compound induced a higher rate of cell death via apoptosis when compared to the other  $\alpha$ -santonin derivatives evaluated.

Keywords:  $\alpha$ -santonin, cytotoxic, apoptosis

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleotídeo
<b>EDTA</b>	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltertrazolim brometo
<b>NCI</b>	National Cancer Institute
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBMC</b>	Células mononucleares do sangue periférico
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Solution (Tampão fosfato de sódio)
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SLs</b>	Sesquiterpeno lactonas

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de câncer com maior incidência para 2008, de acordo com estimativas do INCA (BRASIL, 2008). .....	18
Figura 2: Ciclo celular e pontos de checagem.(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2005).....	19
Figura 3: Progressão do ciclo celular e seus principais pontos de checagem (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004; BARR; SILLJÉ; NIGG, 2004; ALMEIDA <i>et al.</i> , 2005; FOSTER, 2008). .....	20
Figura 4: Ciclo celular e a ação de fármacos. (MCGROGAN <i>et al.</i> , 2008).....	22
Figura 5: Vias de morte induzida por quimioterapia. (KIM <i>et al.</i> , 2006; RICCI; ZONG, 2006; BRUIN; MEDEMA, 2008).....	23
Figura 6: Esquema demonstrando as vias de ativação da apoptose e suas interconexões (GUPTA <i>et al.</i> , 2006).....	28
Figura 7: Esqueleto básico de eudesmanolídeos e guaianolídeos, nessa ordem. Em vermelho grupamento $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona. ....	30
Figura 8: Estrutura química da $\alpha$ -santonina (1) e seus derivados 3-oxo-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-eudesma-1,4,11-trien-6,12-olideo (2), 11,13-dehidrolumissantonina (3) e 10 $\alpha$ -acetoxi-3-oxo-1,7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-guai-4,11-dien-6,12-olideo (4). .....	33
Figura 9: Estruturas de sesquiterpeno lactonas com atividade citotóxica .....	34
Figura 10: Estruturas de sesquiterpeno lactonas com atividade citotóxica .....	35
Figura 11: Efeito das 2, 3 e 4 nas concentrações de 1 e 2 $\mu$ M na viabilidade de células leucêmicas HL-60 determinado por Exclusão do Azul de Tripán após 24 horas de incubação. ....	55
Figura 12: Avaliação da atividade dos derivados 2, 3 e 4 nas concentrações de 1 e 2 $\mu$ M, sobre o padrão de morte celular em células leucêmicas HL-60 e analisada por brometo de etídio/laranja de acridina após 24 horas de incubação. ....	57

Figura 13: Efeito das lactonas sesquiterpênicas 2, 3 e 4 nas concentrações de 1 e 2 $\mu\text{M}$ sobre a concentração de células leucêmicas (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. . .	59
Figura 14: Efeito das sesquiterpênicas 2, 3 e 4 nas concentrações de 1 e 2 $\mu\text{M}$ sobre a viabilidade (integridade de membrana) de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. ....	60
Figura 15: Efeito das sesquiterpênicas 2, 3 e 4 nas concentrações de 1 e 2 $\mu\text{M}$ sobre o potencial transmembrânico de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123 após 24 horas de incubação.. ....	61
Figura 16: Efeito das lactonas sesquiterpênicas 2, 3 e 4 sobre a fragmentação de DNA de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. ....	63
Figura 17: Efeito das lactonas sesquiterpênicas 2, 3 e 4 sobre as fases do ciclo celular em células leucêmicas (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. ....	64
Figura 18: Efeito das lactonas sesquiterpênicas 2, 3 e 4 sobre a expressão de fosfatidilserina em células leucêmicas (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. . ....	65
Figura 19: Efeito das lactonas sesquiterpênicas 2, 3 e 4 sobre a atividade de caspases em células leucêmicas (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. ....	66
Figura 20: Fotomicrografia de células HL-60, após 24hs de tratamento com os derivados da $\alpha$ -santonina nas concentrações de 1 e 2 $\mu\text{M}$ , para os compostos 2 (C,D), 3 (E,F) e 4 (G,H). ....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de morte celular e suas características básicas. ( adaptado de: RICCI e ZONG, 2006; Kim <i>et al.</i> , 2006 e BREDESEN, 2007).....	29
Tabela 2: Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> através do método do MTT. ....	42
Tabela 3: Atividade citotóxica <i>in vitro</i> de derivados da $\alpha$ -Santonina em 9 linhagens de células tumorais e em células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Resultados expressos em $\mu$ M e seus respectivos intervalos de confiança, correspondentes a três experimentos independentes.....	53
Tabela 4: Avaliação do potencial hemolítico da $\alpha$ -santonina e seus derivados 2, 3 e 4. EC <sub>50</sub> : concentração efetiva em que a substância-teste causa hemólise em 50% dos eritrócitos. Resultados expressos em $\mu$ g/mL e $\mu$ M. ....	54
Tabela 5: Efeito dos derivados da $\alpha$ -Santonina 2, 3 e 4 na incorporação do 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) em células leucêmicas de HL-60, após 24 horas de incubação.....	56
Tabela 6: Resultados da $\alpha$ -santonina (1) e seus derivados 3-oxo-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-eudesma-1,4,11-trien-6,12-olideo (2), 11,13-dehidrolumissantonina (3), 10 $\alpha$ -acetoxi-3-oxo-1,7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-guai-4,11-dien-6,12-olideo (4). ( - ) Inativo,( + ) Ativo, ( * ) – Não testado.....	78

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Considerações gerais:</b>	<b>.....16</b>
<b>1.2 Incidência do câncer</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Ciclo celular e Câncer: quando a homeostase é perdida</b>	<b>18</b>
<b>1.4 Morte Celular e fármacos anticâncer</b>	<b>23</b>
<b>1.5 Apoptose</b>	<b>25</b>
<b>1.6 Terpenoides</b>	<b>30</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Geral</b>	<b>36</b>
<b>2.2 Específicos</b>	<b>36</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Materiais</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Determinação da Atividade Citotóxica</b>	<b>41</b>
<b>3.3 Determinação da Atividade Hemolítica</b>	<b>43</b>
<b>3.3 Estudos de Mecanismo de Ação</b>	<b>44</b>
3.3.1 Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán	44
3.3.2 Inibição da síntese de DNA – Ensaio do BrdU	44
3.3.3 Coloração diferencial por BE/LA	45
3.3.4 Determinação da Integridade de Membrana	46
3.3.5 Ciclo celular e fragmentação de DNA	47

3.3.6 Despolarização Mitocondrial	48
3.3.7 Ensaio da Anexina V	49
3.3.8 Ensaio de caspases 3 e 7	50
3.3.9 Coloração por May-Grunwald-Giemsa	51
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>4.1 Determinação da Atividade Citotóxica in vitro</b>	<b>52</b>
<b>4.2 Atividade hemolítica</b>	<b>52</b>
<b>4.3 Estudo do mecanismo de citotoxicidade</b>	<b>54</b>
4.3.1 Viabilidade celular	54
4.3.2 Inibição da síntese de DNA – incorporação do BrdU	55
4.3.3 Coloração por BE/LA	56
4.3.4 Proliferação celular – Concentração de células	58
4.3.5 Determinação da integridade da membrana plasmática	58
4.3.6 Determinação do potencial mitocondrial	58
4.3.7 Análise da Fragmentação do DNA	61
4.3.8 Análise das fases do ciclo celular	62
4.3.9 Ensaio da anexina	62
4.3.10 Ensaio de caspases 3 e 7	62
4.3.11 Análise de alterações morfológicas	67
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>69</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>77</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	<b>79</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações gerais:

O câncer é a segunda causa de morte no mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (COSTA *et al.*, 2008). Sendo produto do mau funcionamento na regulação do ciclo celular (FOSTER, 2008; KIM *et al.*, 2002), onde células mutadas ou injuriadas, que normalmente seriam levadas a morte, têm permissão para progredir através do ciclo celular (MALUMBRES *et al.*, 2007). Desta forma levando a acumulação de anormalidades no DNA e subseqüentes desordens patológicas, como o câncer (BETTENCOURT-DIAS *et al.*, 2004).

Uma única mutação não é suficiente para converter uma célula saudável em maligna, mas sim um conjunto de mutações, que podem promover a progressão do ciclo celular, impedir a diferenciação e favorecer mecanismos de escape a apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Mutações chaves ocorrem em proto-oncogenes e genes supressores tumorais. Os proto-oncogenes quando mutados (oncogenes) promovem o crescimento celular, enquanto os supressores tumorais quando mutados a inibição da progressão do ciclo é retardada ou inibida, facilitando o crescimento anormal (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004).

O desenvolvimento de fármacos pode seguir de diversas maneiras, todavia, o sistema básico tradicional parte de um composto isolado/sintetizado que é avaliado a partir de métodos de screening, para posteriores testes aprofundados (KOPEC; BOZYCZKO-COYNE; WILLIAMS, 2005; MISHRA *et al.*, 2007).

Os fármacos anticâncer constituem uma importante ferramenta no tratamento do câncer, aliado a estratégias cirúrgicas, radioativas e genéticas ([www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)). No âmbito da quimioterapia antineoplásica muitos compostos de origem sintética ou não são utilizados em esquemas terapêuticos visando impedir o crescimento e desenvolvimento do tumor (RICCI; ZONG, 2006). Entretanto, apesar de todo arsenal terapêutico disponível existe problemas na seletividade, toxicidade e outros na quimioterapia que limitam o seu uso, baseado nisto e em outros fatores, a pesquisa no descobrimento de novos fármacos e novos alvos tomou grande força (SAKALANI; KUTTY, 2008), um dos exemplos são os análogos de fármacos conhecidos como Paclitaxel e Vincristina.

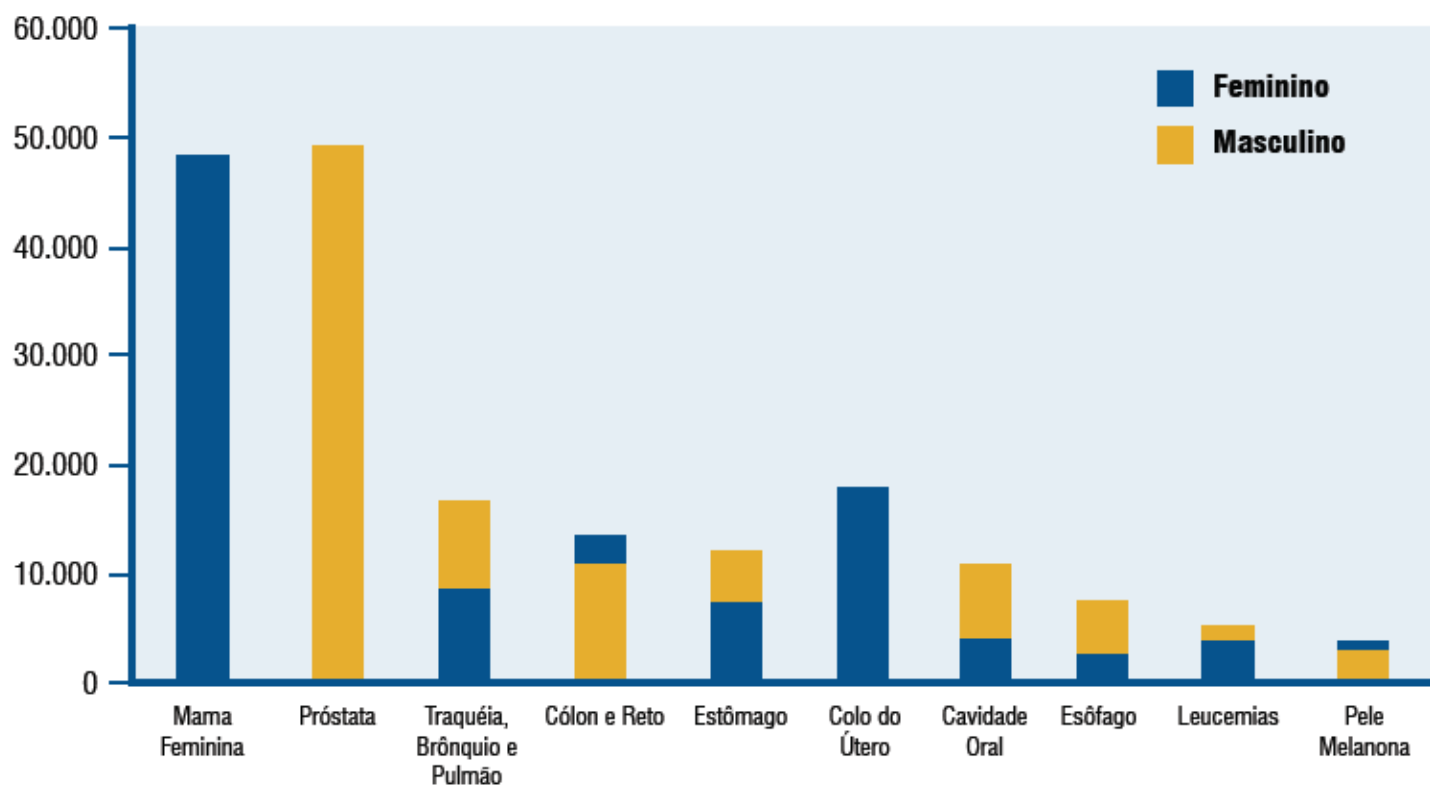
Modificações em átomos ou arranjos estruturais e espaciais podem aumentar ou cessar a atividade de um composto conhecido, bem como sua seletividade e conferir nova atividade biológica (KIM *et al.*, 2006). Não necessariamente compostos parecidos possuem igual atividade ou potência (SCOTTI *et al.*, 2007). Desta forma fica clara a necessidade da síntese de compostos correlatos a partir de um composto chave.

Aliado a isto a pesquisa genética do câncer revelou assinaturas moleculares nas células tumorais e não nas sadias, que possibilitaram o desenvolvimento de novas classes de compostos anticâncer (ROSA *et al.*, 2008), como o anti-Her2 (Transtuzumabe) e o inibidor de tirosinoquinase (Imatinibe).

Os dados acima citados refletem a necessidade da busca de novas formas de combate ao câncer, e também a multidisciplinaridade da pesquisa em farmacologia. Uma vez que envolve a inter-relação entre diversos campos das ciências: biologia molecular, genética, química e farmacologia, dentre outros de igual importância.

## **1.2 Incidência do câncer**

As estimativas do Instituto Nacional do Câncer para o ano de 2009, baseadas no ano de 2008, são de 466.730 novos casos de câncer. Nessa estimativa inclui-se que o câncer de pele não melanoma (115 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelo de próstata (49 mil), mama feminino (49 mil) e pulmão (27 mil). Fazendo uma distribuição por sexo são esperados 231.860 casos novos, para o sexo masculino, e 234.870 para o sexo feminino. Destes, para o sexo masculino, os mais incidentes serão devidos ao câncer de pele não melanoma (56 mil), de próstata (49 mil), de pulmão (18 mil), de estômago (14 mil) e de cólon e reto (12 mil). Enquanto para o sexo feminino, destacam-se os tumores de pele não melanoma (59 mil casos novos), de mama (49 mil), de colo do útero (19 mil), de cólon e reto (14 mil) e de pulmão (9 mil) (INCA, 2007).

**Nº de Casos**

**Figura 1: Tipos de câncer com maior incidência para 2008, de acordo com estimativas do INCA**

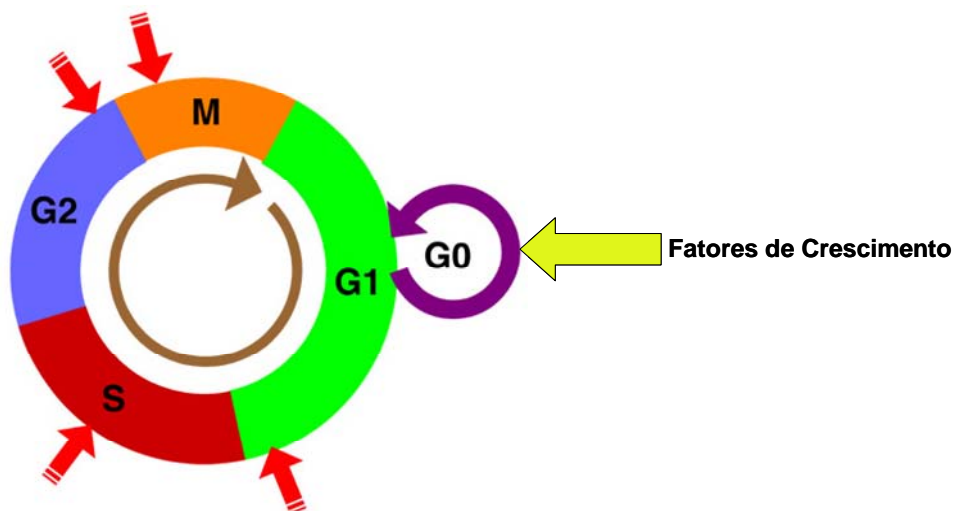
Fonte: (INCA, 2007)

### 1.3 Ciclo celular e Câncer: quando a homeostase é perdida

A proliferação celular é um processo finamente regulado pela ativação e desativação de uma série de proteínas constituintes da maquinaria celular (BETTENCOURT-DIAS *et al.*, 2004). A principal tarefa do ciclo celular é ser capaz de assegurar replicação do DNA livre de erro, separação cromossômica e citocinese (MADDIKA *et al.*, 2007). O ciclo celular pode ser dividido em Interfáse e Mitose, sendo a subdivididos em G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> (interfase) e a mitose em: prófase, metáfase, anáfase e telófase (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004; SCHIMIDT; BASTIANS, 2007).

Em resposta a sinais proliferativos extracelulares, as células entram no ciclo celular a partir de um estado de descanso ( $G_0$ ) e começa a divisão celular, uma vez que ultrapassem o ponto de restrição após a primeira fase de intervalo ( $G_1$ ) (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004; MADDIKA *et al.*, 2007). Portanto, células que estão em  $G_0$  (quiescência), não estão ciclando ativamente (COLLINS; GARRET, 2005). Após  $G_1$ , a fase S tem início, onde ocorre a replicação do DNA. Com o DNA replicado a célula entra em  $G_2$ , um período em que se prepara para a mitose (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004). Na mitose, ocorre a divisão celular apropriadamente dita, em que a célula se divide em duas (SCHIMIDT; BASTIANS, 2007).

As ciclinas são proteínas chaves do ciclo celular, que em conjunto com as quinases dependentes de ciclina (CDKs), formam o complexo ciclina-CDK que coordena a progressão do ciclo (MALUMBRES *et al.*, 2007). Este complexo é composto por uma subunidade reguladora (ciclina) e uma catalítica (CDK) (BETTENCOURT-DIAS *et al.*, 2004). A atividade das ciclinas é modulada por modificações nos seus níveis de expressão de RNAm, quanto nos níveis de proteínas. Assim as ciclinas são produzidas em cada uma das fases do ciclo (FOSTER, 2008)

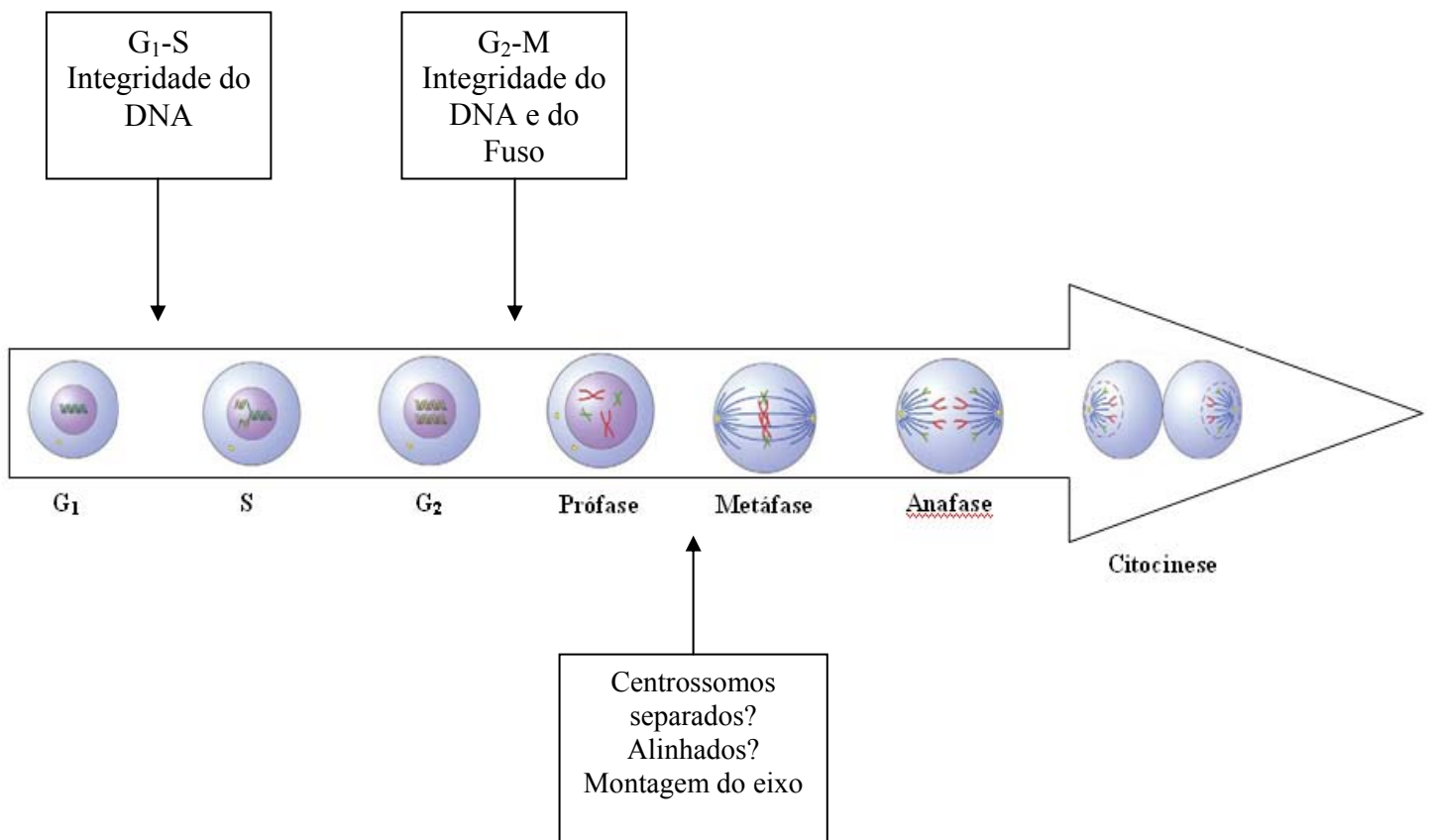


**Figura 2: Ciclo celular e pontos de checagem (setas vermelhas)**

Fonte: Adaptado de Fischer *et al.* (2004) e Almeida *et al.* (2005)

Nota: O ciclo é representado por Interfase ( $G_1$ , S e  $G_2$ ), onde a célula parte de um estado de quiescência ( $G_0$ ), devido a fatores de crescimento, para um estado em que esta “ciclando” ativamente ( $G_1$ ), ocorrendo a replicação do DNA. Após a interfase, onde seus constituintes celulares e DNA duplicados, a célula entra em mitose. As duas células filhas podem continuar ciclando ou entrar em  $G_0$

Cada fase do ciclo possui checkpoints, que podem levar a parada da progressão do ciclo celular e a ativação de mecanismos de reparo (MALUMBRES *et al.*, 2007). Após passar por checkpoints, as células são levadas irreversivelmente para a próxima fase do ciclo. Dano ao DNA e/ou mal funcionamento de organelas e estruturas (falha no fuso mitótico) pode ativar a parada do ciclo e a célula pode entrar em morte celular, caso o dano não seja reparado (FOSTER, 2008). Os pontos de checagem da integridade do DNA operam através do ciclo, especialmente na transição  $G_1-S$ , durante e depois da fase de síntese do DNA, e antes das células entrarem em mitose ( $G_2-M$ ) (FISCHER *et al.*, 2004).



**Figura 3: Progressão do ciclo celular e seus principais pontos de checagem**

Fonte: Adaptado de Fischer, Glover e Lane (2004); Barr, Silljé e Nigg (2004); Almeida *et al.* (2005); Foster (2008)

A proteína do retinoblastoma, pRb, controla a expressão de genes que comprometem as ciclinas que estão no checkpoint na interseção G<sub>1</sub>-S. No início de G<sub>1</sub>, ela está hipofosforilada, o que reprime o avanço do ciclo celular, porque impede a atividade do fator de transcrição E2F. Próximo ao ponto de restrição, os pontos de restrição, os complexos ciclina D – CDK4 e 6 e o complexo ciclina E – CDK2, hiperfosforila pRb, liberando E2F, promovendo desta forma a entrada em S (ALMEIDA *et al.*, 2005). Quando ocorre mutação no gene *pRB*, o ciclo celular fica desregulado, e mesmo que a célula não esteja preparada para entrar em S ou tenha ocorrido erros, o ciclo progride (MADDIKA *et al.*, 2007). Isto porque o gene *pRb* é reconhecido como supressor tumoral, pois é capaz de parar o ciclo celular, caso erros sejam detectados. Por isso, mutações no *pRB* são freqüentemente encontradas em tumores (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A maior parte dos agentes quimioterápicos interferem com a replicação e a formação do fuso mitótico (KIM *et al.*, 2002; NEWEL, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2005; BRUIN; MEDEMA, 2008;) processos centrais do ciclo celular. Entretanto, novas pesquisas têm revelado novos alvos que possibilitam o desenvolvimento de novas classes de agentes anticâncer. Um fato que possibilitou esse impulso foi a descoberta de que certas proteínas que são superexpressas em tumores, tais como Pólo-like quinase 1 (BARR; SILLJÉ; NIGG, 2004) e Auroras quinases (FOSTER, 2008; ROSA *et al.*, 2008).

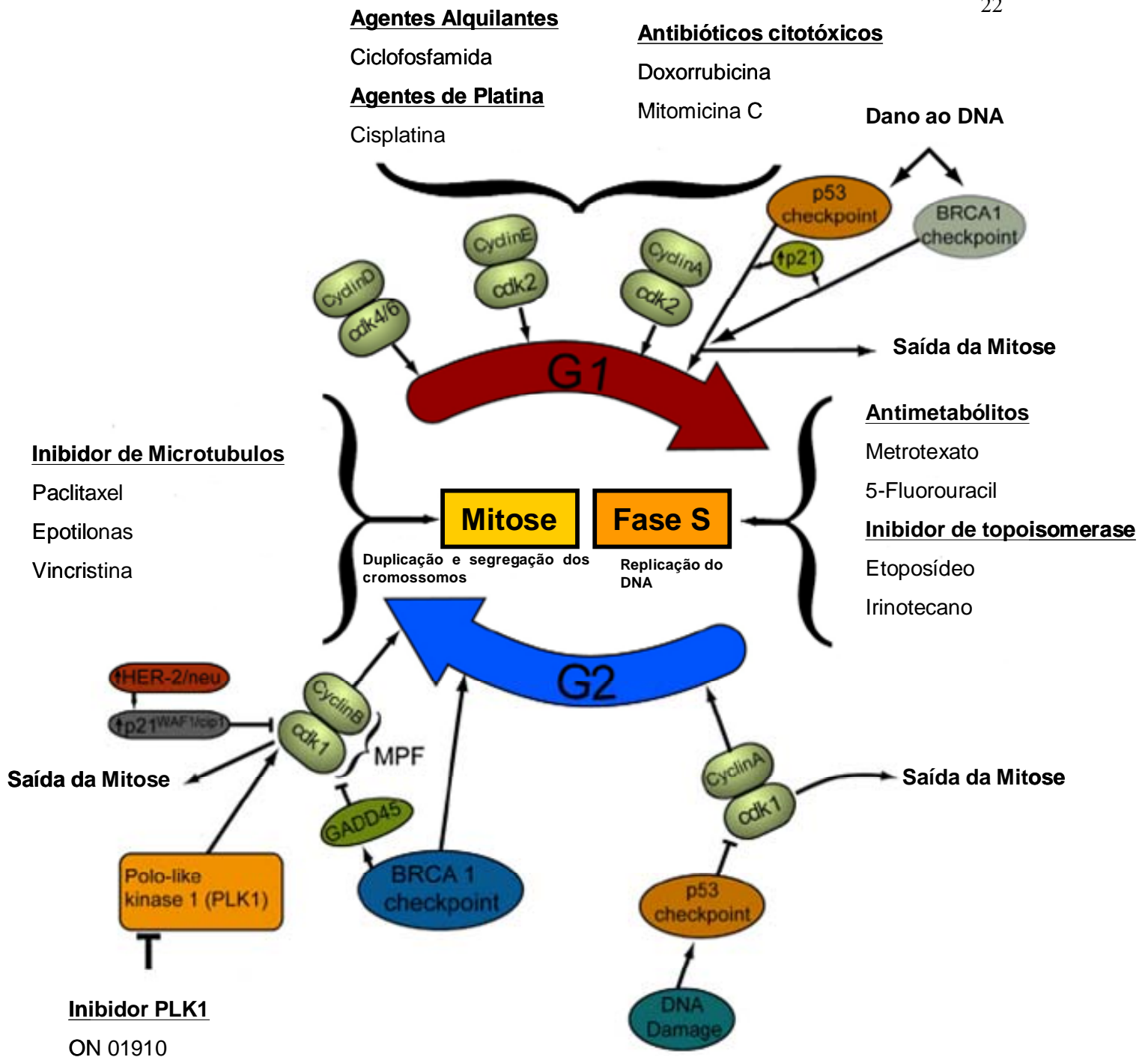


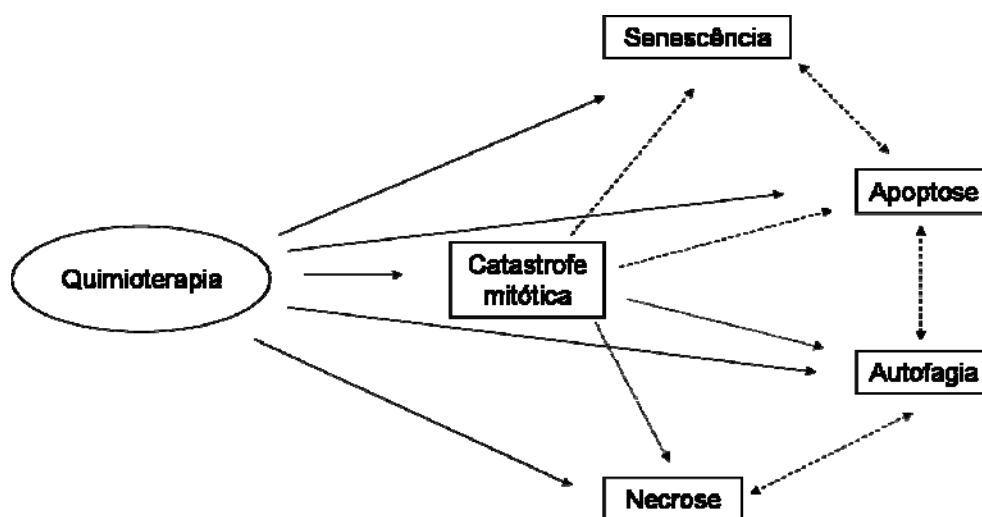
Figura 4: Ciclo celular e a ação de fármacos, as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) regulam o ciclo celular ao se ligarem a várias ciclinas durante a progressão do ciclo celular

Fonte: Adaptado de McGrogan *et al.* (2008)

Nota: Agentes quimioterápicos diversos têm como alvo diferentes estágios do ciclo celular, como mostrado acima, agentes antimitóticos tem como alvo G<sub>2</sub>/M, enquanto outros que agem comumente em G<sub>1</sub>/G<sub>2</sub> e a fase S interferem com a replicação do DNA.

#### 1.4 Morte Celular e fármacos anticâncer

A homeostase nos organismos multicelulares é realizada pelo equilíbrio entre a proliferação e a morte celular (KRYSKO *et al.*, 2008). A desregulação destes mecanismos implica no desenvolvimento de doenças, como o câncer (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004). A quimioterapia é uma estratégia terapêutica, que age através de compostos químicos, no combate ao câncer, induzindo morte celular por mecanismos diversos, como mostrado na figura abaixo.



**Figura 5:** Vias de morte induzida por quimioterapia

Fonte: Adaptado de Kim *et al.* (2006); Ricci e Zong (2006); Bruin e Medema (2008)

Nota: Os agentes quimioterápicos são capazes de induzir morte celular por diversos mecanismos, que independente da via culminarão na deleção celular

A apoptose foi por muito tempo utilizada como sinônimo de morte celular programada (KROEMER *et al.*, 1997), entretanto, recentes estudos (KIM *et al.*, 2006; RICCI; ZONG, 2006; BREDESEN, 2007) começaram a caracterizar formas alternativas de morte celular programada, a exemplo da autofagia, como visto na figura acima.

Quatro categorias de morte celular têm sido descritas atualmente: apoptose, autofagia, necrose e catástrofe mitótica. Entretanto, a apoptose e a autofagia são consideradas “programadas” no que se refere ao seu controle estritamente genético. Já a



necrose e a catástrofe mitótica são vistos como processos meramente passivos em resposta a insultos celulares (RICCI; ZONG, 2006).

A autofagia é uma resposta ativa a falta de nutrientes, diferenciação e desenvolvimento, sendo então um processo adaptativo de resposta ao estresse metabólico, que resulta na degradação de proteínas e organelas (BREDESEN, 2007).

A autofagia é definida como um processo em que proteínas e organelas são degradadas por proteases lisossomais (RICCI; ZONG, 2006). Durante a autofagia, porções do citoplasma (organelas e proteínas) são encapsuladas em vesículas de membrana dupla, referida como autofagossoma (BREDESEN, 2007). Onde este, ao se fundir com lisossomas, sofre degradação de seus constituintes pelas hidrolases lisossomais (KIM *et al.*, 2006). A autofagia não é importante apenas para a degradação celular, mais também como fonte alternativa de nutrientes. O tamoxifeno e radiações  $\gamma$  podem induzir autofagia (RICCI; ZONG, 2006).

As principais características da necrose incluem: depleção energética, dano a membrana lipídica e perda da função homeostática de canais e bombas de íons. É bem caracterizada pela vacuolização do citoplasma, perda de integridade de membrana e aumento do volume celular (KRYSKO *et al.*, 2008). A necrose é induzida por inibidores da produção de energia celular, desbalanço no fluxo de cálcio, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de proteases não apoptóticas, cada um destes eventos potencializa o outro. A  $\beta$ -lapachona e o honokiol são exemplos de compostos que induzem necrose em células tumorais (RICCI; ZONG, 2006).

A catástrofe mitótica não é considerada uma forma de morte, mas sim um sinal irreversível para a morte (RICCI; ZONG, 2006), sendo principalmente associada a erros nos pontos de checagem do ciclo celular. É um processo resultante de mitose aberrante, durante a separação das cromátides irmãs (BREDESEN, 2007). Morfologicamente apresentam-se como células aumentadas e multinucleadas, e com defeitos mitóticos, como condensação nuclear incompleta, defeito no alinhamento dos cromossomos e dano DNA (BRUIN; MEDEMA, 2008).

O dano que leva a catástrofe mitótica pode ser induzido por fármacos quimioterápicos como agentes da hiperpolimerização dos microtúbulos (paclitaxel), agentes despolimerizantes de microtúbulos (vinblastina e vincristina) e inibidores de checkpoint quinase 1 (Chk1) (7-hidroxiestaurosporina) (RICCI; ZONG, 2006).

## 1.5 Apoptose

A apoptose é um fenômeno importante, bem caracterizado, na citotoxicidade induzida por fármacos anticâncer (KIM *et al.*, 2002; MADDIKA *et al.*, 2007;), sendo também um processo seletivo de deleção celular fisiológica (HENGARTNER, 2000), visto que ocorre para o controle da população celular e do tecido (VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000), desenvolvimento embrionário (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004), dentre outros processos fisiológicos e patológicos. Foi primeiramente descrita por Kerr *et al.* (1972).

A apoptose ocorre em resposta a uma variedade de estímulos ambientais, que afetam as células através de uma cascata pré-programada de eventos que culmina na degradação de constituintes celulares, subsequente desintegração e deleção celular (CONG *et al.*, 1994). Devido a esta cascata de eventos bioquímicos (HENGARTNER, 2000), as células demonstram alterações fenotípicas clássicas, tais como: diminuição do volume celular e nuclear, condensação e marginação da cromatina (OTT *et al.*, 2007), formação de blebbings na membrana celular, fragmentação do DNA e do núcleo, formação e liberação dos corpos apoptóticos (KROEMER; ZAMZAMI; SUSIN, 1997) e exposição da fosfatidilserina para reconhecimento por fagócitos (RICCI; ZONG, 2006; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

A maquinaria apoptótica pode ser dividida, de modo geral, em duas classes de componentes: sensores e efetores. Os sensores representam um grupo de moléculas responsáveis pelo monitoramento dos ambientes intra e extracelulares, para condições de normalidade ou anormalidade que influenciem se a célula deverá viver ou morrer. São estes sinais que regulam uma segunda classe de componentes, os efetores, moléculas responsáveis pela execução celular ou não, a depender do sinal enviado pelo sensor (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Nos sensores incluem-se receptores de superfície celular, nos quais se ligam fatores de sobrevivência (IGF-1/IGF-2, IL-3) ou de morte (Fas ligante, TNF- $\alpha$ ) (RICCI; ZONG, 2007). Os sensores intracelulares monitoram o bem estar celular e ativam a via de morte em resposta a detecção de anormalidades, como dano ao DNA, sinalização desbalanceada provocada por ação de oncogenes, insuficiência em fatores de sobrevivência, hipóxia, dentre outros. Um exemplo é a proteína p-53, supressora tumoral, capaz de induzir apoptose pela superexpressão de Bax, uma proteína pro-

apoptótica da família Bcl-2, em resposta ao dano ao DNA. A própria indução de apoptose causada por quimioterapia está associada a ativação de genes pro-apoptóticos e a supressão de genes antiapoptóticos, bem como compostos endógenos indutores de apoptose (THONEL; ERICKSSON, 2005).

As efetoras da apoptose são um grupo de proteases específicas nomeadas de caspases apoptóticas (THORNBERRY, 1998), que são uma classe de cisteíno-aspartil proteases responsáveis pela execução celular (HENGARTNER, 2000).

A família de caspases apoptóticas de mamíferos tem sido dividida em duas classes: caspases iniciadoras (2,8,9 e 10) e caspases efetoras (3,6 e 7), baseados em sua estrutura e função (HANAHAH; WEINBERG, 2000). Caspases iniciadoras diferem das efetoras por possuírem um grande domínio n-terminal que permite a interação com domínios de morte (DED) e domínios de recrutamento de caspases, presentes em FADD (Fas-associado ao domínio de morte) e o fator ativador de protease apoptótica 1 (Apaf-1), respectivamente.

Uma série de importantes substratos de caspases são implicados na morfologia característica da apoptose, a DNase ativada por caspase (CAD), existe constitutivamente ligada a uma subunidade inibitória, formando um complexo (ICAD). A caspase-3, ao ser ativada, cliva a subunidade inibitória, resultando na liberação e exposição da subunidade catalítica (HENGARTNER, 2000). Esta DNase cliva o DNA genômico entre nucleossomos, gerando fragmentos de DNA com pesos correspondentes a múltiplos de aproximadamente 180 pares de base. Outro substrato importante é a laminina, que quando clivada determina a diminuição do núcleo, picnose (HANAHAH; WEINBERG, 2000).

A ativação da apoptose ocorre por duas maneiras: via extrínseca e intrínseca (BREDESEN, 2007). A via intrínseca geralmente é ativada por sinais de estresse celular, que incluem dano ao DNA, altos níveis de espécies reativas de oxigênio, proteínas mal enoveladas, infecção viral e ativação de oncogenes (RICCI; ZONG, 2006; CRUCHTEN; BROECK, 2002; BREDESEN, 2007). A via extrínseca é ativada pela ligação de um ligando ao receptor de morte da membrana celular (HENGARTNER, 2000).

A via intrínseca pode ser representada tanto pela mitocôndria quanto pelo retículo endoplasmático. A via extrínseca é a mais específica via ativadora de caspases,

operando através dos receptores de morte (THONEL; ERIKSSON, 2005), sendo ativada por membros de duas famílias de proteínas: família do fator de necrose tumoral (TNF) e a dos receptores destes ligandos (RICCI; ZONG,2006). Membros da família do TNF ligam-se a receptores que ativam sinais envolvidos na resposta pró-inflamatória, não envolvidos com a morte celular. Alguns membros envolvidos na indução de apoptose são: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) , FasL (Fas ligante), ligante do receptor de TNF indutor de apoptose (TRAIL).

Ao se ligarem ao receptor recrutam proteínas adaptadoras que atraem a caspases 8 e 10, levando a clivagem autoproteolítica (RICCI; ZONG,2006), desta forma ativando estas caspases iniciadoras (HENGARTNER, 2000). Caspase-8 ativada, pode clivar o Bid, uma proteína pró-apoptótica da família Bcl-2, para sua forma truncada e ativa (tBid) (THONEL; ERIKSSON, 2005). tBid pode acionar então a homo-oligomerização e translocação de Bax e Bak, proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, para a mitocôndria, ativando a via intrínseca mitocondrial. TRAIL recombinante solúvel e anticorpo agonista de TRAIL, atualmente estão sendo avaliados clinicamente (KELLEY *et al.*, 2001; MARINE *et al.*, 2006).

A mitocôndria é uma organela semi-autônoma, que realiza funções essenciais no metabolismo celular, produção de ATP e na morte celular (GLOOVER *et al.*, 2007; KROEMER; ZAMZAMI; SUSIN, 1997). A via mitocondrial é regulada pela superfamília de proteínas Bcl-2, que consiste de três subfamílias: membros antiapoptóticos (Bcl-2 e Bcl-XL), que são localizados na membrana externa mitocondrial, mantendo a integridade da membrana. Um segundo grupo, Bid e Bim, que agem como sentinelas de processos celulares e organelas, que quando ativos, podem ativar um terceiro grupo de grandes membros apoptóticos, Bax, Bak e Bok, que localizam-se no citosol (KRYSKO *et al.*, 2008; HIGUCHI, 2007).

Um evento crítico para a ativação de caspases é a permeabilização da membrana externa mitocondrial, cujo mecanismo de origem ainda permanece controverso (RUSTIN, 2002; OTT *et al.*, 2007). De qualquer maneira, a formação de um poro de transição leva a entrada de água e grandes moléculas, fazendo com que a matriz mitocondrial aumente seu volume, até que ocorra um rompimento na membrana externa, levando a saída de componentes internos mitocôndrias, tais como citocromo C e Smac/Diablo. O Smac/Diablo é capaz de inativar inibidores endógenos da apoptose.

Enquanto que o citocromo C, interage com Apaf-1, ATP e pro-caspase 9, formando o apoptossoma, este cliva e ativa caspase-9 (FREY; SUN, 2008).

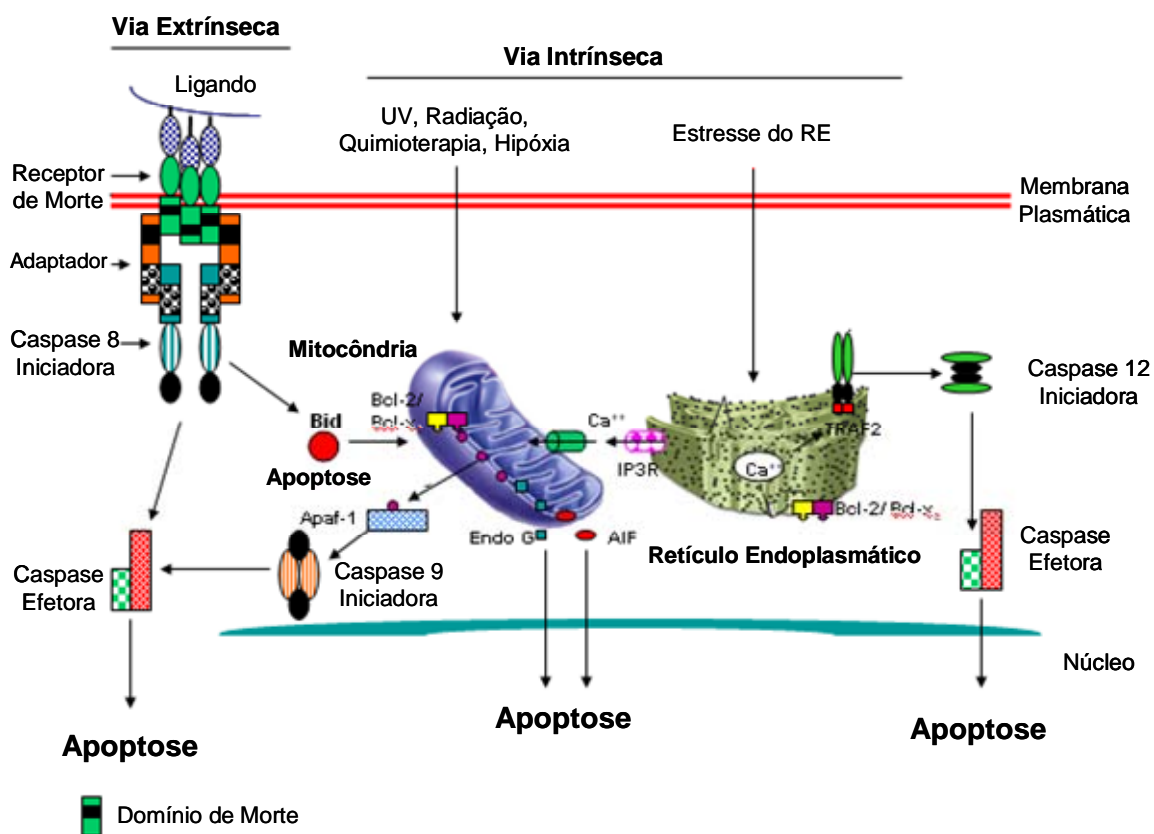
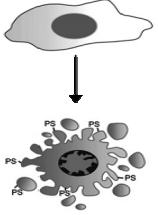
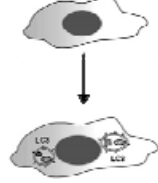
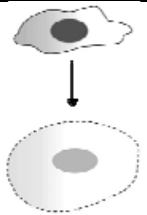
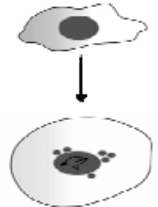


Figura 6: Esquema demonstrando as vias de ativação da apoptose e suas interconexões

Fonte: Gupta *et al.* (2006)

	<b>Apoptose</b>	<b>Autofagia</b>	<b>Necrose</b>	<b>Catastrofe Mitótica</b>
<b>Morfologia</b>				
Membrana celular	Íntegra, formação de “Blebbings”, exposição de fosfatidilserina	“Blebbings”	Perda da integridade	?
Núcleo	Condensação e marginação da cromatina, fragmentação do DNA	Condensação parcial da cromatina e possível segregação	Degradação randômica do DNA	Mal segregação cromossômica durante a citocinese, formação de micronúcleos
Citoplasma	Condensação dos fragmentos celulares associados a membrana celular “liberação de corpos apoptóticos”, Diminuição do volume celular	Aumento no número de vesículas autofágicas, degradação de organelas	Aumento do volume celular	

Quadro 1: Tipos de morte celular e suas características básicas. ( adaptado de: RICCI e ZONG, 2006; Kim *et al.*, 2006 e BREDESEN, 2007)

## 1.6 Terpenoides

São classificados como produtos naturais, cuja estrutura pode ser dividida em unidades de isoprenoides. Os isoprenos originam-se do acetato através da via do ácido mevalônico. Dentre os terpenoides, classificam-se como sesquiterpenoides, compostos formados por três unidades de isopreno. Enquanto que as lactonas sesquiterpênicas são quimicamente distintas dos sesquiterpenoides, por possuírem o anel  $\gamma$ -lactona, que em muitos casos pode conter um grupo  $\alpha$ -metileno (KIM *et al.*, 2006; SCOTTI *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2008; ).

As lactonas sesquiterpênicas podem ser classificadas de acordo com seu esqueleto carbocíclico, podendo ser divididas em (FERNANDES *et al.*, 2008):

- Germacranolideo (anel de 10 membros)
- Elemanolideo (anel de 6 membros)
- Eudesmanolideo (6/6, compostos biciclícos)
- Guaianolideo/Pseudoguaianolideo (5/7, biciclícos)

As lactonas sesquiterpênicas, apresentam uma grande variedade de arranjos em seus esqueletos, o que se correlaciona com a grande diversidade de atividades biológicas, tais como: antiinflamatória (YUUYA *et al.*, 1999), antimicrobiana, antitricomonas (IVASENKO *et al.*, 2000), citotóxica (CHEN *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2008; SCOTTI *et al.*, 2007), efeitos centrais e cardiovasculares (SCOTTI *et al.*, 2007).

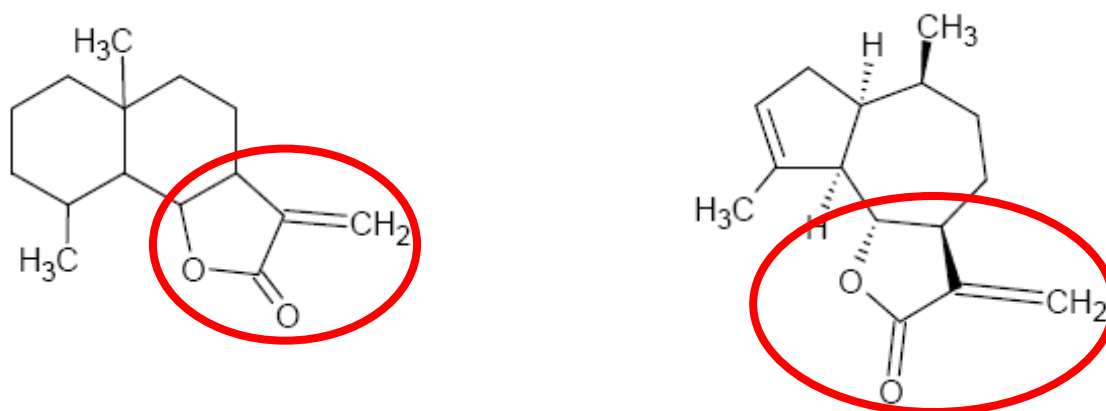


Figura 7: Esqueleto básico de eudesmanolídeos e guaianolídeos, nessa ordem. Em vermelho grupamento  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona

Suas atividades são mediadas principalmente por carbonilas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, como o  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona, uma ciclopentenona  $\alpha,\beta$ -insaturada ou um estér conjugado. Estes grupos estruturais reagem com nucleófilos, especialmente grupos sulfidrilícos expostos, como em resíduos de cisteínas em proteínas, sendo o alvo primário para a ação, inibindo desta forma uma variedade de funções celulares, o que direciona a célula para a apoptose (FERNANDES *et al.*, 2008). As diferenças na atividade entre SLs individuais pode ser explicada pelos diferentes números de elementos estruturais alquilantes (SCOTTI *et al.*, 2007).

O NF- $\kappa$ B é um importante fator de transcrição de genes envolvidos na inflamação, ciclo celular e apoptose (OCIO *et al.*, 2008; HEHNER *et al.*, 1998). Sendo alvo molecular mais comumente pesquisado nas ações das SLs (SCOTTI *et al.*, 2007). SLs inibem NF- $\kappa$ B por alquilar seletivamente a subunidade p65, provavelmente por reação com resíduos de cisteína (KONAKLIEVA; PLOTKIN, 2005; CHO *et al.*, 2004). Esta subunidade é requerida para a atividade transcricional do NF- $\kappa$ B (PRASAD *et al.*, 2008).

A importância do NF- $\kappa$ B na ação citotóxica das SLs pode ser observada pela sua importante participação na atividade de SLs de destaque como o partenolídeo (HEHNER *et al.*, 1998), 6-O-angeloilenolina (CHANGLONG *et al.*, 2008), e inuviscolídeo (ROZENBLAT *et al.*, 2008).

A  $\alpha$ -Santonina é uma sesquiterpeno lactona, reconhecida por sua atividade antipirética e analgésica. É muito utilizada como substrato para a síntese de diversas moléculas, dentre estas se pode citar as três que são objeto deste trabalho: 3-oxo-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-eudesma-1,4,11-trien-6,12-olideo (2), 11,13-dehidrolumissantonina (3) e 10 $\alpha$ -acetoxi-3-oxo-1,7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-guai-4,11-dien-6,12-olideo (4).

A santonina é comumente encontrada em plantas da família Compositae (KIM *et al.*, 2006). Existe em sua forma  $\alpha$  e  $\beta$ , nas quais exibe atividade antipirética similar a dopamina, antiparasitária, antiinflamatória e inibe a germinação de esporos (IVASENKO *et al.*, 2000). É uma molécula simples, sendo utilizada por diversos pesquisadores como substrato para a síntese de moléculas com atividades biológicas diversas (YUUYA *et al.*, 1999). Seus derivados apresentam atividade citotóxica e alguns induzem diferenciação em HL-60 (YUUYA *et al.*, 1999), uma linhagem de leucemia humana promielocítica.



O partenólídeo foi isolado de *Tanacetum parthenium*, é capaz de inibir NFκB e assim o sinal transdutor e ativador da transcrição (STATs) de mediar a transcrição de genes antiapoptóticos e aumentar o nível intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS), é capaz de induzir morte celular em linhagens de células tumorais (PAJAK *et al.*, 2008). O costunolideo, é outra lactona sesquiterpênica bem estudada, causa citotoxicidade ao atuar no citoesqueleto, promovendo a polimerização dos microtubulos, sem, no entanto, interferir com a ação do paclitaxel, o que sugere um provável novo sítio de ação. O costunolideo e o isocostunolideo são capazes de causar downregulation de Bcl-2 e ativação de caspase-3 (CHEN *et al.*, 2007). Diferentemente o isocostunolideo é capaz de induzir despolarização mitocondrial sem envolvimento de alteração nos níveis de ROS (CHEN *et al.*, 2007).

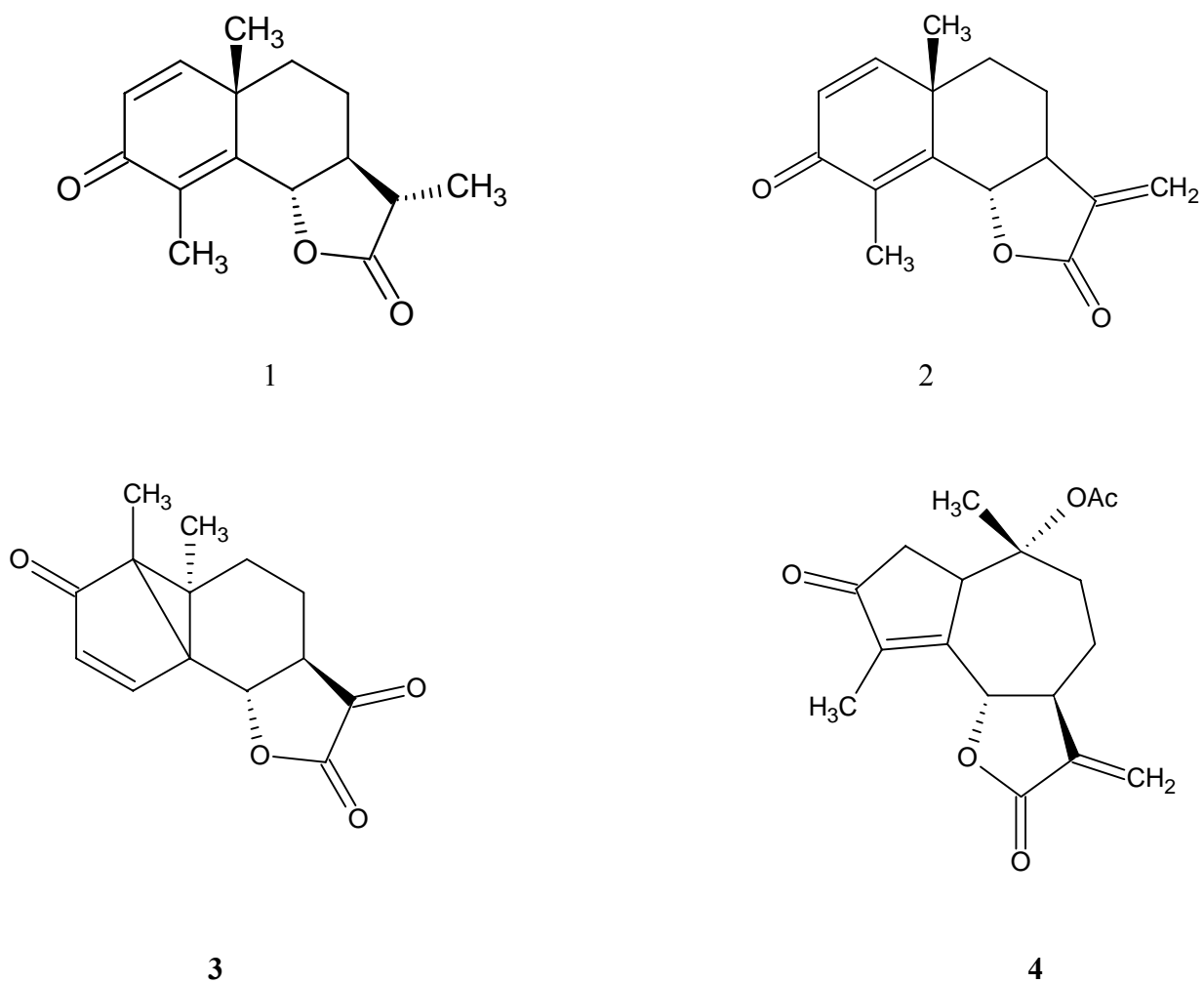
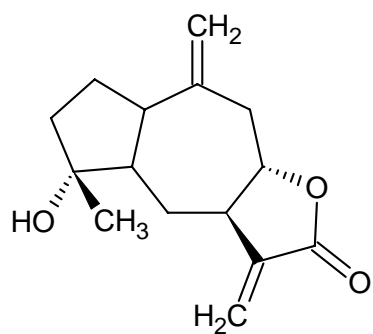
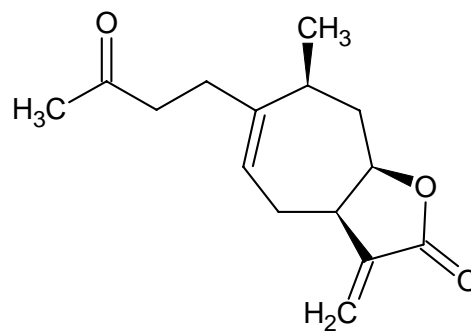


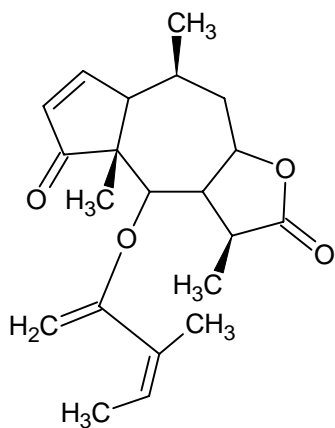
Figura 8: Estrutura química da  $\alpha$ -santonina (1) e seus derivados 3-oxo-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-eudesma-1,4,11-trien-6,12-olideo (2), 11,13-dehidrolumissantonina (3) e 10 $\alpha$ -acetoxi-3-oxo-1,7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-guai-4,11-dien-6,12-olideo (4).



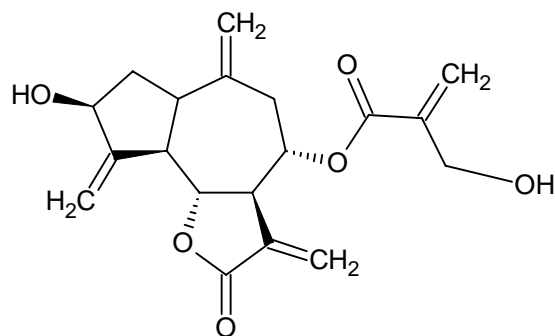
Inuviscolídeo



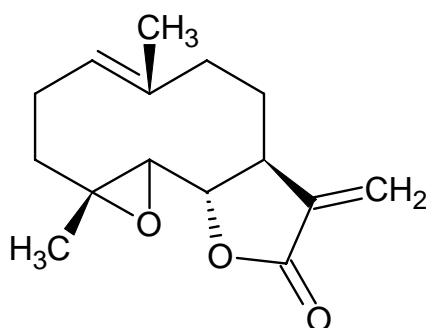
Tomentosina



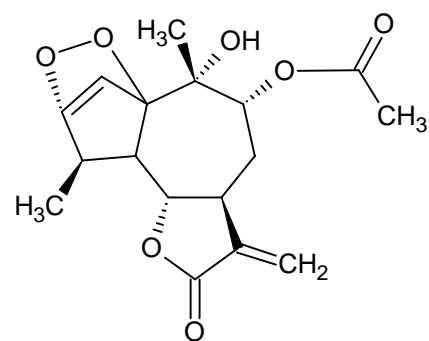
6-O-angeloilienolina



Cinaropicrina

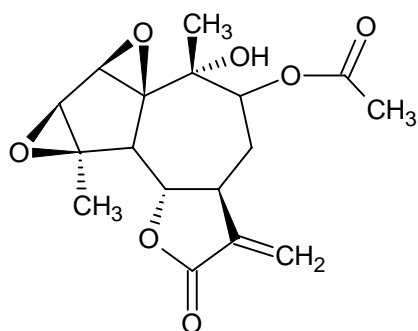
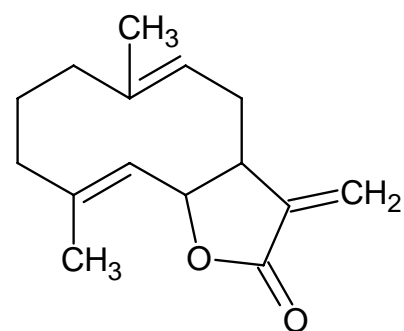


Partenolídeo

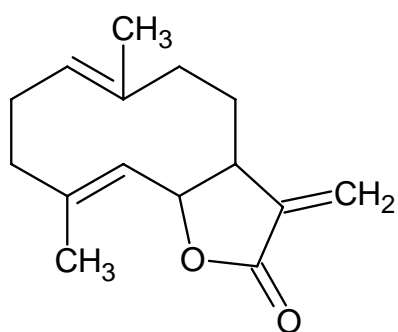


Apressina

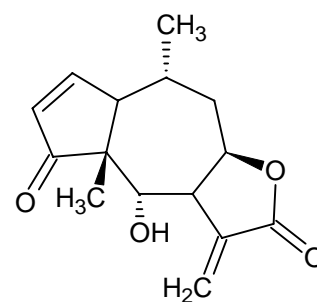
**Figura 9: Estruturas de sesquiterpeno lactonas com atividade citotóxica**

9- $\alpha$ -acetoxi-artecanina

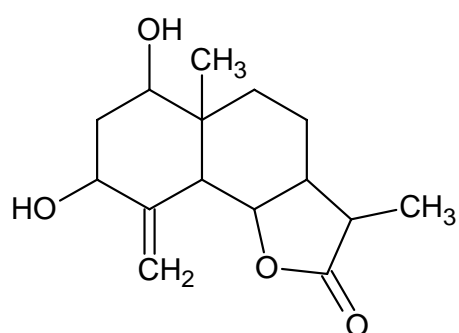
Isocostunolídeo



Costunolídeo



Helenalina



Erivanina

**Figura 10: Estruturas de sesquiterpeno lactonas com atividade citotóxica**

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar o potencial citotóxico de três novos derivados da  $\alpha$ -Santonina(3-oxo-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-eudesma-1,4,11-trien-6,12-olideo; 11,13-dehidrolumissantonina; 10 $\alpha$ -acetoxi-3-oxo-1,7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-guai-4,11-dien-6,12-olideo) em modelos experimentais *in vitro*, a fim de delinear o seu mecanismo de ação

### 2.2 Específicos

- Determinar a atividade citotóxica e hemolítica dos derivados em células tumorais e em eritrócitos de camundongos, respectivamente.
- Determinar a citotoxicidade frente a células mononucleares do sangue periférico
- Investigar qual o principal tipo de morte celular induzida pelos compostos.
- Delinear o provável mecanismo de ação dos derivados, utilizando a linhagem HL-60 como modelo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### Equipamentos

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2®

Agitador de tubo, Donner AD 8850®

Banho-maria, DELTA Modelo 105Di®

Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212®

Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206®

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403®

Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin®

Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte mini®

Deonizador de água Milli-Q, Milipore®

Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter®

Fluxo laminar, VECO®

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

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

Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070®

Microondas, Panasonic®

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

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot®

Microscópio de fluorescência, Olympus®

pHmetro, Micronal B474®

Pipetas automáticas, Gilson®

**Soluções, Reagentes e Fármacos**

Ácido Acético	-	Vetec®
Ácido Clorídrico	-	Vetec®
Álcool Etilico	-	Vetec®
Alamar Blue (Resazurina)	0,312 mg/mL	Sigma®
Anticorpo anti-BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU BSA 5 % q.s.p. 500 µL de solução	Sigma® Dako®
Anticorpo biotinilado anti- imunoglobulina de camundongo	1 µL de anticorpo anti-imunoglobulina BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução	Sigma®
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® -
BrdU 10mM	-	Sigma®
Brometo de Etídio 100 µg/mL	1mg de brometo de etídeo PBS q.s.p 10 mL de solução	Sigma® -
Citrato de Sódio	-	Grupo Química®
Cloreto de Sódio (NaCl)	-	Labsynth®
Diaminobenzidina (DAB)	5 µL de DAB 1 mL de Tris-HCl (Tris 0,05M) pH= 7,6 2 µL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Immunotech® Proquímios® Proquímios®

Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	Vetec®
Doxorrubicina – fornecida pelo Instituto do Câncer do Ceará – ICC	-	Zodiac®
Estreptavidina – peroxidase	1 µL de Estreptavidina – peroxidase BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução	Sigma® Dako®
Ficoll	-	Sigma®
Fitohemaglutinina	-	Sigma®
Iodeto de propídeo 50 µg/mL	1 mg de iodeto de propídeo PBS q.s.p. 50 mL	Boehringer®
Laranja de Acridina	1 g de laranja de acridina (100 µg/mL) H <sub>2</sub> O q.s.p. 10 mL de solução	Fluka® -
Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e esterelizada, filtrado em filtro millipore (0,22 µm) e complementado com SBF 10 %, 1 % de glutamina, 1 % de antibióticos, 1 % de bicarbonato de sódio (0,75 %) e 25 mM de HEPES	Cultilab®
MTT	20 mg de MTT PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® -
Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab® Cultilab®



Solução desnaturante (para análise de incorporação de BrdU)	Formamida 70 % 2x SSC (pH entre 6,5 e 7,5 a 70 °C)	Vetec®
Soro fetal bovino	-	Cultilab®
Solução salina (para hemólise)	8,5 g de Cloreto de sódio (0,85 %)	Labsynth®
	1,11 g de Cloreto de cálcio (10 mM)	Reagen®
	H <sub>2</sub> O q.s.p 1 L de solução	-
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5 M	-
	Citrato de sódio 0,15 M	-
	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®
	450 mL de PBS	-
Triton X -100	-	Isofar®

### **Modelos biológicos**

Camundongos albinos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss

Linhagens celulares tumorais mantidas em cultura (**Tabela 2**)

Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)

### **Amostras**

- $\alpha$ -Santonina (1) (UFV)
- 3-oxo-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-eudesma-1,4,11-trien-6,12-olideo (2) (UFV)
- 11,13-dehidrolumissantonina (3) (UFV)
- 10 $\alpha$ -acetoxi-3-oxo-1,7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-guai-4,11-dien-6,12-olideo (4) (UFV)
- Doxorrubicina (controle positivo) (Zodiac)

### **3.2 Determinação da Atividade Citotóxica**

Os três derivados da  $\alpha$ -Santonina, compostos 2, 3 e 4, foram investigados quanto a induzir citotoxicidade nas linhagens de células tumorais. A citotoxicidade foi avaliada através do método de MTT (MOSMANN, 1983), o qual vem sendo utilizado no programa de 'screening' do 'National Cancer Institute - NCI' dos Estados Unidos, que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato que analisa a viabilidade e o estado metabólico da célula, baseado na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Ou seja, a solução amarela do MTT é reduzida pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas em um cristal roxo.

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL para células em suspensão), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 h, quando necessário as células foram repicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de 0,5-1,0 x 10<sup>6</sup> céls/mL.

As substâncias previamente diluídas em DMSO puro estéril para a concentração estoque de 5 mg/mL foram diluídas seriadamente em meio RPMI para obtenção das concentrações finais (0,039-25 µg/mL) e adicionadas em placa de 96 poços (100 µL/poço). O quimioterápico doxorubicina foi usado como controle positivo. Após um período de incubação de 72 h, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm/15 min. O sobrenadante foi aspirado e foi adicionado 200 µL de solução de MTT 10 % em RPMI 1640, sendo a placa colocada na estufa a 5 % de CO<sub>2</sub> por 3 h. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm/10 min, tendo o sobrenadante aspirado e seu precipitado ressuspenso em 150 µL de DMSO e agitado por cerca de 10 min, até completa dissolução dos cristais de formazan.. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placas a um comprimento de onda de 595 nm.

**Tabela 2: Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* através do método do MTT.**

<b>Linhagem Celular</b>	<b>Tipo Histológico do Câncer/Origem</b>	<b>Concentração de Plaqueamento (células/mL)</b>
<b>HL-60</b>	Leucemia promielocítica humana	0,3 x 10 <sup>6</sup>
<b>MDA-MB 435</b>	Melanoma humano	0,1 x 10 <sup>6</sup>
<b>UACC-257</b>	Pele humano	0,1 x 10 <sup>6</sup>
<b>HCT-8</b>	Carcinoma de cólon humano	0,7 x 10 <sup>5</sup>
<b>PC-3</b>	Carcinoma de próstata humano	0,1 x 10 <sup>6</sup>
<b>SF-295</b>	Glioblastoma humano	0,1 x 10 <sup>6</sup>
<b>A704</b>	Rins humano	0,6 x 10 <sup>5</sup>
<b>OVACAR - 8</b>	Ovário humano	0,1 x 10 <sup>6</sup>
<b>A-549</b>	Câncer de Pulmão	0,1 x 10 <sup>6</sup>

## **Análise dos dados**

As drogas foram testadas em diluição seriada, em triplicata. Suas  $CI_{50}$  (concentração inibitória média capaz de provocar 50 % do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95 %) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 3.0 (GraphPad Software).

### **3.3 Determinação da Atividade Hemolítica**

Esta metodologia, segundo Costa-Lotufó *et al.* (2002), permite avaliar o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

O sangue foi coletado de três camundongos Swiss (*Mus musculus*) por via orbital, sendo diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85 % + CaCl<sub>2</sub> 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 3 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm/3 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 2 %. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. 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 da substância teste. 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 1,56 a 200 µg/mL. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 h, sob agitação constante à temperatura ambiente (26 ± 2 °C), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/3 min) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540 nm.

### 3.3 Estudos de Mecanismo de Ação

#### 3.3.1 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 observar uma coloração azulada nas células mortas.

Células da linhagem HL-60, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  céls/mL, foram incubadas por 24 h com as amostras, nas concentrações de 1 e 2  $\mu$ M estimadas a partir do valor da  $CI_{50}$  encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular. Foram retirados 90  $\mu$ L da suspensão de células e adicionado a 10  $\mu$ L do azul de tripan. As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer. A doxorubicina (0,3  $\mu$ g/mL) foi usada como controle positivo.

#### Análise dos dados

Os dados foram expressos como da média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes ( $n = 3$ ). 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, usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA) com nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ).

#### 3.3.2 Inibição da síntese de DNA – Ensaio do BrdU

Células da linhagem HL-60, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  céls/mL, foram incubadas por 24 h com os derivados da  $\alpha$ -Santonina e examinadas ao microscópio de inversão, nas concentrações de 1 e 2  $\mu$ M. Três horas após a adição do BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina) na cultura de células, lâminas para cada amostra foram preparadas e postas para secar por 2 h. Após o período de secagem foram fixadas em metanol: ácido

acético (7:1,5) por 5 min. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 min a 70 °C e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram circuladas com caneta hidrofóbica, incubadas com anticorpo primário e deixada na geladeira durante a noite em câmara úmida. As células foram incubadas com anticorpo secundário biotinado por 20 min e, em seguida, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 min. Em seguida, são adicionados os anticorpos e um cromógeno específico, a diaminobenzidina (DAB). Para corar as células não marcadas pelo cromógeno, utiliza-se hematoxilina (0,1 %). Consideram-se positivas para proliferação, as células de núcleo corado pelo DAB (cor marrom) e, negativas, as células de núcleo corado com hematoxilina (cor azul).

### **Análise dos dados**

Duzentas células foram contadas, diferenciando-as entre núcleo marrom (incorporaram o BrdU) e não-marrom (não incorporam o BrdU). Os dados foram expressos como da média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes ( $n = 2$ ). A proporção de células marcadas em marrom e não-marcadas entre os diferentes grupos foi comparada pelo teste  $\chi^2$  com nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ) usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

### 3.3.3 Coloração diferencial por BE/LA

O método de coloração por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da revelação por fluorescência com base em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (McGAHON *et al.*, 1995).

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. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. O BE marca muito fracamente ou muitas vezes não marca, pois não atravessa membranas não lisadas. As células em apoptose

inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE. Morfologicamente, observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células que estão em apoptose tardia têm aparência alaranjada devido a algum dano de membrana que permite a entrada de pequena quantidade de BE. Já as células necróticas, por apresentarem intenso dano à membrana plasmática, coram-se de vermelho intenso.

Células da linhagem HL-60, plaqueadas na concentração de  $0,3 \times 10^6$  céls/mL, foram incubadas por 24 h com os derivados da  $\alpha$ -Santonina nas concentrações de 1 e 2  $\mu$ M. A suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 5 min em baixa rotação ( $10 \times g/5$  min. correspondente a 1000 rpm/5 min.). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20  $\mu$ L de solução de PBS. Em seguida, 1  $\mu$ L da solução de BE/LA (1:1) 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 Doxorubicina (0,3  $\mu$ g/mL) foi usada como controle positivo.

### **Análise dos dados**

Para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas), foram contadas 300 células de cada amostra e montadas em lâminas que foram fotografadas para o registro visual de possíveis alterações. Os dados foram expressos como da média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes ( $n = 3$ ). 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 ( $p < 0,05$ ), usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

#### 3.3.4 Determinação da Integridade de Membrana

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

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, e incubadas por 24 h com os derivados nas concentrações de 1 e 2  $\mu$ M. A doxorubicina (0,3  $\mu$ g/mL) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50  $\mu$ L da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 5 minutos com 100 $\mu$ L de PI (50 $\mu$ g/mL). Em seguida as amostras foram analisadas através do programa Guava Express Plus (Guava Technologies).

### **Análise de dados**

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes ( $n = 3$ ). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados serão comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### **3.3.5 Ciclo celular e fragmentação de DNA**

O método consiste na capacidade do iodeto de propídeo se ligar ao DNA das células, para tanto a membrana plasmática foi primeiramente lisada por um detergente, permitindo assim a entrada do corante no núcleo. O ciclo celular é constituído pelas seguintes fases: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M, cada uma com uma quantidade de DNA, o que possibilita a determinação da fase do ciclo em que a célula se encontra. O sub-G<sub>1</sub>,



representa o DNA fragmentado e que, portanto emite baixa fluorescência, sendo indicativo de apoptose.

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, e incubadas por 24 h com os derivados nas concentrações de 1 e 2  $\mu$ M. A doxorrubicina (0,5  $\mu$ M) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50  $\mu$ L da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 30 minutos com 100 $\mu$ L de uma solução de lise contendo PI (50 $\mu$ g/mL), Triton X-100 (0,1%) e citrato de sódio (0,1%). Em seguida as amostras foram analisadas através do programa Guava Express Plus (Guava Technologies), onde foram obtidas histogramas representando a quantidade de células em cada fase do ciclo celular ( $G_1$ , S e  $G_2/M$ ) e a quantidade de células com DNA fragmentado.

### **Análise de dados Programa de análise do ciclo**

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes ( $n = 3$ ). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados serão comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### **3.3.6 Despolarização Mitocondrial**

A apoptose pode ser ativada por duas vias, extrínseca e intrínseca. A via intrínseca envolve a participação da mitocôndria, sendo também denominada de via mitocondrial.

A via mitocondrial é ativada pela saída do citocromo C da intermembrana mitocondrial para o citosol (BARNARD; BERNES-PRICE, 2007). A permeabilidade da membrana mitocondrial para o citocromo C é determinada pela formação de um poro de membrana que altera o potencial mitocondrial. Dessa maneira, detecções de alterações no potencial de membrana mitocondrial resultam da ativação da via intrínseca mitocondrial.

A rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, é sequestrado pra dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico normal. A rodamina 123 é atraída pelas cargas positivas da mitocôndria em células viáveis, enquanto, nas células em apoptose a membrana mitocondrial foi despolarizada, não ocorrendo acúmulo de rodamina 123, essas células emitem fluorescência baixa.

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, e incubadas por 24 h com os derivados nas concentrações de 1 e 2  $\mu$ M. A doxorubicina (0,3  $\mu$ g/mL) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50  $\mu$ L da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 15 minutos com 200 $\mu$ L de uma solução de rodamina 123 (1  $\mu$ g/mL em PBS), na ausência de luz e a 37 °C. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em PBS e reincubado por mais 30 minutos e analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies).

### **Análise dos dados**

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes (n = 3). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### **3.3.7 Ensaio da Anexina V**

É baseado na observação de que durante a indução de apoptose, a fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana interna, é externalizado, servindo como marcação de que a célula deverá ser fagocitada. A anexina V pode ligar-se a fosfatidilserina com grande afinidade e seletividade. As células não marcadas são ditas viáveis, já as células marcadas apenas com anexina V estão em apoptose inicial.

Células em necrose, de alguma maneira até agora desconhecida, podem expressar um pouco de fosfatidilserina, para compensar é adicionado um corante que se ligue ao DNA, mas não permeável a membrana íntegra como o brometo de etídio. Haverá perda da integridade de membrana nas células em apoptose tardia, onde estarão marcadas pela anexina V e também pelo brometo de etídio, enquanto aquelas células marcadas apenas com o brometo serão as células em necrose. As células não marcadas, são ditas viáveis, já as células marcadas apenas com anexina V estão em apoptose inicial.

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, e incubadas por 24 h com os derivados nas concentrações de 1 e 2  $\mu$ M. A doxorubicina (0,5  $\mu$ M) foi usada como controle positivo. Qual Kit foi usado

### **Análise dos dados**

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes ( $n = 3$ ). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 3.3.8 Ensaio de caspases 3 e 7

As caspases apoptóticas são aspartil-proteases envolvidas com a iniciação e execução do estímulo apoptótico. As caspases 3 e 7 são reconhecidas como caspases executoras, pois são elas que clivam substratos responsáveis pela morfologia da célula em apoptose.

O ensaio de caspase permite avaliar a presença de caspases ativas, visto que as caspases são sintetizadas como zimógenos (inativos), sendo encontrada ativa em células em apoptose. Para facilitar a distinção entre apoptose e necrose foi adicionado um corante que se liga ao DNA, o 7-AAD (7-amino-actinomicina-D). Para confirmar a presença de caspases 3 e 7 ativas foi utilizado o substrato específico SR-DEVD-FMK,

que possui sítios de clivagem específicos. Quando há degradação do substrato, há aumento da fluorescência detectado pelo citômetro de fluxo.

Células não marcadas são classificadas como viáveis, as marcadas apenas com caspase são classificadas como em apoptose inicial. Células com caspases ativas, mas permeáveis ao brometo de etídeo estão em apoptose tardia, já as marcadas apenas com brometo são células necróticas.

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, e incubadas por 24 h com os derivados nas concentrações de 1 e 2  $\mu$ M. A doxorubicina (0,5  $\mu$ M) foi usada como controle positivo.

### **Análise dos dados**

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes ( $n = 3$ ). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 3.3.9 Coloração por May-Grunwald-Giemsa

A coloração por May-Grunwald-Giemsa se baseia em interações eletrostáticas entre os corantes e moléculas-alvo. Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. Após o término de incubação (24h) lâminas foram preparadas, com 50 $\mu$ L da suspensão de células, em citocentrífuga (cytospin) e fixadas com metanol 100% por 1 minuto. Em seguida as lâminas foram coradas com May-Grunwald, por 10 seg, e em seguida com Giemsa por 10 seg.

### **Análise dos dados**

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

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Determinação da Atividade Citotóxica in vitro

A atividade citotóxica da  $\alpha$ -santonina e seus derivados em 9 linhagens de células tumorais e em Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) é apresentada na tabela 3, após 72 horas de exposição. Doxorubicina foi utilizada como controle positivo, para todos os ensaios.

Para avaliação da citotoxicidade nas linhagens tumorais utilizou-se o teste do MTT. Os resultados estão expressos na tabela 3. O protótipo do grupo,  $\alpha$ -santonina, não apresentou atividade em nenhuma das linhagens tumorais testadas. Os derivados apresentaram ação em todas as linhagens tumorais testadas, destacando-se a pronunciada ação do grupo na linhagem leucêmica (HL-60) e de colón (HCT-8).

Em HL-60 as  $CI_{50}$  obtidas foram de 1,14 (0,23- 2,77); 2,30 (1,87- 2,84) e 1,60 (1,09- 2,35)  $\mu$ M, para os compostos 2, 3 e 4, respectivamente. Enquanto em HCT-8 os compostos 2,3 e 4 obtiveram 2,92 (0,98- 4,86); 1,96 (1,64- 2,29) e 0,36 (0,16- 0,79)  $\mu$ M, respectivamente. Para avaliar o grau de toxicidade frente a células normais foi realizado o ensaio do Alamar Blue em PBMC. O composto 2 foi o mais tóxico com  $CI_{50}$  de 3,24, enquanto o 4 foi moderadamente (10,75) e o 3 o menos tóxico para células normais (16,77).

### 4.2 Atividade hemolítica

Este ensaio permite avaliar o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total, por meio da utilização de eritrócitos de camundongos (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002).

Nenhum dos derivados ou o protótipo ( $\alpha$ -santonina) testado foi capaz de causar hemólise ( $EC_{50} > 200 \mu$ g/mL), desta forma pode-se inferir que a atividade citotóxica não é dependente de lise da membrana plasmática (Tabela 4).

**Tabela 3: Atividade citotóxica *in vitro* de derivados da  $\alpha$ -Santonina em 9 linhagens de células tumorais e em células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Resultados expressos em  $\mu$ M e seus respectivos intervalos de confiança, correspondentes a três experimentos independentes.**

<b>Composto</b>	<b>HL-60</b>	<b>SF-295</b>	<b>HCT-8</b>	<b>MDA-MB-435</b>	<b>UACC-257</b>	<b>A549</b>	<b>OVACAR8</b>	<b>A704</b>	<b>PC-3</b>	<b>PBMC</b>
<b>Dox</b>	0,04 0,03-0,05	0,48 0,34-0,72	0,02 0,02-0,03	0,96 0,68-1,32	0,60 0,51-0,70	0,72 0,54-1,54	0,51 0,26-0,96	2,00 1,46-2,72	1,32 0,62-1,56	1,66 0,89-3,10
<b><math>\alpha</math>-Santonina</b>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>2</b>	1,14 0,23-2,77	2,70 0,67-1,90	2,92 0,98-4,86	6,74 5,56-7,21	6,05 5,26-6,56	13,43 12,56-13,98	6,94 6,53-7,26	10,14 9,23-11,23	13,04 12,56-13,78	3,24 (1,6-5,3)
<b>3</b>	2,30 1,87-2,84	2,15 1,90-2,40	1,96 1,64-2,29	4,57 3,26-5,32	4,87 4,32-5,12	14,50 14,01-14,87	3,88 3,12-4,21	3,61 3,01-3,89	5,07 4,85-5,79	16,77 (7,3-36,8)
<b>4</b>	1,60 1,09-2,35	3,06 2,52-3,70	0,36 0,16-0,79	8,84 5,62-10,23	7,76 5,56-8,23	10,23 9,53-11,56	8,67 8,01-8,98	9,24 8,56-10,23	14,41 14,02-14,97	10,75 (4,6-23,3)

### Atividade hemolítica:

**Tabela 4: Avaliação do potencial hemolítico da  $\alpha$ -santonina e seus derivados 2, 3 e 4. EC<sub>50</sub>: concentração efetiva em que a substância-teste causa hemólise em 50% dos eritrócitos. Resultados expressos em  $\mu\text{g/mL}$  e  $\mu\text{M}$ .**

Amostras	EC <sub>50</sub> $\mu\text{g/mL}$ ( $\mu\text{M}$ )
1	> 200 $\mu\text{g/mL}$ (819 $\mu\text{M}$ )
2	> 200 $\mu\text{g/mL}$ (819 $\mu\text{M}$ )
3	> 200 $\mu\text{g/mL}$ (819 $\mu\text{M}$ )
4	> 200 $\mu\text{g/mL}$ (658 $\mu\text{M}$ )

### 4.3 Estudo do mecanismo de citotoxicidade

Para o estudo do mecanismo de ação dos derivados foi escolhida a linhagem leucêmica HL-60 como modelo, visto que no ensaio de MTT foi a linhagem mais sensível ao tratamento com os derivados. A  $\alpha$ -santonina não foi estudada, uma vez que não apresentou atividade no ensaio do MTT. Os derivados foram testados na concentração de 1 e 2  $\mu\text{M}$ , no período de 24 horas de tratamento.

#### 4.3.1 Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular pela exclusão do azul de tripan permite a contagem diferencial em células viáveis e não viáveis, pela capacidade ou não de excluir o corante azul de tripan.

Na concentração de 2  $\mu\text{M}$ , todos os derivados foram capazes de diminuir significativamente o número de células viáveis. A redução do número de células viáveis para a doxorubicina e os compostos 2, 3 e 4 foi de 65, 72, 66 e 74%, respectivamente. Os dados são mostrados na figura 11. Não houve diferença entre a ação dos mesmos. Não ocorreu alteração no número de células não viáveis, dados não mostrados.

#### 4.3.2 Inibição da síntese de DNA – incorporação do BrdU

O ensaio de incorporação do BrdU permite avaliar a capacidade de compostos em diminuir o número de células capazes de incorporar o BrdU, um análogo da timidina. A taxa de inibição é representada pela razão entre as células BrdU<sup>+</sup> do grupo tratado e pelas BrdU<sup>+</sup> do controle.

Todos os derivados foram capazes de diminuir o número de células BrdU<sup>+</sup>, em todas as concentrações testadas. Não havendo diferença estatística entre os mesmos.

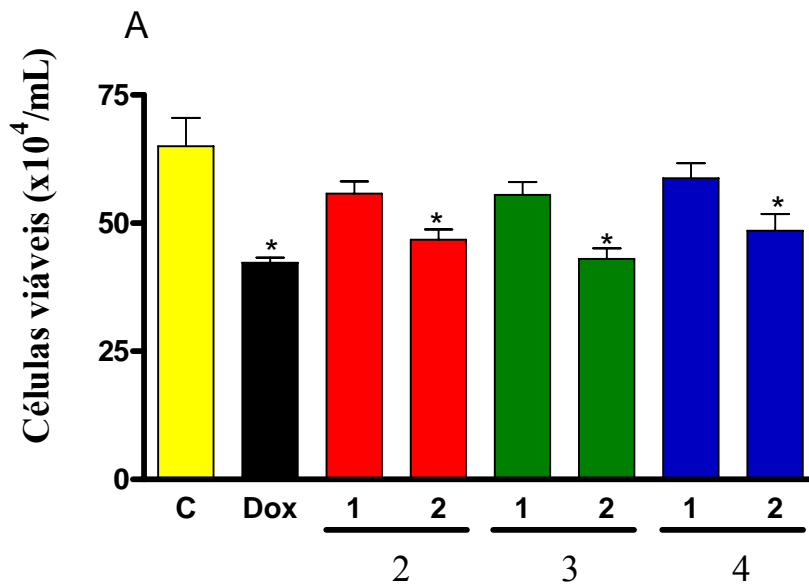


Figura 11: Efeito das 2, 3 e 4 nas concentrações de 1 e 2 μM na viabilidade de células leucêmicas HL-60 determinado por Exclusão do Azul de Tripán após 24 horas de incubação.

Nota: O controle negativo representa as células não tratadas. O quimioterápico Doxorrubicina (0,55 μM) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem a média +- E.P.M. de experimentos independentes (N=3). \* p < 0,001 comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls Test.



**Tabela 5: Efeito dos derivados da  $\alpha$ -Santonina 2, 3 e 4 na incorporação do 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) em células leucêmicas de HL-60, após 24 horas de incubação.**

<b>Substâncias</b>	<b>Concentração (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Céls BrdU positivas (%)</b>	<b>T/C</b>
<b>C</b>	-	<b>51,38</b>	-
<b>DOX</b>	<b>0,55</b>	<b>29,38 *</b>	<b>0,43</b>
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>34,13 *</b>	<b>0,44</b>
	<b>2</b>	<b>35,63 *</b>	<b>0,41</b>
<b>3</b>	<b>1</b>	<b>37,88 *</b>	<b>0,27</b>
	<b>2</b>	<b>27,25 *</b>	<b>0,47</b>
<b>4</b>	<b>1</b>	<b>28,50 *</b>	<b>0,45</b>
	<b>2</b>	<b>28,00 *</b>	<b>0,46</b>

Os dados correspondem a media de células positivas (%) de três experimentos independentes. T/C = tratado/controlado.

#### 4.3.3 Coloração por BE/LA

Durante processos de morte celular as células apresentam alterações morfológicas típicas. Na apoptose a membrana celular permanece íntegra, há formação de corpos apoptóticos, condensação da cromatina e outros. Enquanto na necrose a característica básica é a perda da membrana celular.

A laranja de acridina é um corante permeável a todas as células, enquanto o brometo de etídio não. Então células marcadas com BE estão em necrose, já as marcadas com LA, e com morfologia típica de apoptose são as células apoptóticas.

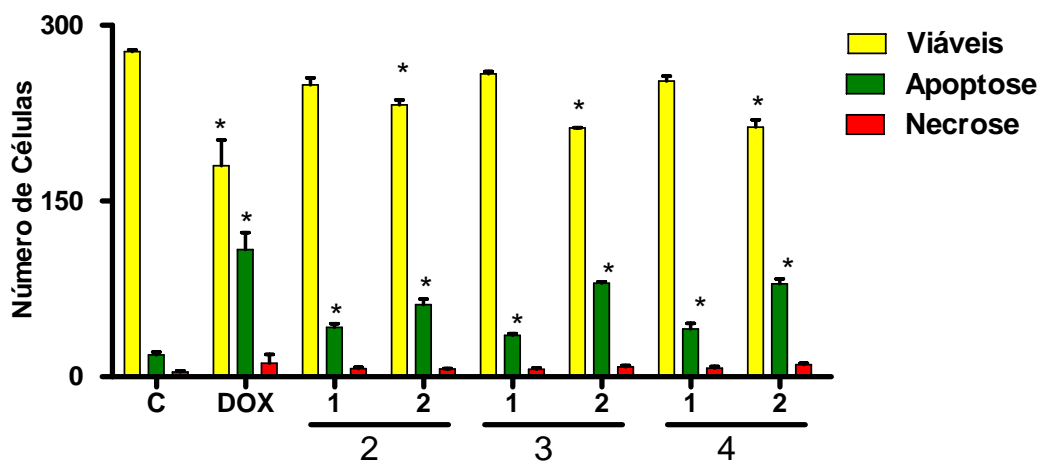
Todos os compostos na concentração de 2  $\mu$ M foram capazes de diminuir o número de células viáveis. Não houve diferença entre a ação dos compostos na diminuição do número de células viáveis.

Ocorreu um aumento no número de células apoptóticas de forma linear em todos os grupos tratados. Ocorreu diferença significativa entre a ação dos compostos apenas na maior concentração testada, onde o 2 obteve um menor número de células apoptóticas (61,50),

enquanto o 3 e o 4 apresentaram valores similares de 79,75 e 79,25, não havendo diferença entre os mesmos.

Não ocorreu alteração no número de células com características de necrose em nenhuma das amostras.

### Padrão de Morte Celular - Acridina Laranja/Brometo de Etídio



**Figura 12:** Avaliação da atividade dos derivados 2, 3 e 4 nas concentrações de 1 e 2  $\mu\text{M}$ , sobre o padrão de morte celular em células leucêmicas HL-60 e analisada por brometo de etídio/laranja de acridina após 24 horas de incubação

Nota: O controle negativo representa as células não tratadas. O quimioterápico Doxorrubicina (0,55  $\mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes (N=3). \*  $p < 0,001$  comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls Test.

#### 4.3.4 Proliferação celular – Concentração de células

A diminuição da proliferação celular implica uma diminuição na concentração de células.

O composto 2 não foi capaz de diminuir a concentração de células, apenas o composto 3 em 2  $\mu\text{M}$  e o 4 em ambas concentrações testadas. Não houve diferença entre as ações dos compostos.

#### 4.3.5 Determinação da integridade da membrana plasmática

A integridade de membrana plasmática é um ponto que distingue as células em apoptose das em necrose, visto que as primeiras possuem a membrana íntegra, enquanto que as últimas perdem a integridade da membrana.

Apenas o composto 2 na maior concentração de 2  $\mu\text{M}$  reduziu de forma significativa a integridade da membrana.

#### 4.3.6 Determinação do potencial mitocondrial

A mitocôndria representa a organela de força celular, devido a sua importância na produção de ATP. A mitocôndria desempenha um papel chave no desencadeamento da via intrínseca da apoptose, visto que injúrias a esta organela podem ser gatilhos para a apoptose.

Com o intuito de determinar a participação da via intrínseca mitocondrial foi determinado o potencial de membrana da mitocôndria, visto que alterações no potencial determinam a liberação de componentes internos da organela responsáveis pela ativação de caspases. Nenhum dos compostos alterou o potencial mitocondrial (Figura 15).

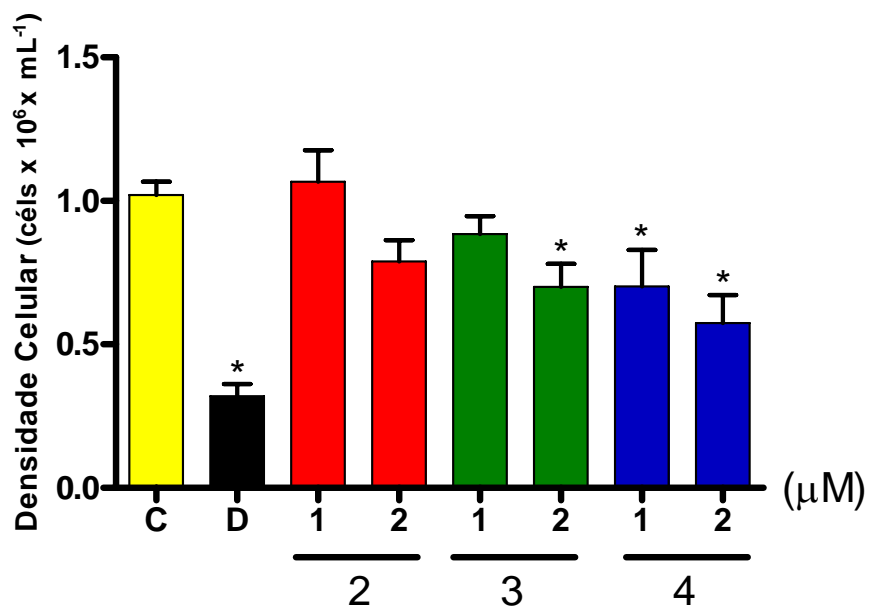


Figura 13: Efeito das lactonas sesquiterpênicas 2, 3 e 4 nas concentrações de 1 e 2  $\mu\text{M}$  sobre a concentração de células leucêmicas (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55 $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo.

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

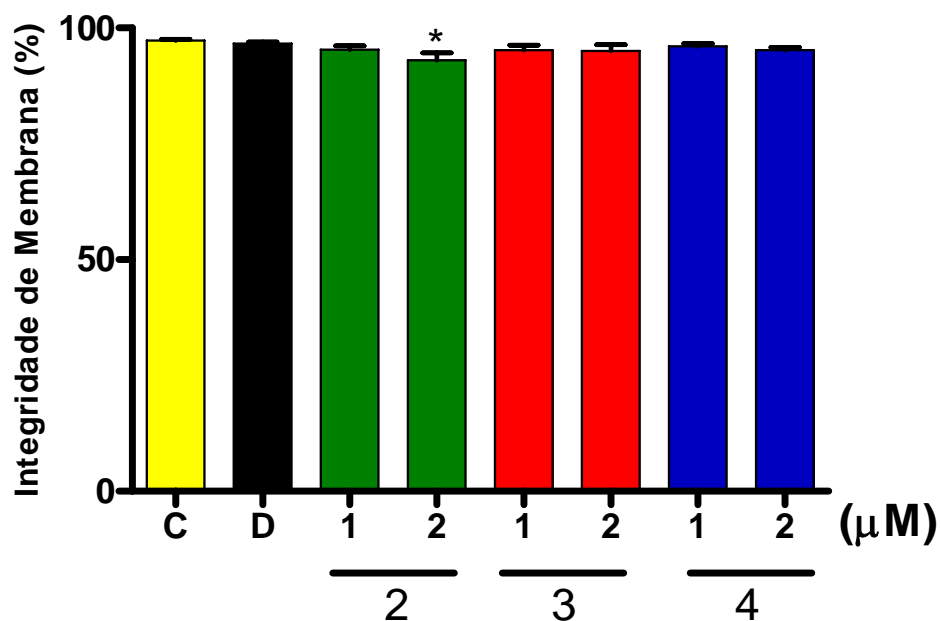
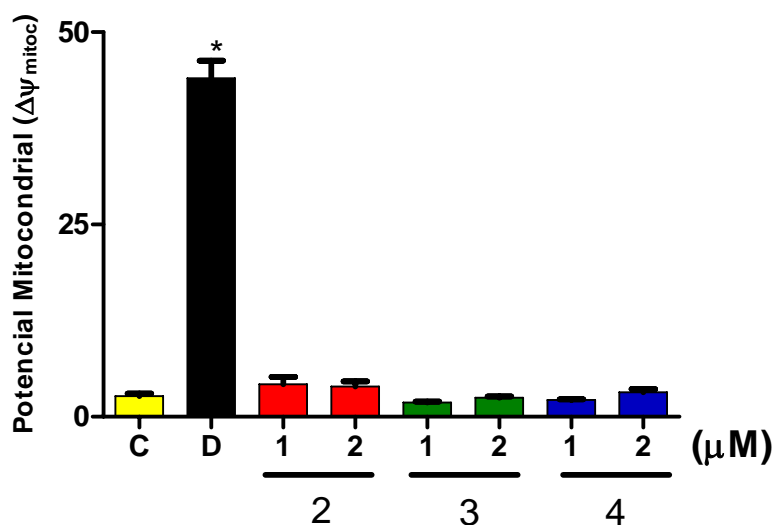


Figura 14: Efeito das sesquiterpênicas 2, 3 e 4 nas concentrações de 1 e 2  $\mu\text{M}$  sobre a viabilidade (integridade de membrana) de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo

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



**Figura 15:** Efeito das sesquiterpênicas 2, 3 e 4 nas concentrações de 1 e 2  $\mu$ M sobre o potencial transmembrânico de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123 após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55 $\mu$ M) foi usada como controle positivo

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

#### 4.3.7 Análise da Fragmentação do DNA

O DNA é a macromolécula responsável pela vida. Na apoptose ocorre fragmentação internucleossomal do DNA, enquanto na necrose essa clivagem é randômica. De qualquer forma a fragmentação do DNA é uma característica de morte celular, portanto um aumento de DNA fragmentado indica um processo de morte avançado.

Apenas o composto 2 na concentração de 2  $\mu$ M causou um aumento significativo de DNA fragmentado (34%), enquanto que o controle positivo (doxorubicina) foi de 79%.

#### 4.3.8 Análise das fases do ciclo celular

A maior parte dos quimioterápicos anticâncer atuam em alguma fase do ciclo celular (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004). Nenhum dos compostos alterou as fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> ou S. Os compostos 3 e 4 causaram acúmulo de células em G<sub>2</sub>/M, não ocorreu diferença no efeito entre os compostos e as concentrações utilizadas. O acúmulo de células em G<sub>2</sub>/M para os compostos 3 e 4 foi de 9,0 e 8,6% para as maiores concentrações dos respectivos compostos. Já para o controle foi de 3,4%.

#### 4.3.9 Ensaio da anexina

A fosfatidilserina é um fosfolípídeo de membrana interna que é translocado para a membrana externa em células em apoptose (HUERTA *et al.*, 2008). Anexina V liga-se a fosfatidilserina, reconhecendo desta forma as células em apoptose. A exposição da fosfatidilserina é para sinalizar a fagocitose das células apoptóticas.

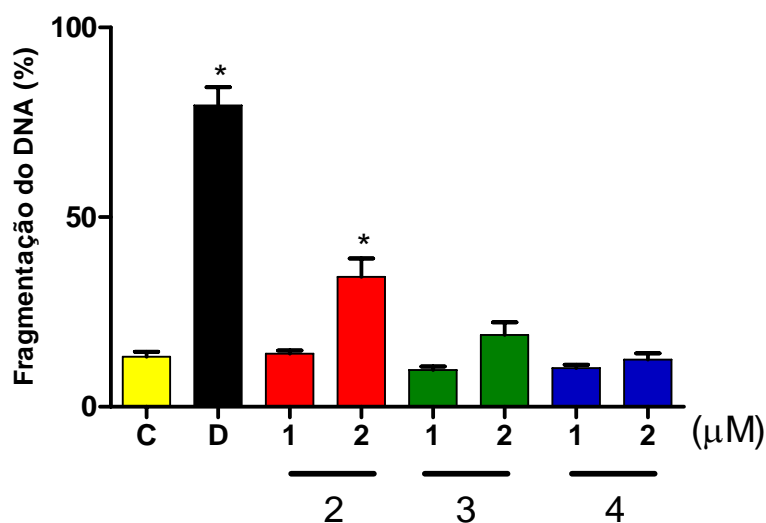
Todos os compostos foram capazes de aumentar o número de células anexina positivas, o que indica uma morte celular por apoptose, na concentração de 2 µM. Nessa concentração também ocorreu um aumento de células anexina e brometo de etídio positivas, que indica uma apoptose tardia, onde ocorre uma perda da integridade de membrana. Houve aumento no número de células marcadas apenas com brometo de etídio, que indica necrose na maior concentração do composto 4.

#### 4.3.10 Ensaio de caspases 3 e 7

As caspases são um grupo de cisteíno-proteases que clivam diversos grupos de substratos intracelulares que contribuem para as manifestações morfológicas típicas da apoptose (THORNBERRY, 1998).

As caspases 3 e 7, são denominadas de executoras por clivarem substratos específicos, que são vitais à célula. Ambas são ativadas tanto pela via extrínseca quanto a intrínseca. Na concentração de 2µM todos os derivados foram capazes de aumentar o número de células com caspase ativa, nenhum alterou o número de células em necrose. Também na mesma concentração ocorreu uma diminuição significativa do número de células viáveis.

O presente dado corrobora com os dados anteriores de que na concentração de 2  $\mu\text{M}$ , com 24 horas de tratamento, há uma diminuição do número de células viáveis, acompanhada de um aumento de células mortas. A via de indução de morte pelos compostos é por apoptose, onde no período estudado, não há participação da via mitocondrial. Possivelmente os compostos agem por via extrínseca.



**Figura 16:** Efeito das lactonas sesquiterpênicas 2, 3 e 4 sobre a fragmentação de DNA de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controle positivo

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



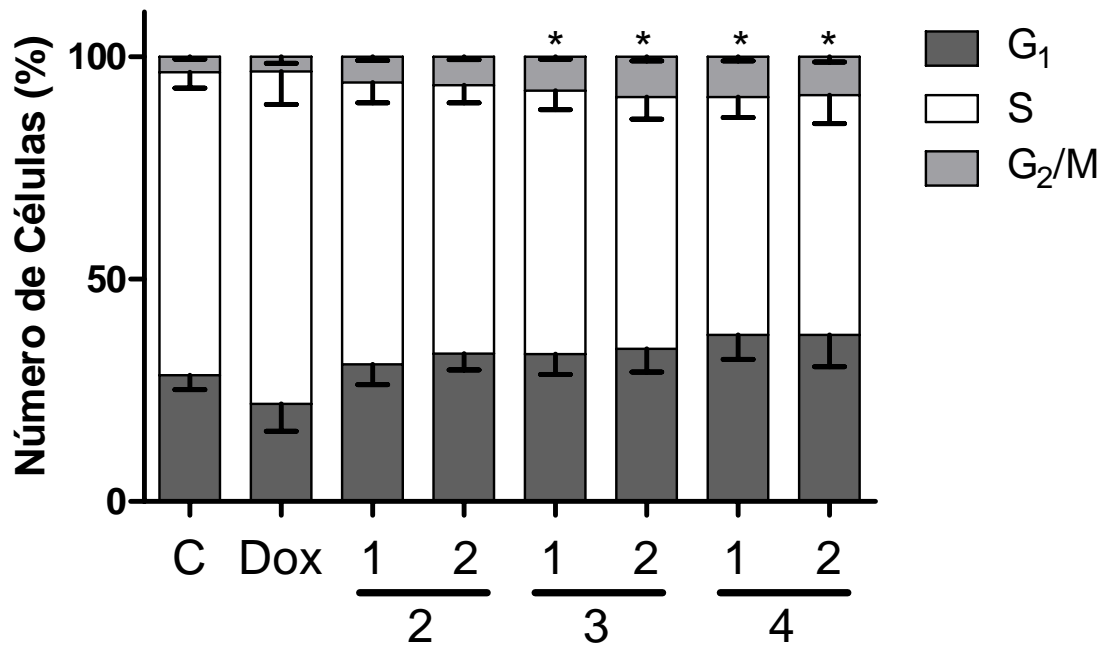


Figura 17: Efeito das lactonas sesquiterpênicas 2, 3 e 4 sobre as fases do ciclo celular em células leucêmicas (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55  $\mu$ M) foi usada como controle positivo. Nota: Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

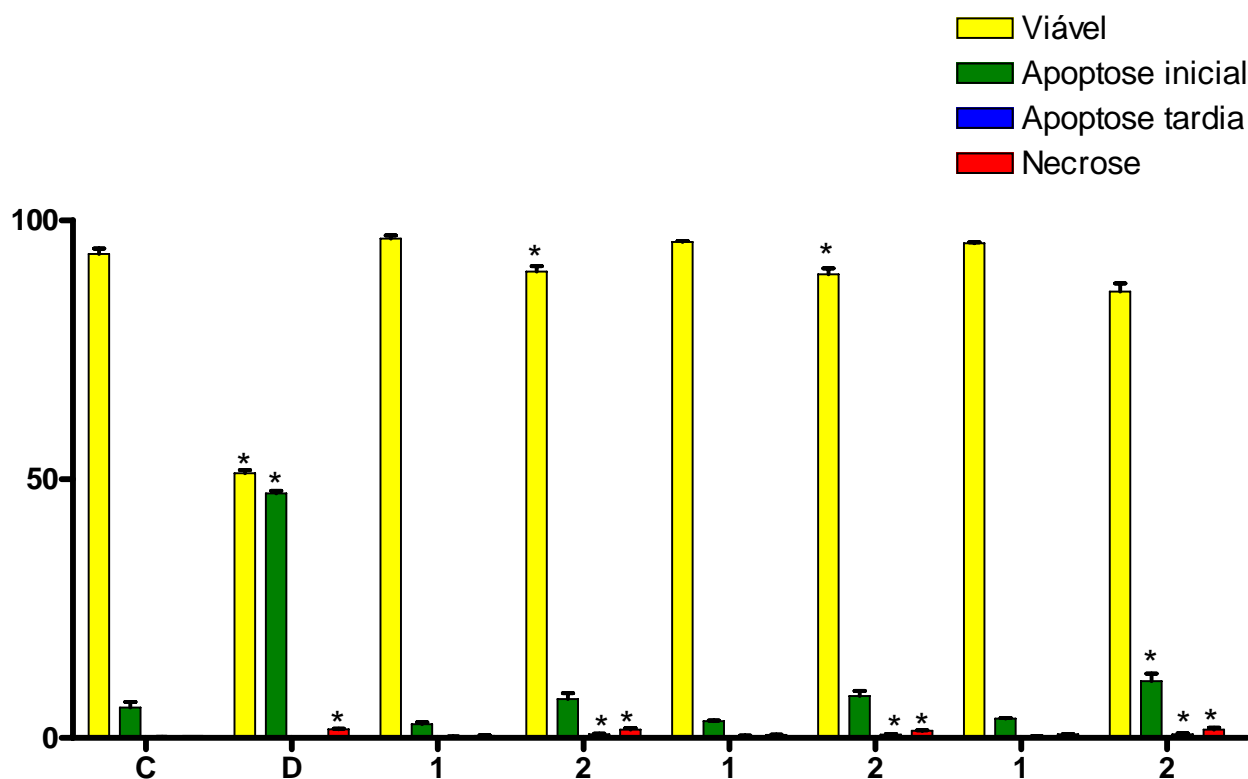


Figura 18: Efeito das lactonas sesquiterpênicas 2, 3 e 4 sobre a expressão de fosfatidilserina em células leucêmicas (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55  $\mu$ M) foi usada como controle positivo.

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

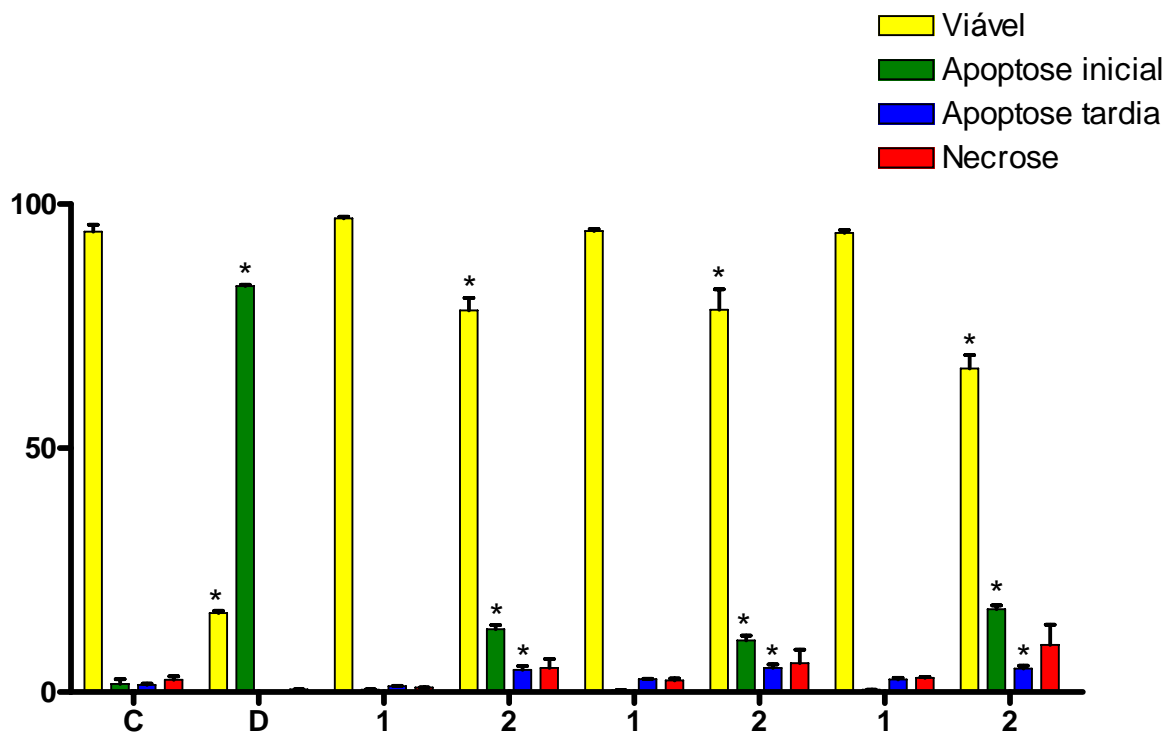


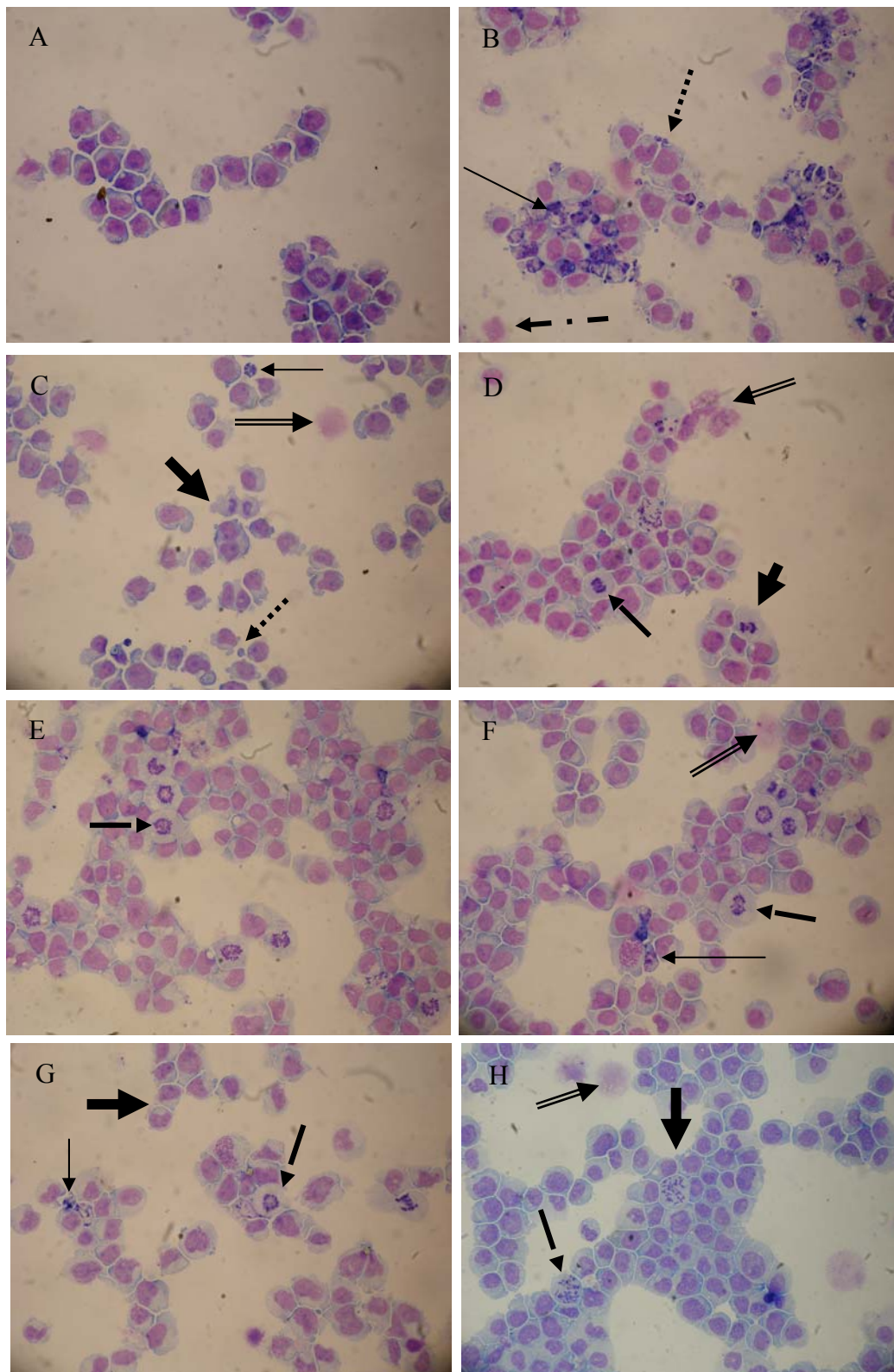
Figura 19: Efeito das lactonas sesquiterpênicas 2, 3 e 4 sobre a atividade de caspases em células leucêmicas (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55  $\mu$ M) foi usada como controle positivo. Nota: Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

#### 4.3.11 Análise de alterações morfológicas

Células em apoptose compartilham um grande número de características semelhantes como diminuição do volume celular, presença de blebbing na membrana, clivagem da cromatina, condensação nuclear e formação de corpos picnóticos de cromatina condensada (corpo apoptótico). De outra maneira, células em necrose exibem perda da integridade de membrana e aumento do volume celular e nuclear (BREDESEN, 2007; DOONAN; COTTER, 2008).

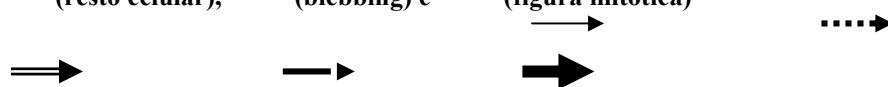
A fotomicrografia demonstra a morfologia celular de células HL-60 após 24 horas de tratamento, com os derivados da  $\alpha$ -santonina. O quadro A representa as células do controle negativo, onde se podem encontrar células com morfologia normal. As cores das setas indicam o aspecto morfológico identificado:  $\longrightarrow$  (fragmentação),  $\cdots\cdots\longrightarrow$  (corpo apoptótico),  $\Longrightarrow$  (resto celular),  $\dashrightarrow$  (blebbing) e  $\blackrightarrow$  (figura mitótica). No quadro B, as células tratadas com doxorrubicina (0,55  $\mu$ M), possuem fragmentação do núcleo, corpos apoptóticos e alguns restos celulares, condizentes com processos apoptóticos.

Os grupos tratados com o composto 2, nas concentrações de 1 e 2  $\mu$ M, apresentam fragmentação nuclear, presença de blebbings na membrana, assim como corpos apoptóticos e restos celulares. No grupo tratado com o composto 3 e 4, vê-se o aumento da presença de figuras mitóticas, e células com o núcleo fragmentado e restos celulares. Todas estas características são típicas de processos apoptóticos (KIM *et al.*, 2002).



**Figura 20: Fotomicrografia de células HL-60, após 24hs de tratamento com os derivados da  $\alpha$ -santonina nas concentrações de 1 e 2  $\mu$ M, para os compostos 2 (C,D), 3 (E,F) e 4 (G,H). Controle (A) e o controle positivo doxorubicina (B), na concentração de 0,55  $\mu$ M.**

**Nota: As setas indicam o aspecto morfológico identificado: (fragmentação), (corpo apoptótico), (resto celular), (blebbing) e (figura mitótica)**



## 5 DISCUSSÃO

Atualmente as sesquiterpeno lactonas têm recebido destaque devido ao grande espectro de atividades biológicas que possuem, sendo constituinte ativo de uma série de plantas utilizadas na medicina tradicional (ROZENBLAT *et al.*, 2008). Dentre as atividades que apresentam pode-se citar: antiinflamatória (KANNO *et al.*, 2008; PAJAK *et al.*, 2008) , fungicida (KANNO *et al.*, 2008; ROZENBLAT *et al.*, 2008), antimicrobiana (SCOTTI *et al.*, 2007), antihelmintica (KONAKLIEVA; PLOTKIN, 2005) , antiviral e antitumoral (ROZENBLAT *et al.*, 2008) e citotóxica (CHO *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2007; CHANGLONG *et al.*, 2008; ROZENBLAT *et al.*, 2008; ).

Pesquisas com diferentes linhagens de células tumorais de mamíferos demonstraram que a presença de um sistema  $\alpha$ - $\beta$ -insaturado é responsável pela atividade citotóxica das SLs (KONAKLIEVA; PLOTKIN, 2005). Sistemas  $\alpha$ - $\beta$ -insaturados presentes em lactonas sesquiterpênicas podem ser representados por estruturas como o  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona, ciclopentenona ou um estér conjugado (FERNANDES *et al.*, 2008). Que são estruturas altamente eletrofilicas, capazes de alquilar grupos sulfidrilas livres, presentes em resíduos de cisteína de várias macromoléculas (enzimas, proteínas) e o próprio DNA, inativando desta forma diversas funções celulares o que culminaria com a morte celular (SCOTTI *et al.*, 2007).

Muitas das investigações farmacológicas das lactonas sesquiterpênicas foram concentradas na santonina e seus derivados como agentes ascaricidas e antihelminticos (KONAKLIEVA; PLOTKIN, 2005). A  $\alpha$ -santonina é uma sesquiterpeno lactona, tendo um esqueleto elemanolídeo, que exerce forte atividade antipirética (KIM *et al.*, 2006).

A  $\alpha$ -santonina, em nossos estudos não demonstrou atividade citotóxica, na maior concentração testada (100  $\mu$ M). Um dado que é corroborado pela literatura, onde Kim *et al.* (2002) informam da ausência de atividade citotóxica no composto, o mesmo é dito por Konaklieva e Plotkin (2005). Todavia é muito utilizada para a síntese de diversos compostos com ação citotóxica e diferenciadora em células tumorais. Isto ocorre por possuir esqueleto simples e reagir estereoseletivamente com alguns átomos como o cloro, e possibilitar a síntese de compostos de estrutura diversa (IVASENKO *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2006).

O presente trabalho avaliou o potencial citotóxico de três novos derivados da  $\alpha$ -santonina: 3-oxo-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-eudesma-1,4,11-trien-6,12-olideo(2); 11,13-

dehidrolumissantonina (3) e 10 $\alpha$ -acetoxi-3-oxo-1,7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-guai-4,11-dien-6,12-olideo (4). Sendo os dois primeiros pertencentes à classe dos eudesmanolídeos e o último um guaianolídeo.

Os derivados 2, 3 e 4 apresentaram atividade citotóxica em todas as linhagens tumorais testadas, destacando-se a pronunciada ação do grupo em HL-60 (leucemia promielocítica humana) e HCT-8 (colón humano). Em HL-60 as CI<sub>50</sub> para os compostos 2, 3 e 4 foram 1,14 ; 2,30 e 1,60  $\mu$ M, respectivamente, sendo o composto 2 o mais citotóxico dentre as amostras estudadas. Enquanto em HCT-8 os compostos 2, 3 e 4 apresentaram CI<sub>50</sub> de 2,92; 1,96 e 0,36  $\mu$ M, respectivamente, tendo o composto 4 apresentado maior seletividade para as células HCT8, as quais correspondem a tumores sólidos e que são mais resistentes. Pode-se destacar o composto 4 caracteriza por ser o único guaianolídeo do grupo, moléculas pertencentes a esta classe de SLs são reconhecidas como de grande espectro de atividade, inclusive citotóxica (SCOTTI *et al.*, 2007). De acordo com Fernandes *et al.* (2008), os guaianolídeos são referidos como a classe de sesquiterpeno lactonas com grande atividade citotóxica, devido ao maior número de elementos estruturais alquilantes.

Para avaliar a toxicidade das amostras em células normais foi escolhido o ensaio do alamar blue, com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (ZHI-JUN *et al.*, 1997). Este ensaio assim como o do MTT permite avaliar a citotoxicidade de compostos pela mudança de coloração, uma vez que ambos ao serem metabolizados são convertidos em compostos de coloração diferente da original (HAMID *et al.*, 2000). O alamar blue foi escolhido, pois é mais sensível e não é tóxico para linfócitos, sendo recomendado por diversos autores (PAGÉ; PAGÉ; NÖEL, 1993; AHMED *et al.*, 1994; MITSUHASHI, 1995; NAKAYAMA *et al.*, 1997; O'BRIEN *et al.*, 2000).

Todos os derivados da  $\alpha$ -santonina apresentaram toxicidade em PBMC, sendo que o composto 2 foi o mais citotóxico, seguido pelo 4 e o 3 o menos tóxico, com CI<sub>50</sub> de 3,24; 10,75 e 16,77  $\mu$ M, respectivamente. Esses resultados são próximos aos encontrado em outras SLs, tais como os guaianolídeos 9 $\alpha$ -acetoxi-artecanina e apressina, isolados de *Achillea clavennae*, que apresentaram CI<sub>50</sub> de 11,8 e 8,7  $\mu$ M, respectivamente, em PBMC (TRIFUNOVIC *et al.*, 2006).

Ao comparar as IC<sub>50</sub> obtida em células normais (PBMC) com a da linhagem tumoral (HL-60) percebe-se que esta foi 2,85; 7,29 e 6,72 vezes mais sensível que as

normais para os compostos 2, 3 e 4. E dessa maneira as amostras 3 e 4 destacam-se por serem menos tóxicas em células normais. Compostos com ação anticâncer, em sua maior parte, têm como alvo moléculas e/ou processos celulares compartilhados por células normais e tumorais, então é de se esperar algum nível de toxicidade.

A importância de grupos estruturais alquilantes na atividade das SLs fica exemplificada, por exemplo, na  $\alpha$ -santonina onde a hidrogenação do conjugado  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona elimina a atividade citotóxica. Baseado neste fato a perda do grupamento  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona eliminaria a atividade citotóxica (KONAKLIEVA; PLOTKIN, 2005). Das amostras estudadas os derivados 2 e 4 testados possuem  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona, entretanto, no derivado 3 ocorre uma oxigenação, ocasionando a perda de tal grupamento. A oxigenação do derivado 3 resulta no aparecimento de uma carbonila a mais. Outros autores (SCOTTI *et al.*, 2007; FERNANDEZ *et al.*, 2008) discutem a citotoxicidade das SLs é mediada não somente pelo grupamento  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona mas por estruturas  $\alpha$ - $\beta$ -insaturadas, assim como a carbonila presente no composto 3. Ainda como exemplo da participação de outros grupos alquilantes na atividade das SLs a Erivanina, que não possui o  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona, mas é citotóxica (SCOTTI *et al.*, 2007).

Desse modo, diferenças nas atividades entre SLs individuais podem ser explicadas por diferentes números de elementos estruturais alquilantes (SCOTTI *et al.*, 2007). Por exemplo, a Helenalina, uma SLs que exibe alta citotoxicidade, tendo o  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona e uma ciclopentenona, ou seja, possui dois grupamentos  $\alpha$ - $\beta$ -insaturados com forte ação alquilante. O alto nível de citotoxicidade foi associado com a inibição da síntese de DNA e a habilidade de alquilar o mesmo (FERNANDES *et al.*, 2008). Entretanto, outros fatores como lipofilicidade, geometria molecular e alvo podem influenciar na atividade das SLs (SCOTTI *et al.*, 2007).

A  $\alpha$ -santonina é uma molécula que carece de atividade citotóxica, no entanto seus derivados aqui estudados possuem tal ação. Isto é possível graças aos estudos de relação-estrutura atividade, que possibilitam tanto o direcionamento da síntese quanto o melhor entendimento da atividade biológica.

No estudo do mecanismo de indução de citotoxicidade foi escolhida a linhagem HL-60, como modelo experimental, nas concentrações de 1 e 2  $\mu$ M, após 24 horas de tratamento com os derivados da  $\alpha$ -santonina.



O método de exclusão do azul de tripan foi utilizado para observar os efeitos citotóxicos e antiproliferativos dos compostos. As SLs 2, 3 e 4 diminuíram significativamente o número de células viáveis na maior concentração testada, não havendo diferença entre elas, sem, interferir significativamente no número de células inviáveis, o que demonstra um efeito citostático (COSTA, 2006). Apesar de ser utilizado para estudos de citotoxicidade este teste não distingue qual via de morte esta participando da citotoxicidade. Visto que sistemas de transporte ativo estão em pleno funcionamento em células viáveis, contudo, em estágios iniciais da apoptose estes sistemas ainda estão em funcionamento, enquanto que na necrose não.

O ensaio do BrdU, é um teste imucitoquímico que avalia a incorporação do BrdU, um análogo da timidina, determinando as células que estão proliferando.

Todos os compostos foram capazes de diminuir o número de células que incorporaram o BrdU. A ação dos mesmos ficou entorno de 40-47%. Não ocorrendo diferença estatística entre os mesmos. De acordo com Konaklieva e Plotkin (2005), as SLs podem inibir a replicação do DNA, o que sustenta a diminuição significativa na incorporação do BrdU. Sabe-se que, a inativação de enzimas é um traço marcante das SLs por serem capazes de alquilar enzimas envolvidas em processos vitais à célula (SCOTTI *et al.*, 2007). Os resultados encontrados podem sugerir a participação tanto de enzimas envolvidas na replicação do DNA, quanto em outras funções celulares que diminuiriam a proliferação celular.

No ensaio da coloração por BE/LA as SLs foram capazes de aumentar o número de células em apoptose de forma concentração dependente, sem aumentar o número de células em necrose, em nenhuma das concentrações testadas. Além de diminuírem o número de células viáveis apenas na maior concentração testada em todas as amostras. Assim, ao comparar os dados do ensaio de laranja de acrinina/brometo de etído com os obtidos pela exclusão do azul de tripan, vê-se que a diminuição das células viáveis ocorreu apenas na concentração de 2 $\mu$ M em ambos os testes, não ocorrendo aumento do número de células inviáveis e em necrose, em nenhuma das concentrações. Os resultados em ambos os ensaios reforçam, a maior participação da apoptose como evento final de morte celular induzida pelos compostos.

A concentração celular reflete o número de células presente em um determinado volume. O composto 3 diminuiu a concentração de células na concentração de 2  $\mu$ M, já

o composto 4 reduziu em ambas as concentrações. Enquanto o 2 não reduziu em nenhuma concentração, o que difere do resultado observado no azul de tripan, porém não invalida o resultado encontrado no azul de tripan uma vez que ambas utilizam parâmetros diferentes para quantificar células. No azul de tripan células viáveis são as que excluíram o corante, todavia, na citometria células viáveis são classificadas de acordo com tamanho e granulosidade (KRYSKO *et al.*, 2008).

A integridade de membrana reflete uma característica básica que distingue células em apoptose e em necrose, porque estas não possuem a membrana íntegra (BRUIN; MEDEMA, 2008). Foi observado que o composto 2 diminui a integridade da membrana plasmática o que condiz com um processo necrótico.

Contudo, não é possível sugerir uma participação decisiva da necrose como morte celular induzida pelo composto 2, pelo fato de que a perda da integridade de membrana pode refletir também uma apoptose tardia ou uma necrose secundária a apoptose de acordo com os trabalhos descritos por Cruchten e Broeck (2002). Pois, os autores citados discutem a necrose não como um processo que leva a morte celular, mas sim como resultado final de processos de morte celular, como apoptose. Além disso, os resultados obtidos por tripan e AO/BE não indicaram aumento de células em necrose.

Sendo assim, os resultados obtidos com o composto 2 no ensaio de viabilidade por azul de tripan sinalizam que o mesmo diminuiu o número de células viáveis sem aumentar as não viáveis, e que certamente teriam seus sistemas de transporte ativo e/ou membrana danificados. Essa ação foi reforçada com os dados analisados pela laranja de acridina/brometo de etídeo, que confirmaram a redução do número de células viáveis, aumento do número de células em apoptose, sem alteração do número de células em necrose na concentração de 2 $\mu$ M.

Os presentes dados apontam a apoptose como o tipo de morte celular preferencialmente induzida pelos compostos. A apoptose é desencadeada por duas vias, uma extrínseca e outra intrínseca. A via intrínseca é ativada por estímulos internos, tendo a mitocôndria como organela central.

Afim de melhor compreender a via de sinalização da apoptose foi realizado o ensaio de despolarização mitocondrial. Na apoptose pela via mitocondrial, ocorre a formação de um poro de permeabilização na membrana da mitocôndria havendo uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial, que pode ser quantificado por

fluorocromos catiônicos lipofílicos, como a rodamina 123 (KROEMER; ZAMZAMI; SUSIN, 1997). Nesse estudo, nenhuma das amostras testadas foi capaz de alterar o potencial mitocondrial até 24h de tratamento, uma vez que acima desse tempo de exposição poderia haver ativação da via intrínseca apoptótica. Visto que o costunolídeo, uma SLs da classe dos germacranolídeos, é capaz de induzir apoptose por via extrínseca e intrínseca simultaneamente (KANNO *et al.*, 2008). Porém os autores observaram que a participação da via extrínseca precede a intrínseca. Isto porque a via extrínseca ativa a caspase-8 que é capaz de ativar Bid, uma proteína pró-apoptótica da família Bcl-2 que ativa a via mitocondrial (THONEL; ERIKSSON, 2005).

A importância da atividade das caspases se deve porque ao serem ativadas são responsáveis pela clivagem de diversos substratos, que são responsáveis por características típicas da apoptose (HUERTA *et al.*, 2006). A DNase ativada por caspase (CAD), possui uma subunidade inibitória, sendo encontrado como ICAD (inibidor da DNase ativada por caspase). As caspases são capazes de clivar essa subunidade regulatória, promovendo assim a fragmentação internucleossomal do DNA (GAVRIELI *et al.*, 1992). O DNA é fragmentado em intervalos de 180 a 200 pares de base, uma característica bioquímica da apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Enquanto, na necrose a fragmentação do DNA é randômica (BREDESEN, 2007).

Ao analisar a fragmentação do DNA, apenas o composto 2, na concentração de 2 $\mu$ M foi capaz de aumentar a fragmentação do DNA. O que corrobora com dados anteriores indicativos de apoptose, onde a diminuição da integridade de membrana poderia ser explicada por um processo de apoptose avançado. De acordo com Huerta *et al.* (2006), a fragmentação do DNA é um estágio intermediário, entre os processos apoptóticos iniciais e tardios. Esse resultados convergem com os observados pela cinaropicrina, um guaianolídeo isolado de *Saussurea lappa*, que foi capaz de causar fragmentação do DNA e parada do ciclo celular na fase G<sub>1</sub>/S em células de linfoma humano (U937).

Sabe-se que diversos agentes com ação anticâncer agem em fases específicas do ciclo celular ou causam parada da progressão do ciclo celular (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004). Para avaliar a ação dos compostos 2, 3 e 4, no ciclo celular foi utilizado a citometria de fluxo como ferramenta de estudo.

A parada do ciclo celular reflete uma necessidade da célula em reparar algum dano, caso não seja reparado mecanismos apoptóticos são ativados (ROZENBLAT *et al.*, 2008). Outras SLs como os guaianolídeos, a exemplo do composto 4, Inuviscolídeo e o Tomentosin param o ciclo celular em G<sub>2</sub>/M, acompanhado de acúmulo de células anexina positivas e ativação de caspase 3, em células de melanoma humano (SK-28), conforme estudos de Rozenblat *et al.*, 2008. Esses pesquisadores, identificaram que a ação alquilante sobre o DNA, leva a ativação do supressor tumoral p-53, culminando com a parada do ciclo celular em G<sub>2</sub>/M, seguida de apoptose.

Ocorreu um acúmulo significativo do número de células em G<sub>2</sub>/M, com os compostos 3 e 4, demonstrando uma parada da progressão do ciclo celular. O composto 3, aumentou de forma linear as células em G<sub>2</sub>/M, apresentando 7,87 e 10,37 de número de célula, nas concentrações testadas e 1 e 2 µM respectivamente. Enquanto o composto 4 aumentou primordialmente na menor concentração de 1µM em relação ao controle. Já, o composto 2 não alterou entre as fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>/M.

A fosfatidilserina é um aminofosfolipídio que reside no lado interno da membrana plasmática de células viáveis. Durante a morte celular por apoptose, a fosfatidilserina é ativamente externalizada para a superfície externa da membrana, onde sua presença é requerida para reconhecimento e fagocitose por células fagocitárias (KOOPTMAN *et al.*, 1994; KRYSKO *et al.*, 2008). Anexina V, uma proteína ligante de cálcio de 35 kDa liga-se com alta afinidade a fosfatidilserina, podendo ser utilizada em conjugação com fluorocromos para a detecção de células apoptóticas (HUERTA *et al.*, 2007).

No ensaio de ligação da anexina, os três derivados foram capazes de aumentar o número de células anexina positivas, ou seja, apoptóticas. O composto 4 foi o que causou um maior aumento das células em apoptose inicial, que para a maior concentração dos compostos 2, 3 e 4 foram de 7,5; 8,0 e 11,0 respectivamente. No mesmo ensaio o 3 aumentou o número de células em necrose.

Todas as alterações ocorridas na apoptose são desencadeadas por caspases. Com base nisto investigou-se a presença de caspases ativas, pois existem constitutivamente nas células como zimógenos (forma inativa), porém são ativadas após estímulos apoptóticos (KAUFMANN *et al.*, 2008). Para tanto se investigou a ativação das caspases executoras 3 e 7. Os três derivados foram capazes de induzir a ativação das

caspases. Mais uma vez o composto 4 destaca-se por induzir um maior número de células com caspases ativas, as médias para as maiores concentrações testadas dos compostos 2, 3 e o 4 foram de 12,8; 10,6 e 17,0 respectivamente.

De acordo com diversos autores (BREDESEN, 2007; HUERTA *et al.*, 2007; KRYSKO *et al.*, 2008), a microscopia óptica oferece um mecanismo de identificação de alterações morfológicas que ocorrem na apoptose. Como alterações fenotípicas encontradas em células em processo de apoptose têm-se: condensação e marginação da cromatina, fragmentação do DNA e núcleo, aumento do volume celular, formação de blebbings e colapso celular em fragmentos que contém organelas e restos nucleares, que são denominados corpos apoptóticos (DOONAN; COTTER, 2008; BOUCHIER-HAYES *et al.*, 2008). Essas características são desencadeadas pela ativação de caspases que clivam substratos específicos responsáveis por essas alterações morfológicas (HENGARTNER, 2000; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; BRUIN; MEDEMA, 2008; TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008).

Os grupos tratados com o composto 2, nas concentrações de 1 e 2  $\mu\text{M}$ , apresentam fragmentação nuclear, presença de blebbings na membrana, assim como corpos apoptóticos e restos celulares. Os restos celulares podem representar um processo apoptótico final. No grupo tratado com o composto 3 e 4, vê-se o aumento da presença de figuras mitóticas, e células com o núcleo fragmentado e restos celulares.

Tanto alterações morfológicas quanto moleculares são necessárias para a confirmação da indução de apoptose (HUERTA *et al.*, 2007). No presente trabalho as alterações encontradas com o tratamento são condizentes com processos apoptóticos, e a presença de caspases ativas confirmam que os três derivados exercem sua ação citotóxica por indução de apoptose.

A literatura corrente reporta os guaianolídeos como o grupo pertencente as SLs de maior interesse, devido a sua estrutura básica possibilitar o maior número de grupos alquilantes (SCOTTI *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2008). Dos derivados da  $\alpha$ -santonina estudados o 4 é o único guaianolídeo do grupo, sendo o que apresentou melhores resultados: alta citotoxicidade, moderada toxicidade em PBMC, parada do ciclo celular e maior número de células anexina positiva e com caspases ativas, sua atividade é mediada pela inibição da síntese de DNA.

## 6 CONCLUSÃO

Os três derivados da  $\alpha$ -santonina estudados: 3-oxo-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-eudesma-1,4,11-trien-6,12-olideo(2); 11,13-dehidrolumissantonina (3) e 10 $\alpha$ -acetoxi-3-oxo-1,7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-guai-4,11-dien-6,12-olideo (4), demonstraram grande potencial citotóxico frente a linhagens de células tumorais, esta atividade envolve a inibição da síntese de DNA, parada do ciclo celular em G<sub>2</sub>/M (3,4) e fragmentação do DNA (2). A presença de caspases ativas, bem como exposição da fosfatidilserina e as alterações morfológicas encontradas, confirmam a indução de apoptose mediada pelos três derivados.

O derivado 4 é o de maior destaque pela baixa toxicidade em PBMC e maior capacidade de induzir células a entrarem em apoptose.

Tabela 6: Resultados da  $\alpha$ -santonina (1) e seus derivados 3-oxo-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-eudesma-1,4,11-trien-6,12-olideo (2), 11,13-dehidrolumissantonina (3), 10 $\alpha$ -acetoxi-3-oxo-1,7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-guai-4,11-dien-6,12-olideo (4). (-) Inativo, (+) Ativo, (\*) – Não testado.

Amostra	Screening			Estudo do mecanismo de citotoxicidade									
	MTT	Hemólise	AB - PBMC	Tripan	BrdU	AO/BE Apoptose	Densidade celular	Integridade de membrana	Depolarização mitocondrial	Fragmentação do DNA	G <sub>2</sub>	Anexina	Caspases 3 e 7
1	-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
3	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
4	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; R.; BARRET, L. C.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

BARNARD, P. J.; BERNES-PRICE, S. J. Targeting the mitoCHONDrial cell death pathway with gold compounds. **Coord. Chem. Rev.**, v. 251, p. 1889-1902, 2007.

BARR, F. A.; SILLJÉ, H. H.W.; NIGG, E. A. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, p. 429-440, 2004.

BETTENCOURT-DIAS, M.; GIET, R.; SINKA, R.; MAZUMDAR, A.; LOCK, W.G.; BALLOUX, F.; ZAFIROPOULOS, P.J.; YAMAGUCHI, S.; WINTER, S.; CARTHEW, R.W.; COOPER, M.; JONES, D.; FRENZ, L.; GLOVER, D.M. Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. **Nature**, v. 432, p. 980-987, 2004.

BOUCHIER-HAYES, L.; MUÑOZ-PINEDO, C.; CONNELL, S.; GREEN, D. R. Measuring apoptosis at the single cell level. **Methods**, v. 44, p. 222-228, 2008.

BREDESEN, D. E. Toward a mechanistic taxonomy for cell death programs. **Stroke**, v. 38, p. 652-660, 2007.

BRUIN, E. C.; MEDEMA, J. P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer Treat. Rev.**, v. 34, n. 8, p. 737-749, 2008.

CHANGLONG, L.; HEZHEN, W.; YONGPING, H.; YANWEN, L.; JIAMWEN, L. 6-O-angeloylenolin induces apoptosis through a mitoCHONDrial and NF- $\kappa$ B pathway in human leukemia HL-60 cells. **Biomed. Pharmacother.**, v. 62, n. 6, p. 401-409, 2008.

CHEN, C.-N.; HUANG, H.-H.; WU, C.-L.; LIN, C. P. C.; HSU, J. T.A.; HSIEH, H.-P.; CHUANG, S.-E.; LAI, G.-M. Isocostunolide, a sesquiterpene lactone, induces mitoCHONDrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in human melanoma cells. **Cancer Lett.**, v. 246, n. 1/2, p. 237-252, 2007.



CHO, J. Y.; KIM, A. R.; JUNG, J. H.; CHUN, T.; RHEE, M. H.; YOO, E. S. Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 492, p. 85-94, 2004.

COLLINS, I.; GARRET, M. D. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 5, n. 4, p. 366-373, 2005.

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

CRUCHTEN, S. Van; BROECK, W. Van Den. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 31, n. 4, p. 214-223, 2002.

DOONAN, F.; COTTER, T. G. Morphological assessment of apoptosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 200-204, 2008.

FERNANDES, M. B.; SCOTTI, M. T.; FERREIRA, M. J.P.; EMERECIANO, V.e P. Use of self-organizing maps and molecular descriptors to predict the cytotoxic activity of sesquiterpene lactones. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 43, p. 2197-2205, 2008.

FISCHER, P. M.; GLOVER, D. M.; LANE, D. P. Targeting cell cycle. **Drug Discov. Today Ther. Strateg.**, v. 4, p. 417-423, 2004.

FOSTER, I. Cancer: a cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, n. 2, p. 144-149, 2008.

FREY, T. G.; SUN, M. G. Correlated light and electron microscopy illuminates the role of mitochondrial inner membrane remodeling during apoptosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1777, n. 7/8, p. 847-852, 2008.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J. Cell Biol.**, v. 119, n. 3, p. 493-501, 1992.

GLOVER, C. J.; RABOW, A. A.; ISGOR, Y. G.; SHOEMAKER, R. H.; COVELL, D. G. Data mining of NCI's anticancer screening database reveals mitochondrial complex inhibitors cytotoxic to leukemia cell lines. **Biochem. Pharmacol.**, v. 73, p. 331-340, 2007.

HAMID, R.; ROTSHTEYN, Y.; RABADI, L.; PARIKH, R.; BULLOCK, P. Comparison of Alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 703- 710, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HIGUCHI, M. Regulation of mitochondrial DNA content and cancer. **Mitochondrion**, v. 7, n. ½, p. 53-57, 2007.

HUERTA, S.; GOULET, E. J.; HUERTA-YEPEZ, S.; LIVINGSTON, E. H. Screening and detection of apoptosis. **J. Surg. Res.**, v. 139, p. 143-156, 2007.

IVASENKO, S.; EDIL'BAEVA, T.; KULYYASOV, A.; ATAZHANOV, G.; DRAB, A.; TURDYBEKOV, K.; RALDUGIN, V.; ADEKENOV, S. Structure and biological activity of  $\alpha$ -santonin chloro-derivatives. **Chem. Nat. Comp.**, v. 42, p. 36-40, 2006.

KAUFMANN, S. H.; LEE, S.-H.; MENG, X. W.; LOEGERING, D. A.; KOTTKE, T.; HENZING, A. J.; RUCHAUD, S.; SAMEJIMA, K.; EARNSHAW, W. C. Apoptosis-associated caspase activation assays. **Methods**, v. 44, p. 262-272, 2008.

KEEN, N.; TAYLOR, S. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 927-936, 2004.

KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K.; UCHIDA, Y.; ARITHIRO, K. The role of apoptotic or non apoptotic cell death in determining cellular response to anticancer treatment. **J. Cancer Surg.**, v. 32, p. 269-277, 2006.

KIM, R.; TANABE, K.; UCHIDA, Y.; EMI, M.; INOUE, H.; TOGE, T. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 50, p. 343-352, 2002.

KIM, S. H.; SONG, J. H.; CHOI, B. G.; KIM, H.-J.; KIM, T. S. Chemical modification of santonin into a diacetoxy acetal form confers the ability to induce differentiation of human promyelocytic leukemia cells via the down-regulation of NF- $\kappa$ B DNA binding activity. **J. Biol. Chem.**, v. 28, p. 13117-13125, 2006.

KONAKLIEVA, M. I.; PLOTKIN, B. J. Lactones: generic inhibitors of enzymes? **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 5, p. 73-95, 2005.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C. P.; KUIJTEN, G. A.; KEEHNEN, R. M.; PALS, S. T.; VAN OERS, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84, p. 1415-1420, 1994.

KOPEC, K. K.; BOZYCZKO-COYNE, D.; WILLIAMS, M. Target identification and validation in drug discovery: the role of proteomics. **Biochem. Pharmacol.**, v. 69, p. 1133-1139, 2005.

KROEMER, G.; ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A. Mitochondrial control of apoptosis. **Immunol. Today**, v. 18, p. 44-51, 1997.

KRYSKO, D. V.; BERGHE, T. Van Den; D'HERDE, K.; VANDENABEEL, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, p. 205-221, 2008.

MADDIKA, S.; ANDE, S. R.; PANIGRAHI, S.; PARANJOTHY, T.; WEGLARCZK, K.; ZUSE, A.; ESHRAGHI, M.; MANDA, K. D.; WIECHEC, E.; LOS, M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. **Drug Resit. Updat.**, v. 10, n. ½, p. 13-29, 2007.

MALUMBRES, M.; PEVARELLO, P.; BARBACID, M.; BISCHOFF, J. R. CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 29, p. 16-21, 2007.

MARTIN, Y. C.; KOFRON, J. L.; TRAPHAGEN, L. M. Do structurally similar molecules have similar biological activity. **J. Med. Chem.**, v. 45, p. 4350-4358, 2002.

MCGROGAN, B. T.; GILMARTIN, B.; CARNEY, D. N.; MCCANN, A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1785, p. 96-132, 2008.

MISHRA, K.P.; GANJU, L.; SAIRAM, M.; BANERJEE, P.K.; SAWHNEY, R.C. A review of high throughput technology for the screening of natural products. **Biomed. Pharmacother.**, v. 62, p. 94-98, 2007.

MOUNTZIOS, G.; EVANGELOS, T.; DIMOPOULOS, M.-A. Aurora kinases as target for cancer therapy. **Cancer Treat. Rev.**, v. 34, p. 175-182, 2008.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability invitro. **J. Immunol. Methods**, v. 204, n. 2, p. 205-208, 1997.

NEWELL, D. R. How to develop a successful cancer drug – molecules to medicines or targets to treatments? **Eur. J. Cancer**, v. 41, p. 676-682, 2005.

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

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 913-922, 2007.

PAGÉ, B.; PAGÉ, M.; NOËL, C. A new fluorimetric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. **Int. J. Oncol.**, v. 3, p. 473-476, 1993.

PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 18, p. 497-503, 2007.

RICCI, M. S.; ZONG, W.-X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**, v. 11, p. 342-357, 2006.

ROSA, D. D.; ISMAEL, G.; DAL LAGO, L.; AWADA, A. Molecular-targeted therapies: lessons from years of clinical development. **Cancer Treat. Rev.**, v. 34, p. 61-80, 2008.

ROZENBLAT, S.; GROSSMAN, S.; BERGMAN, M.; GOTTLIEB, H.; COHEN, Y.; DOURAT, S. Induction of G<sub>2</sub>/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cells lines. **Biochem. Pharmacol.**, v. 75, p. 369-382, 2008.

RUSTIN, P. Mitochondria, from cell death to proliferation. **Nat. Genet.**, v. 30, p. 352-353, 2002.

SAKALANI, A.; KUTTY, S. K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discov. Today**, v. 13, p. 161-171, 2008.

SCHMIDT, M.; BASTIANS, H. Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. **Drug Resist. Updat.**, v. 10, p. 162-181, 2007.

SCOTTI, M. T.; FERNANDES, M. B.; FERREIRA, M. J. P.; EMERECIANO, V. P. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones with cytotoxic activity. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, n. 8, p. 2927-2934, 2007.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 9, p. 231-241, 2008.

THONEL, A.; ERIKSSON, J. E. Regulation of death receptors – relevance in cancer therapies. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 207, p. 123-132, 2005.

THORNBERRY, N. A. Caspases: Key mediators of apoptosis. **Chem. Biol.**, v. 5, p. 97-103, 1998.

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

YUUYA, S.; HAGIWARA, H.; SUZIKI, T.; ANDO, M.; YAMADA, A.; SUDA, K.; KATAOKA, T.; NAGAI, K. Guaianolides as immunomodulators. Synthesis and biological activities of Dehydrocostus lactone, Mokko lactone, Eremanthin, and their derivatives. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 1, p. 22-30, 1999.

ZHI-JUN, Y.; SRIRANGANATHAN, N.; VAUGHT, T.; ARASTU, S.K.; ANSAR AHMED, S. A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cyTOGEneTic, apoptosis, and immunophenotyping studies. **J. Immunol. Methods**, v. 210, n. 1, p. 25-39, 1997.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol. Sci.**, v. 19, p. 124-128, 2004.