



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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DOS
HIDROBENZOFURANÓIDES ISOLADOS DAS FOLHAS DA
Tapirira guianensis (ANACARDIACEAE)**

PATRICIA MARÇAL DA COSTA

FORTALEZA – CE
2006

Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DOS
HIDROBENZOFURANÓIDES ISOLADOS DAS FOLHAS DA *Tapirira
guianensis* (ANACARDIACEAE)**

Patricia Marçal da Costa

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

Orientadora:

Prof^a Dr^a Claudia do Ó Pessoa

**Fortaleza - CE
Dezembro, 2006**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DOS
HIDROBENZOFURANÓIDES ISOLADOS DAS FOLHAS DA *Tapirira
guianensis* (ANACARDIACEAE)**

Palavras chaves: antitumoral, hidrobenzofuranóides, Anacardiaceae.

Patricia Marçal da Costa

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

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

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Claudia do Ó Pessoa
Universidade Federal do Ceará
- Orientadora -

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes
Universidade Federal do Ceará

Profª Drª Francisca Cléa Florenço de Sousa
Universidade Federal do Ceará

A Deus

AGRADECIMENTOS

À Dr^a. *Claudia do Ó Pessoa*, pela orientação deste trabalho, pela ajuda, incentivo e paciência demonstrada em todos os momentos de trabalho em comum;

À Dr^a. *Letícia Veras Costa Lotufo* por todas as dúvidas esclarecidas no desenvolver da pesquisa;

Ao Dr. *Manoel Odorico de Moraes*, pela contribuição à pesquisa no Laboratório de Oncologia Experimental e pela amizade;

À Prof^a. *Raquel Montenegro* pelo auxílio prestado e dicas essenciais;

À Prof^a. *Ana Paula Negreiros Nunes Alves*, pelos esclarecimentos sobre patologia e as análises histopatológicas;

À Prof^a, *Francisca Cléa Florenço de Sousa* por ter aceitado participar desta banca de dissertação;

À Prof^a *Otília Deusdênia* pelo auxílio no estudo químico de estrutura-atividade dos hidrobenzofuranóides;

Aos Professores *Jorge Maurício David* da Universidade Federal da Bahia e *Suzimone Correia* da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, por terem cedido as amostras e suas respectivas estruturas químicas;

Ao grande amigo *Paulo Michel Pinheiro Ferreira* pela enorme ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade verdadeira desde o início desta caminhada;

À amiga *Gardenia Carmen Gadelha Militão* pela dedicação e ajuda neste trabalho;

Aos pós-graduandos do *Laboratório de Oncologia Experimental*: Hélio Nobre, André Viana, Márcio Roberto, Diego Veras, Rômulo Feio, Daniel Pereira, Patrícia Bonavides, Marne Vasconcellos, Bruno Cavalcante, Hemerson Magalhães, Danilo Rocha, Paula Jimenez e Ivana Dantas pela ajuda de todos os dias e pela amizade;

Aos alunos da graduação que participam das atividades do *Laboratório de Oncologia Experimental*: Elthon Ferreira, Carla Sombra, Lidiane Arruda, Washington Araújo, Fernanda Oliveira e em especial ao bolsista de iniciação científica *Andrew Sá Nunes* pela amizade e auxílio nos experimentos;

Aos técnicos Silvana França, Luciana França, Adriano Santos e Maria de Fátima Teixeira cuja dedicação é essencial para o laboratório e ao David pela ajuda nos experimentos do Labomar;

Aos diretores do Laboratório Professor Eleutério de Costa (LABPEC), *Dr. José Eleutério Júnior e Dra. Diane Isabelle Cavalcante*, pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas e pelo apoio durante a graduação;

Aos professores do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), em especial, *Maria Angelina Medeiros* (orientadora de Trabalho de Conclusão), pelos ensinamentos imprescindíveis na graduação;

Às amigas da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), *Ana Karenina Gondim, Karla Mota e Raphaella Della Guardia* pela amizade e força doadas até hoje;

Aos meus pais, que se dedicaram de maneira grandiosa para me darem a oportunidade de realizar este trabalho;

Ao meu filho *Davi*, por ser grande parte do estímulo de meus objetivos e pela compreensão nos momentos de ausência;

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

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, *Áurea, Chiquinho, Fernando, Mônica e Íris* que tentam resolver ou indicar o melhor caminho para os problemas do dia a dia;

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

À *Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia* pelo apoio e incentivo;

Aos órgãos financiadores dos projetos de pesquisa do Laboratório de Oncologia Experimental, CNPq, FINEP, FUNCAP e BNB;

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pelo apoio financeiro, sem o qual seria impossível a realização desse trabalho.

ÍNDICE

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Símbolos e Abreviaturas	xiv
Resumo	xvii
Abstract	xix
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Câncer.....	21
1.2. Produtos naturais.....	23
1.3. A família Anacardiaceae.....	29
1.4. Gênero <i>Tapirira</i>	31
2. OBJETIVOS	37
2.1. Geral	37
2.2. Específicos	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Materiais Utilizados	39
3.1.1. Equipamentos	39
3.1.2. Reagentes e Soluções	40
3.2. Metodologia Experimental	45
3.2.1. Obtenção dos hidrobenzofuranóides.....	45
3.2.2. Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	47
3.2.2.1. Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais.....	47
- Procedimento Experimental.....	49
- Análise dos Dados	49
3.2.2.2. Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos <i>Mus musculus</i> Swiss.....	50
- Procedimento Experimental.....	50
3.2.2.3. Estudo da Toxicidade aguda em larvas de <i>Artemia sp.</i>	51
- Procedimento Experimental.....	51
- Análise dos Dados.....	52

3.2.3. Estudo do mecanismo de ação em células leucêmicas.....	53
3.2.3.1. Curva de Crescimento Celular.....	53
- Procedimento Experimental.....	53
- Análise dos Dados.....	53
3.2.3.2 Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán	54
- Procedimento Experimental.....	54
- Análise dos Dados	54
3.2.3.3. Inibição da síntese de DNA – BrdU.....	55
- Procedimento Experimental.....	55
- Análise dos Dados	56
3.2.3.4. Análise morfológica – Coloração diferencial por H/E.....	56
- Procedimento Experimental.....	56
- Análise dos Dados.....	57
3.2.3.5. Análise morfológica – Coloração Diferencial por BE/AL.....	57
- Procedimento Experimental.....	58
- Análise dos Dados.....	58
3.2.4. Estudos de Genotoxicidade.....	59
3.2.4.1. Teste do cometa.....	59
- Preparação das Amostras.....	59
- Preparação das lâminas e lise celular.....	60
- Neutralização e Eletroforese.....	60
- Fixação e Coloração.....	61
- Escore das lâminas.....	61
- Análise Estatística.....	62
3.2.5 Teste de relaxamento de DNA.....	63
- Procedimento experimental.....	63
- Análise do gel.....	63
3.2.6. Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i>.....	64
3.2.6.1. Obtenção e manutenção dos animais	64
3.2.6.2. Avaliação do efeito da SJC-8 em camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	64
- Procedimento Experimental.....	65
- Análise dos dados.....	66
3.2.6.3. Análise morfológica e histopatológica.....	66

- Procedimento Experimental.....	66
- Análise dos Dados.....	67
4. RESULTADOS.....	69
4.1. Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	69
4.1.2. Inibição da Proliferação de Células Tumorais <i>in vitro</i> – Ensaio do MTT.....	69
4.1.3. Atividade Hemolítica.....	72
4.1.4. Toxicidade aguda em <i>Artemia sp.</i>	72
4.2. Estudo do mecanismo de ação em células leucêmicas.....	72
4.2.1. Curva de crescimento celular.....	72
4.2.2. Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán.....	76
4.2.3. Inibição da síntese de DNA – Incorporação de BrdU.....	78
4.2.4. Análise morfológica – Coloração diferencial por H/E.....	80
4.2.5. Análise morfológica – Coloração Diferencial por BE/AL.....	82
4.3 Estudo de Genotoxicidade	84
4.3.1 Teste do cometa	84
4.4 Teste de relaxamento do DNA	87
4.5. Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i>.....	88
4.5.1. Avaliação do efeito da SJC-8 em camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	88
4.5.2. Análise morfológica e histopatológica.....	90
5. DISCUSSÃO.....	98
6. CONCLUSÃO	112
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia da <i>Tapirira guianensis</i>	33
Figura 2	Fotografia de um náuplio de <i>Artemia sp</i>	52
Figura 3	Fotografia dos tipos de cometa	62
Figura 4	Curva de crescimento de células HL-60 humana tratada com SJC-8	75
Figura 5	Efeito da SJC-8 na viabilidade das células HL-60 determinado por exclusão de azul de tripan depois de 24 horas de incubação	77
Figura 6	Efeito da SJC-8 na inibição da incorporação do 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) em células HL-60 depois de 24 horas de incubação	79
Figura 7	Fotomicrografia das células HL-60 coradas com hematoxilina/eosina	81
Figura 8	Efeito da SJC-8 em células HL-60, analisado por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina depois de 24 horas de incubação.....	82
Figura 9	Fotomicrografia das células HL-60 coradas com Brometo de Etídio/Laranja de Acridina	83
Figura 10	Efeito da SJC-8 nos tipos de dano causados ao DNA em células HL60 obtidos através do teste do cometa depois de 24 horas de incubação	86
Figura 11	Efeito da SJC-8 sobre o relaxamento do DNA pela inibição da atividade da enzima Topoisomerase 1	87
Figura 12	Efeito sobre a massa tumoral de animais transplantados com Sarcoma 180	89
Figura 13	Histopatologia dos rins de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180.....	93
Figura 14	Histopatologia do fígado de camundongos transplantados com	94

	células tumorais de Sarcoma 180	
Figura 15	Histopatologia dos baços de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180	95
Figura 16	Histopatologia dos tumores de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180	96
Figura 17	Estrutura química do derivado alquilado da ciclohexanona isolado da <i>Tapirira guianensis</i>	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estruturas químicas dos hidrobenzofuranóides (SJC-1 a SJC-5) isolados das folhas da <i>Tapirira guianensis</i>	34
Tabela 2	Estruturas químicas dos hidrobenzofuranóides (SJC-7 a SJC-9) isolados das folhas da <i>Tapirira guianensis</i>	35
Tabela 3	Lista de reagentes e soluções	40
Tabela 4	Linhagens tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	48
Tabela 5	Atividade citotóxica dos sete hidrobenzofuranóides em linhagens de células tumorais	70
Tabela 6	Atividade citotóxica da SJC-8 em linhagens de células tumorais	71
Tabela 7	Atividade cinética da citotoxicidade da SJC-8 em células HL-60 durante o crescimento celular	74
Tabela 8	Efeito da SJC-8 nos índices e freqüências de dano ao DNA em HL-60 obtidos através do teste do cometa após 24 horas de tratamento com SJC-8	85
Tabela 9	Efeito da SJC-8 ou 5-fluorouracil sobre o peso dos órgãos (fígado, rins e baço) dos animais transplantados com Sarcoma 180	92

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
&	E
μL	Microlitro
μM	Micromolar
°C	Graus Celsius
[]	Concentração
<	Menor que
>	Maior que
ANOVA	Analysys of Variance (Análise de variância)
BrdU	Bromodeoxiuridina
BE/LA	Brometo de etídio / laranja de acridina
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CI ₅₀	Concentração inibitória média
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P.M.	Erro padrão da média
5-FU	5-Fluorouracil
g	Gramma
h	Hora
H/E	Hematoxilina/Eosina
H ₂ O	Água destilada
IC	Intervalo de confiança
L	Litro

M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromido
n°	Número
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
pH	Potencial hidrogeniônico
q.s.p.	Quantidade suficiente para
SDS	Sodium Dodecyl Sulfato
SJC	Suzimone Jesus Correia (responsável pelo isolamento)
TBS	Tris buffer solution (Tampão tris)
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
X	Vezes

Resumo

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DOS HIDROBENZOFURANÓIDES ISOLADOS DAS FOLHAS DA *TAPIRIRA GUIANENSIS* (ANACARDIACEAE) Dissertação de Mestrado. Autora: Patrícia

Marçal da Costa. Orientadora: Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

Os hidrobenzofuranóides obtidos da *Tapirira guianensis* são derivados alquilados da ciclohexanona, que parecem ser possíveis precursores dos lipídios fenólicos. O presente trabalho avaliou, inicialmente, a atividade dos nove hidribenzofuranóides em linhagens de células, onde a amostra SJC-8 mostrou a citotoxicidade mais elevada. Posteriormente, foram avaliados os possíveis mecanismos pelo qual esta amostra desenvolve seu efeito citotóxico. No teste de MTT em painel de linhagens adicionais a SJC-8 apresentou valores de CI_{50} variando de 0.3 a 6.2 $\mu\text{g/mL}$. No teste de toxicidade aguda em náuplios de artêmia e de atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos, a SJC-8 não desenvolveu toxicidade e hemólise, respectivamente. O mecanismo de ação da SJC-8 foi, então, estudado. A viabilidade das células HL-60 foi afetada pela SJC-8 após um período de exposição de 24h, quando analisada por exclusão por azul de tripan. Nas menores concentrações não houve aumento do número de células não-viáveis, mas apenas uma redução da proliferação celular (ação citostática), enquanto que nas duas maiores concentrações, houve redução do número de células viáveis e aumento do número de células não-viáveis (efeito citotóxico), o que corrobora com os achados da análise morfológica, onde observou-se um aumento do número de células mortas. A atividade citotóxica da SJC-8 está relacionada com a inibição da síntese de DNA, como revelado pela incorporação do BrdU, além de poder estar envolvida com a inibição da Topoisomerase 1. Submetida ao estudo de toxicogenética pelo teste do cometa em HL-60, a SJC-8 elevou os índices e frequências de dano de maneira concentração-dependente, sendo observados tipos de danos maiores nas concentrações mais elevadas. A administração de SJC-8 (25 ou 50mg/kg/dia) inibiu o desenvolvimento de tumor sólido em camundongos transplantados com Sarcoma 180 em 12,3 e 59,8% respectivamente. A atividade antitumoral da SJC-8 está relacionada com a inibição da proliferação do tumor. A análise histopatológica mostrou de forma reversível, que o fígado é o alvo de toxicidade da droga. De fato, a atividade antitumoral da SJC-8 esta relacionada com um efeito antiproliferativo direto nas células tumorais, sendo possível assim que esta amostra possa atuar como possível protótipo de novos agentes antitumorais.

Abstract

ANTITUMOR POTENTIAL OF HYDROBENZOFURANOIDS ISOLATED FROM THE LEAVES OF *TAPIRIRA GUIANENSIS* (ANACARDIACEAE)

Master's dissertation. Author: Patrícia Marçal da Costa. Supervisor: Dr. Cláudia do Ó Pessoa. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

The hydrobenzofuranoids obtained from *Tapirira guianensis* are alkylated derivatives of cyclo-hexanone, which appear to be precursors of phenolic lipids. The present study initially examined the activity of nine hydrobenzofuranoids in cell lines, where the compound SJC-8 showed the highest cytotoxicity. In later studies, the cytotoxicity of this sample was investigated with regard to the possible mechanism of action. In the MTT assay, SJC-8 showed IC₅₀ values of 0.3 to 6.2 µg/mL in a panel of cell lines. In acute toxicity assays in artemia nauplii and hemolytic activity in mouse erythrocytes, SJC-8 did not demonstrate any toxicity or hemolysis, respectively. The mechanism of action of SJC-8 was then studied. SJC-8 affected cell viability in HL-60 after an exposure period of 24h, when determined by trypan blue exclusion. At lower concentrations, there was no increase in the number of non-viable cells but only a reduction in cell proliferation (cytostatic effect). However, at the two highest concentrations, there was a decrease in the number of viable cells and increase in number of non-viable cells (cytotoxic effect), which corroborate the findings of morphologic analysis showing an increase in the number of dead cells. The cytotoxicity of SJC-8 involves the inhibition of DNA synthesis, as revealed by inhibition of BrdU incorporation into DNA and of topoisomerase 1 activity. SJC-8 was tested for genotoxicity using the comet assay in HL-60 cells, and was found to cause an increase in the frequency of DNA damage in a concentration-dependent manner, where more severe damage was seen at higher concentrations of SJC-8. The administration of SJC-8 (25 or 50 mg/kg/day) inhibited solid tumor growth in mice transplanted with sarcoma 180, by 12.3 and 59.8%, respectively. The antitumor activity of SJC-8 is attributed to inhibition of tumor cell proliferation. Histopathologic analysis showed in a reversible manner that the liver is the target of drug toxicity. In conclusion, SJC-8 has antitumor activity where it has a direct antiproliferative effect on tumor cells, and may therefore serve as a prototype for new antitumor agents.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

A palavra câncer vem do latim *câncer* que significa caranguejo e da palavra grega *karkinos* (crustáceo, caranguejo). Foi usada pela primeira vez por Galeno (131-201) d.c. na Ásia Menor, para designar um tumor maligno de mama, por ele estudado, em que as veias, inturgescidas e ramificadas, lembravam as patas de um caranguejo (PY & JACQUES, 2003).

O câncer é uma doença genética e têm como denominador comum um crescimento desordenado de células que podem surgir em diversos tecidos e nos mais diferentes órgãos, com a propriedade de se disseminar para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, as células malignas tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores devido ao acúmulo de células cancerosas, na forma de neoplasias malignas (PY & JACQUES, 2003).

Estas alterações celulares podem se dar por três vias, a saber, dieta inadequada (35%), predisposição genética (20%) e pela via ambiental, que quando associada a fatores genéticos leva a um maior número de casos (REDDY *et al*, 2003).

A lesão genética é adquirida nas células somáticas, através de agentes ambientais, ou hereditária, na linha germinativa. Três classes de genes são os alvos da lesão genética: os proto-oncogenes que promovem o crescimento, os genes supressores dos tumores que inibem o crescimento e os genes que regulam a apoptose.(ROBBINS, 1995) Os produtos de genes supressores de tumor são proteínas com função regulatória negativa de crescimento e sua perda de função também promovem a carcinogênese (PERKINS & STERN, 1997).

Com raras exceções, algumas destas malignidades podem se formar a partir de infecções virais ou imunossupressão, nesse caso o câncer resulta de mutações em genes reguladores do crescimento celular ou que mantêm a

integridade do genoma. Mais comumente, as mutações são adquiridas por eventos somáticos que podem ser acumulados com a exposição de agentes ambientais, mas que habitualmente aparecem como uma consequência inevitável de causar erros em processos intrínsecos levando a célula a entrar em stress oxidativo. Algumas vezes, no entanto, as mutações são hereditárias e, portanto, de origem constitucional (BENSON, 2006).

Neste contexto, tem se obtido sucesso ao avaliar que a hereditariedade é um dos maiores fatores de risco para adquirir câncer. No carcinoma coloretal, por exemplo, avaliou-se que cerca de 10% dos casos são atribuídos a fatores Mendelianos (MERG *et al*, 2005). Os genes BCRA1 e BCRA2 também possuem fatores Mendelianos que conferem fatores de risco quase inevitáveis para desenvolvimento de câncer de mama e de ovário (NAROD & FOULKES, 2004). Outro exemplo é o de variantes comuns para o gene Chk2, que apesar de serem fracamente penetrantes, aumentam bastante o risco para desenvolver câncer de mama na população em geral (MEIJERS-HEIJBOER, 2002; SHAAG *et al*, 2005).

Há cerca de 25 anos a “guerra contra o câncer” foi lançada nos Estados Unidos pelo presidente Nixon e a partir daí vários investimentos foram atribuídos para o estudo do câncer, sendo estes dirigidos em sua maior parte e com auxílio das revolucionárias biologia celular e molecular. Durante as últimas cinco décadas o tratamento do câncer tem sido realizado primariamente com uso de várias formas de quimioterapia citotóxica e terapia de radiação. Mas em todos os casos a efetividade dos tratamentos citotóxicos, são limitados pela geração de efeitos colaterais desses agentes nos tecidos e células normais bem como resistência celular. (HANNUN, 1997)

O homem moderno é confrontado com um aumento na incidência e mortalidade por câncer. O aumento na incidência e mortalidade por câncer é fato, existindo mais de cem tipos de cânceres, como exemplo pode-se citar o de pele, pulmão, mama, fígado, estômago, rim, ovário, cérebro, próstata, pâncreas e ossos, sendo responsáveis anualmente pela morte de milhões de pessoas em todo mundo. Nos Estados Unidos, por exemplo, de cada quatro

mortes uma está relacionada a essa doença (www.cancer.gov, acesso em 17 de maio de 2006).

No Brasil, assim como em vários países desenvolvidos, não se conhece o número real de casos novos que são diagnosticados a cada ano pelos serviços de saúde, mas as estimativas para o ano de 2006 apontaram que ocorreriam 472.050 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele não melanoma, serão os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCA, 2006). Deste modo, são esperados 234.570 casos novos para o sexo masculino e 237.480 para o sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele não melanoma (116 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de mama feminina (49 mil), próstata (47 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (25 mil), estômago (23 mil) e colo do útero (19 mil) (INCA, 2006).

O tratamento do câncer vem sendo suportado por terapias convencionais, as quais causam sérios efeitos colaterais, podendo ainda desencadear processos de resistência ao agente usado no tratamento, e no melhor dos casos, conseguem estender meramente a vida do paciente por alguns anos, não aliando a isto uma melhora na qualidade de vida do mesmo. Há assim, uma clara necessidade de utilizar conceitos e/ou terapias alternativas na prevenção e tratamento do câncer (REDDY *et al*, 2003).

1.2. Produtos naturais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (WHO, 1998). A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade, tendo seu início provavelmente na pré-história (AKERELE, 1993). Os homens primitivos, assim

como os animais iniciaram as "práticas de saúde", alimentando-se de determinadas plantas, pelo instinto de sobrevivência. Exemplificando, o aparato médico egípcio de 2.500 a.C. era constituído por drogas de procedências diferentes, dentre elas, produtos vegetais, animais e minerais; por volta de 1550 a.C., foi encontrado no livro de Papiro a utilização de mais de 700 plantas usadas como fármacos (CORRÊA, 1998).

A biodiversidade de nossos vegetais representa uma grande riqueza em potencial para a saúde humana. Apesar disso, somente 1% das espécies vegetais conhecidas da Terra foram estudadas e várias espécies estão desaparecendo do planeta num ritmo sem precedentes, devido aos desmatamentos, além do constante aumento do nível de poluição das águas, solos e ar (CORRÊA, 1998).

Esses fatos levam a uma preocupação constante, pois uma numerosa parte dos medicamentos comercializados são derivados de produtos naturais, principalmente de plantas. Adicionalmente, sabe-se que, os produtos naturais na medicina alternativa (homeopatia, florais de Bach) ou fitoterápica (produtos de origem vegetal, como ervas medicinais) são utilizados por aproximadamente 80% da população mundial (IUCN, 1993). As atividades biológicas destes produtos naturais são descobertas primeiramente com bases folclóricas populares e só mais tarde é que se tem o desenvolvimento com embasamento científico, podendo citar como exemplo a efedrina, um agente antiasmático isolado da *Ephedra sinica* (LEE, 2004).

A descoberta de produtos naturais com propriedades biológicas têm seguido um via tradicional: Alvos moleculares são expostos a extratos brutos de plantas e no caso de existirem evidências de atividade, os extratos são fracionados e o composto ativo é isolado e identificado (ROUHI, 2003).

Essa busca guiada por novos compostos é um elemento crucial no campo da pesquisa farmacêutica moderna. Os produtos naturais, durante centenas de anos, provavelmente foram uma das únicas fontes farmacêuticas existentes, tendo estes dado enormes colaborações no campo saúde humana, podendo ser citados exemplos como as quininas, morfina, aspirina (análogo de produto natural), digoxina, dentre outros. De fato, fazendo uma breve

retrospectiva, o uso de produtos naturais como fonte de compostos bioativos tem se mostrado como uma das mais simples estratégias de sucesso para as mais novas descobertas da medicina moderna (TULP & BOHLIN, 2002; CRAGG, 2005).

O atual interesse na busca de novos agentes antimitóticos, por exemplo, é consequência de sua importância para o tratamento de diferentes formas de tumores malignos. Além dos esforços contínuos do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI) ao longo de quase quarenta anos buscando novos agentes antitumorais de origem natural (SUFFNESS & DOUROS, 1982; CRAGG & NEWMAN, 1999). Muitas drogas correntemente em uso na terapia do câncer foram descobertas de forma racional, baseada no desenho da estrutura, e muitas outras têm sido descobertas por processos empíricos. A avaliação da atividade antineoplásica dessas drogas, através de programas de *screening*, começou com a mostarda nitrogenada em 1940 e hoje existem mais de 50 drogas anti-câncer viáveis, onde 60% das drogas comercializadas são de origem natural.

No processo de descoberta de drogas anticâncer, o *screening* pré-clínico no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI) em linhagens tumorais humanas *in vitro* e seleção de testes *in vivo* ajudam a identificar a maioria das drogas alvos. No próximo estágio de desenvolvimento de drogas, ensaios toxicológicos, de produção e de formulação são realizados antes da droga iniciar uma triagem clínica (LEE, 1999).

Um grande número de drogas usadas no tratamento do câncer atualmente, vêm sendo sintetizadas a partir dos produtos naturais. Desde 1961 sete compostos derivados de plantas têm sido usados como drogas anti-câncer nos EUA, a saber: vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), etoposídeo (VP-16®), tenoposídeo (VM-26®), paclitaxel (Taxol®), vinorelbina (Navelbine®) e mais recentemente em 1996, docetaxel (Taxotere®), topotecano (Hycamtin®) e irinotecano (Camptosar®). Outros onze agentes estão sendo usados na medicina chinesa, sendo todos considerados importantes fármacos introduzidos na terapêutica nos últimos 20 anos e fundamentais para o

renascimento do interesse nos produtos naturais por parte da indústria farmacêutica (WANG & LEE, 1997; VIEGAS, *et al* 2006).

É importante ressaltar que as descobertas da campotecina e do taxol têm muito mais em comum do que apenas seu uso terapêutico, pois ambos os fármacos foram descobertos no mesmo grupo de pesquisa. Em 1966, Wall e colaboradores relataram, pela primeira vez, o isolamento da campotecina a partir de uma árvore chinesa, *Camptotheca acuminata* (WALL, 1966; OBERLIES, 2004). Mais tarde Moertel e colaboradores (1972) demonstraram em estudos pré-clínicos que a campotecina possuía apreciável atividade contra células da linhagem leucêmica L1210. A alta solubilidade da campotecina em água encorajou vários pesquisadores a realizar investigações clínicas da droga com seu sal de sódio solúvel em água. Infelizmente, a inibição tumoral insuficiente associada aos numerosos efeitos colaterais decorrentes do tratamento acabaram por suspender a triagem desta droga.

Então, em 1985, o interesse pela campotecina foi restabelecido a partir da descoberta de que a Topoisomerase 1 era um dos principais alvos celulares da droga, estabilizando a enzima de maneira covalente, pela formação de um complexo binário com a fita do DNA, inibindo sua síntese e causando morte celular na fase S do ciclo celular. Desta forma, desde esta descoberta, a campotecina tem sido alvo de numerosos estudos, a saber; dois análogos foram aprovados para uso clínico – os semi-sintéticos, análogos do topotecan (Hycantina®) solúveis em água e o irinotecan (Camptosar®) (HSIANG, 1985).

Praticamente na mesma época da descoberta da campotecina, em 1962, o grupo de Wall que pesquisava a atividade citotóxica de *C. acuminata*, o “National Cancer Institute” (NCI) dos EUA, selecionou o extrato das cascas de “Yew tree” (*Taxus brevifolia*) para avaliação de sua eventual atividade antitumoral. Entretanto, nos modelos *in vivo* utilizados pelo NCI, este extrato não foi muito ativo. Entre 1985 e 1995, estes dados e a forte pressão de militantes ambientalistas, motivaram intensos esforços no sentido de se encontrar fontes naturais alternativas para o taxol. O insucesso nestas iniciativas culminou quando, em 1994, a Bristol-Myers Squibb decidiu interromper o uso das cascas de *T. brevifolia*. (WALL, 1998).

Por outro lado, Wall havia observado uma forte correlação entre a atividade citotóxica *in vitro* em células 9KB e a atividade anti-câncer *in vivo*, o que estimulou seu grupo a prosseguir um estudo de fracionamento, que resultou no isolamento do taxol em 1966 (OBERLIES, 2004; VIEGAS, *et al* 2006). Estas duas substâncias foram aprovadas pelo “Food and Drug Administration” (FDA) dos EUA, em 1996, e atualmente são comercializadas pela GlaxoSmithKline e Pfizer (Farmácia), respectivamente, para tratamento de câncer de cólon e de ovário (VIEGAS, *et al* 2006).

Em 1979, um grupo de pesquisa descobriu que o mecanismo de ação do taxol se dava pela promoção da polimerização da tubulina, diferentemente dos já conhecidos na época, alcalóides das vinca que agiam por inibição da polimerização da tubulina. Desta forma o mecanismo de ação do taxol estava seguindo direção oposta, demonstrando que o mesmo não era apenas mais um agente citotóxico. Atualmente, nenhum agente quimioterápico de ocorrência natural tem se mostrado tão eficaz no tratamento do câncer quanto o Taxol®, hoje conhecido como paclitaxel, que é inclusive reconhecido como uma das mais importantes drogas usadas no tratamento do câncer de mama e ovário (KINGSTON, 2005).

Outro exemplo importante a ser citado é o grupo de drogas representado pelos aminoglicosídeos antraciclínicos, que são considerados um grande classe de antibióticos obtidos a partir da fermentação de diferentes microorganismos pertencentes ao gênero *Streptomyces*. As antraciclinas são metabólitos microbianos pertencentes a larga família de policetídeos, compreendendo vários grupos estruturais biologicamente ativos como as tetraciclinas e compostos antiparasitários como a avermectina (BROCKMANN, 1963; O’HAGAN, 1991). A atividade antitumoral da antraciclina biosintética foi reportada pela primeira vez em 1959, onde foi encontrada ação contra carcinoma de Ehrlich murino e sarcoma 180. Como exemplos de drogas dessa classe podemos citar a daunorrubicina e a doxorrubicina que tem por mecanismo de ação a ligação ao DNA, inibindo a síntese de DNA e RNA, e interferindo na ação da enzima Topoisomerase 1 (ARCAMONE, 1961; TEWEY, 1984).

Em decorrência desses fatos as estratégias para o desenvolvimento de novas drogas têm mudado ao longo dos anos. Os programas de *screening* começaram no início dos anos 50 no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, e consistiam no teste inicial de novos compostos, principalmente produtos naturais, em camundongos inoculados com leucemias L1210 e P388. Esse modelo foi bastante questionado, uma vez que não era considerado representativo dos tumores humanos, na sua maioria sólidos (SCHWARTSMANN & WORKMAN, 1993). Sendo assim, esse modelo foi reconsiderado e, atualmente, os programas de screening incluem uma etapa inicial de testes *in vitro* em linhagens tumorais humanas utilizando técnicas automatizadas (High throughput screening). O desenvolvimento das chamadas técnicas automatizadas acelerou a pesquisa de novas drogas anti-câncer, levando a uma grande demanda por bibliotecas de novas e promissoras moléculas (NEWMAN *et al.*, 2003). Sendo assim, as fontes naturais associadas à química combinatória continuam sendo as principais fontes dos ensaios bioguiados para descoberta de novas drogas com potencial terapêutico. A maior vantagem no estudo de produtos oriundos de fontes naturais é a sua diversidade estrutural que está diretamente relacionada à biodiversidade das fontes estudadas.

Neste contexto, o Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade do mundo, sendo que o número total de espécies presentes em seus biomas permanece desconhecido. Com relação as plantas superiores, estima-se que o Brasil possua um terço das espécies do mundo, contando ainda com um alto grau de endemismo. A grande diversidade reflete o número de biomas descritos para o país, a saber: floresta amazônica, mata atlântica, cerrado, caatinga e pantanal (ELISABETSKY & COSTA-CAMPOS, 1996; LEWINSOHN & PRADO, 2002).

Outro ponto relevante é a riqueza de conhecimentos etnofarmacológicos das espécies brasileiras. A maioria da população brasileira utiliza medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais. Os estudos com plantas medicinais brasileiras vêm sendo objeto de revisão em alguns livros, que já descrevem a utilização terapêutica de cerca de mais de 1500 espécies (MORS *et al.*, 2000; YUNES & CALIXTO, 2001; LORENZI & MATOS, 2002).

Estes fatos, certamente têm estimulado a busca por novos agentes com potencial anti-câncer a partir de fontes naturais, com a finalidade de obter novos protótipos, com mecanismos de ação mais seletivos, eficaz contra tumores resistentes e menor toxicidade, buscando uma melhor terapêutica.

1.2.1 A família Anacardiaceae

Anacardiaceae inclui 76 gêneros com 600 tipos de espécie, das quais está relatado na literatura que 25 gêneros contêm espécies venenosas. A função principal destes agentes químicos secundários nesta família seria usada como defesa contra animais herbívoros (HARTLEY, 1998). Estas oleoresinas das Anacardiaceas causam dermatite de contato mediada por células, levando a uma reação de hipersensibilidade 24 a 72 horas após a exposição. De modo geral, as espécies venenosas desta família estão restritas às tribos Anacardieae, Rhoeeae e Semecarpeae (BAER, 1983; VOGL, 1995; VOGL, 1996).

A dermatite de contato é um efeito provocado por esta família de plantas, sendo atribuído principalmente a compostos fenólicos e catecólicos ou a mistura destas substâncias, denominados lipídios fenólicos. Nos últimos anos, a origem dos lipídios fenólicos e derivados também foi objeto de investigação, com o principal intuito de descobrir os princípios ativos ou misturas destes, que desencadeiam a dermatite de contato, Kalish, 1995, descreveu que as oleoresinas de Anacardiaceas que induziam dermatite de contato eram derivadas de misturas de compostos fenólicos, além disso, espécies da família Anacardiaceae têm se mostrado bastante promissoras na busca de substâncias bioativas (CORREIA, 2006).

Existem várias espécies da família Anacardiaceae comercializadas no Brasil como a pimenta rosa brasileira (*Schinus terebinthifolius*), usada como tempero e manga (*Mangifera indica* L.), usada comumente no país como fruta comestível e que cresce em regiões tropicais e subtropicais é usada na

medicina popular para uma variedade de remédios (COE, 1996). Estudos químicos têm sido realizados com uma série de extratos aquosos das cascas de *Mangifera indica*. Estes extratos são usados em formulações farmacêuticas em Cuba (VIMANG®) como antioxidante, que recentemente demonstrou atividade antiinflamatória, *in vivo* e *in vitro* e anti-nociceptiva (GARRIDO *et al*, 2004). A árvore de laca oriental japonesa, (*Toxicodendron vernicifluum* formely *Rhus vernicifera*) tem sua seiva cultivada, servindo como verniz natural constituído de congêneres químicos derivados do urishiol (DU, *et al*, 1984).

A castanha do caju (*Anacardium occidentale* L.), também faz parte desta espécie. Nos anos mais recentes ela teve seu consumo aumentado, especialmente nos locais onde é cultivado, como no Brasil, onde seu suco é bastante popular. Os princípios ativos presentes nesta bebida, demonstraram atividade antitumoral superior quando comparados a muitos produtos de origem não natural, além disso, vários autores têm relatado que o ácido anacárdico presente nos extratos da fruta, possui atividade antibacteriana contra *Helicobacter pylori*, atividade moluscicida e citotóxica (KUBO *et al*, 1993; KUBO *et al*, 1999; SULLIVAN, 1982; HIMEJIMA, 1991; ITOKAWA, 1989). A atividade moluscicida do ácido anacárdico, relatada por Sullivan e col. (1982) veio inclusive a servir como meio para prevenção de Schistosomose, em decorrência da atividade anti-vetorial no controle do crescimento da população de caracóis (*Biomphalaria glabrata*) no Brasil e na África.

Tyman e Morris (1967) decreveram a composição do óleo da castanha como 71,7% de ácido anacárdico, 18,7% de cardol, 4,7% de cardanol, 2,7% de fenóis originais e 2,2% de dois ingredientes menores. O óleo da castanha do caju é usado como linimento para freios e isolamento elétrico (MITCHELL & MORI, 1987). Do mesmo óleo, o ácido anacárdico, 2-metilcardol e cardóis isolados de várias partes da castanha (*Anacardium occidentale*) todos compostos fenólicos, tem exibido atividade inibitória de tirosinoquinase, de forma competitiva pela inibição da oxidação de L- 3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (KUBO *et al*, 1994).

Outros testes de atividade citotóxica já foram realizados com plantas desta espécie. O material seco de 14 espécies, submetido à extração com

etanol (70% v/v) foi submetido ao teste do MTT para avaliar seu poder citotóxico contra células tumorais de Colo 320 (HARTLEY, 1998).

Neste contexto, a família Anacardiaceae faz parte de um excepcional grupo de plantas, de onde seus compostos químicos secundários são encontrados exercendo potencial terapêutico sobre a vida humana. Apesar de serem bastante citados na literatura, pesquisas adicionais precisam ser feitas, pois somente 12 dos 25 gêneros existentes têm sido analisados quimicamente e somente uma das poucas espécies de cada gênero tem sido bem estudada (MITCHELL, 1990).

1.2.2 O gênero *Tapirira*

O gênero *Tapirira* é composto de aproximadamente 15 espécies, pertencem a família Anacardiaceae e é encontrada primariamente no México e em todo território da América do Sul. (CORREIA *et al.*, 2001) *Tapirira guianensis* Aubl. é uma árvore alta que ocorre usualmente na floresta atlântica do Brasil. (Figura 1). Esta planta é comumente chamada de pau-pombo de onde a casca é usada pela população local contra lepra, diarreia e sífilis. (BRAGA, 1976). Pesquisas realizadas revelaram que o extrato etanólico (EtOH) aquoso seco da planta total, demonstrou citotoxicidade e efeitos tóxicos gerais (SUFFNESS *et al.*, 1988). Entretanto, não há relato na literatura dos constituintes químicos dessa planta (CORREIA, 2001). Um programa de busca da descoberta de novos agentes antitumorais revelou que o extrato clorofórmico das sementes de *Tapirira guianensis* apresenta atividade citotóxica contra linhagens de células de câncer de próstata humano. Nos últimos anos fitocompostos obtidos da *Tapirira* foram isolados, os quais são derivados alquilados da ciclohexanona que parecem ser possíveis precursores dos lipídios fenólicos (DAVID *et al.*, 1998; CORREIA, 2001).

As sete estruturas inéditas de hidrobenzofuranóides isoladas das folhas da *Tapirira Guianensis* e a análise desses derivados químicos foram caracterizadas a partir da análise dos dados no IV, UV, EM (IE, APCI, ESI) e

RMN (^1H , ^{13}C , incluindo técnicas bidimensionais), esta caracterização foi realizada no Departamento de química da Universidade Federal da Bahia (Tabelas 1 e 2) (CORREIA, 2005).

Desta forma, a importância dos produtos naturais, como no caso em questão, de vegetais superiores, é indiscutível, principalmente quando estes servem como fonte para desenvolvimento de projetos de screening e futura descoberta de novas drogas usadas na terapia do câncer ou até mesmo como ferramenta farmacológica usado no auxílio da pesquisa pré-clínica.



Fonte: www.arvores.brasil.nom.br/cerrd.tapiriri.jpg

Figura 1: Fotografia da *Tapirira Guianensis*.

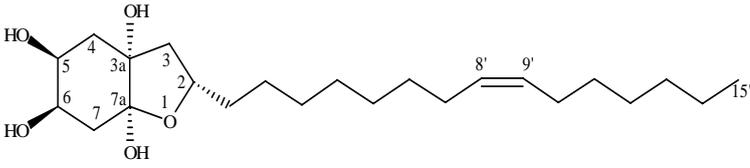
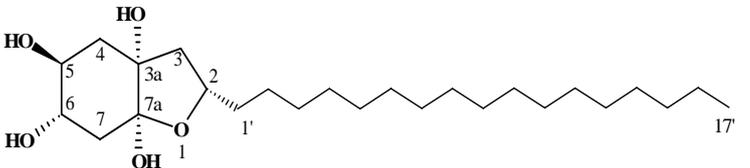
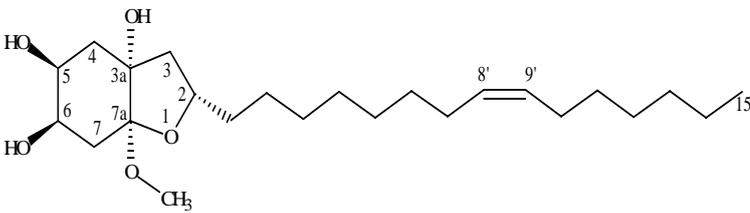
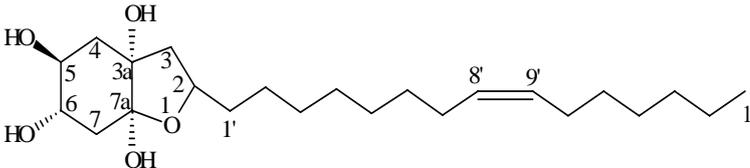
Nome Químico	Nome	Estrutura
(2 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>aS</i>)-2-[(8' <i>Z</i>)-Pentadec-8'-enil]-hexa-hidro-1-benzofurano-3 <i>a</i> ,5,6,7 <i>a</i> -tetrol.	SJC-1	
(2 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>aS</i>)-2-[Heptadecil]-hexa-hidro-1-benzofurano-3 <i>a</i> ,5,6,7 <i>a</i> -tetrol.	SJC-3	
(2 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>aS</i>)-2-[(8' <i>Z</i>)-Pentadec-8'-enil]-7 <i>a</i> -metoxi-hexa-hidro-1-benzofurano-3 <i>a</i> ,5,6(4 <i>H</i>)-triol.	SJC-4	
(2 <i>S</i> ,3 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>aS</i>)-2-[(8' <i>Z</i>)-Pentadec-8'-enil]-hexa-hidro-1-benzofurano-3 <i>a</i> ,5,6,7 <i>a</i> -tetrol.	SJC-5	

Tabela 1: Estruturas químicas dos hidrobenezofuranóides (SJC-1 a SJC-5) isolados das folhas da *Tapirira guianensis*.

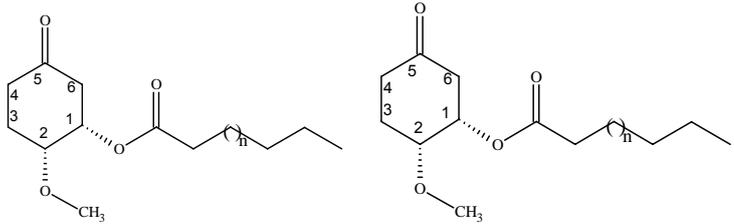
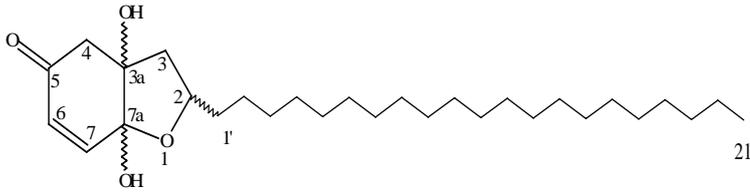
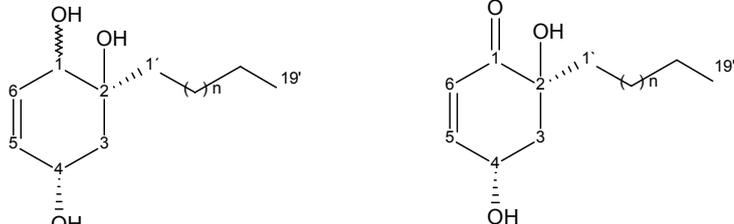
Nome Químico	Nome	Estrutura
Mistura de Tetracosanoato de (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-3-metoxi-5-oxo-ciclohexila e Tetracosanoato de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-3-metoxi-5-oxo-ciclohexila.	SJC-7	
3 <i>a</i> ,7 <i>a</i> -Di-hidroxi-2-[(8' <i>Z</i>)-heineicosan-8'-enil]-2,3,3 <i>a</i> ,7 <i>a</i> -tetra-hidro-1-benzofuran-5(4 <i>H</i>)-ona.	SJC-8	
Mistura de (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-nonadecil-ciclo-hex-5-eno-1,2,4-triol e (4 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6-nonadecil-4,6-di-hidroxi-ciclo-hex-2-en-1-ona.	SJC-9	

Tabela 2: Estruturas químicas dos hidrobenzofuranóides (SJC-7 a SJC-9) isolados das folhas da *Tapirira guianensis*.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o Potencial Antitumoral dos Hidrobenzofuranóides Isolados das Folhas da *Tapirira guianensis*, através dos estudos antitumorais *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Específicos

2.2.1 Determinar a atividade antiproliferativa, nas linhagens de células tumorais humanas, dos sete hidrobenzofuranóides isolados da *Tapirira guianensis*;

2.2.2 Determinar a atividade hemolítica do hidrobenzofuranóide selecionado no item 2.2.1 com o mais citotóxico, (3a,7a-Di-hidroxi-2-[(8'Z)-heineicosan-8'-enil]-2,3,3a,7a-tetra-hidro-1-benzofuran-5(4H)-ona (SJC-8);

2.2.3 Determinar a toxicidade do hidrobenzofuranóide SJC-8 em larvas da *Artemia salina*;

2.2.4 Caracterizar o possível mecanismo de ação do hidrobenzofuranóide SJC-8, utilizando células HL-60;

2.2.5 Avaliar o potencial genotóxico *in vitro*, do hidrobenzofuranóide SJC-8 utilizando células HL-60;

2.2.6 Determinar a atividade antitumoral *in vivo* do hidrobenzofuranóide SJC-8, selecionado *in vitro*, no tumor experimental Sarcoma 180.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais utilizados

3.1.1. Equipamentos

Agitador de placa MLW Modelo Thys 2

Aquário marinho

Banho-maria (Fanem®)

Centrífuga Excelsa Baby I FANEN Modelo 206

Centrífuga de placas Eppendorf Modelo Centrifuge 5403

Centrífuga de lâminas Shandon Southern Cytospin

Cuba e fonte para eletroforese (BioRad®)

Espectrofotômetro de placas Packard Spectra Count

Estufa (Fanem®)

Fluxo laminar (Veco®)

Frascos para cultura de células Corning®

Geladeira e freezer (Consul®)

Incubadora de células (CO₂ Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow

Lâminas e lamínulas

Microondas (Panasonic®)

Microscópio de fluorescência Olympus Modelo BX41

Microscópio óptico Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab

Microscópio óptico de inversão Nikon Diaphot

Pipetas automáticas (Gilson®) e pipetas Pasteur

Seringas descartáveis de 10mL e agulhas 25 x 7mm

Tubos Falcon® 15mL

Vidrarias, bastões de vidro e pipetas

3.1.2. Reagentes e Soluções

NOMES	<u>CONCENTRAÇÕES</u>	MARCA ®
Ácido Acético	32 N	REAGEN
Ácido Clorídrico	0,1 N	VETEC
Agarose LMP (0,5%)	0,5 agarose + 100ml PBS	GIBCO
Agarose NMP (1,5%)	1,5 agarose + 100ml PBS	GIBCO
Água do mar filtrada	-	-
Acridina Laranja	1g de acridina laranja (100µg/mL)	FLUKA
	H ₂ O q.s.p. 10mL de solução	-
Álcool Etílico	70%	VETEC
Anticorpo Anti – BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU	SIGMA
	BSA 5% q.s.p. 500 µL de solução	DAKO
Azul de tripan 10%	10 mg de Azul de tripan	SIGMA
	PBS q.s.p. 100 mL de solução	-

BrdU	10mM	SIGMA
Brometo de etídio 100 µg/mL (para acrina-orange)	1mg de Brometo de etídeo	SIGMA
	PBS q.s.p 10 mL de solução	-
Brometo de etídio 20 µg/mL (para cometa)	0,2mg de Brometo de etídeo	SIGMA
	PBS q.s.p 10 mL de solução	-
Citocalasina B	-	SIGMA
DMSO – Dimetilsulfóxido		VETEC
Diaminobenzidina (DAB)	5 µL de DAB	IMMUNOTECH
	1 mL de Tris-Hcl (Tris 0,05M) pH=7,6	PROQUIMIOS
	2 µL de H ₂ O ₂	PROQUIMIOS
Doxorrubicina	0,3 µg/mL	ZODIAC
Etanol	100%	VETEC
Eosina 0,5%	0,5 g de Eosina	DOLES
	80 mL de EtOH	VETEC
	0,5 mL de Ácido acético	VETEC
	20 mL de H ₂ O	-
Estreptavidina – fluoresceína	10µL de estreptavidina-fluoresceína	BOEHRINGER
	500µL do tampão de incubação	-

Estreptavidina – peroxidase	1µL de Estreptavidina – peroxidase	SIGMA
	BSA 5% q.s.p. 100 µL de solução	DAKO
Formalina neutra 10%	100 mL de Formaldeído 37%	VETEC
	4 g de Fosfato de sódio monobásico	LABSYNTH
	6,5 g Fosfato de sódio dibásico	LABSYNTH
	H ₂ O q.s.p. 900 mL	-
Ficoll (SIGMA®)	-	SIGMA
5- Fluorouracil	250 mg/10 mL	ICN FARMACÊUTI CA
Hematoxilina 0,1%	0,5 g de Hematoxilina	DOLES
	10 mL de Glicerina	LABSYNTH
	25 g de Sulfato de alumínio	LABSYNTH
	0,1 g de Iodeto de potássio	LABSYNTH
Kit Topo I Drug Screening Kit	-	TopoGEN, Inc.
KCl 0,5M	37,3 g de Cloreto de potássio	LABSYNTH
	H ₂ O q.s.p 1 L de solução.	-
KCl 0,075M	5,595 g de Cloreto de potássio	LABSYNTH
	H ₂ O q.s.p 1 L de solução	-
Meio de cultura de células	Diluído em água deionizada e	CULTILAB

RPMI 1640	esterelizada, filtrado em filtro millipore – 0,22 mm – e complementado com 10% SBF, 1% de glutamina, 1% de antibióticos, 1% de bicarbonato de sódio (0,75%) e 25 mM de HEPES	
Metanol	100%	VETEC
MTT (5mg/mL)	50mg de MTT	SIGMA
	PBS q.s.p. 10 mL de solução	-
N-Lauroylsarcosine		SIGMA
Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL	CULTILAB
	Estreptomicina 10 mg/mL	CULTILAB
PBS	NaCl (8,766g), Na ₂ HPO ₄ (2,76g) e NaH ₂ PO ₄ (0,274g)	
Sais (para cometa)	EDTA	QEEL
	NaOH	VETEC
	NaCl	SYNTH
	Tris	SIGMA
Solução Fixadora	3 Metanol : 1 Ácido Acético	-
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 ₂ O q.s.p 1 L de solução	-
Solução de Neutralização	0,4M Tris; pH 7,5	-
Solução de Eletroforese	1mM EDTA, 300mM NaOH; pH>13	-
Soro fetal bovino	-	CULTILAB
SSC 10X	Citrato de sódio 0,15 M	GRUPO QUÍMICA
	Cloreto de sódio 1,5 M	LABSYNTH
	H ₂ O	-
Tampão fosfato (PBS)	2,14 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O	LABSYNTH
	0,276 g de NaHPO ₄ .H ₂ O	LABSYNTH
	H ₂ O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	-
	8,766 g de Cloreto de sódio	LABSYNTH
Tampão Tris (TBS) 10X	Tris 0,5 M (pH= 7,6)	PROQUÍMIOS
	Cloreto de sódio 1,5 M	LABSYNTH
	H ₂ O	-
Tripsina 0,25%	0,125 g de EDTA	PROQUÍMIOS
	50 mL de Tripsina 2,5%	CULTILAB
	500 mL de PBS	-

	H ₂ O q.s.p. 100 mL de solução	-
Triton X -100 1%	1 mL de Triton X-100	ISO FAR

Tabela 3. Lista de reagentes e soluções

3.2. Metodologia Experimental

3.2.1. Obtenção dos hidrobenzofuranóides

Os hidrobenzofuranóides foram obtidos das folhas da *Tapirira guianensis*, tendo sido coletadas no estado da Bahia na forma de dois espécimens. As moléculas foram gentilmente cedidas pelos professores doutores Jorge David da Universidade Federal da Bahia e Suzimone Correia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

O espécimen de *T. guianensis* (1) foi coletado em 05 de setembro de 1996, no Campus de Ondina, nas proximidades do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA. O outro espécimen de *T. guianensis* (2) foi coletado na subida do Morro para o Pati, município de Andaraí-BA (Lat 12° 46'23''S; Long 41° 20'46'' W) em 10 de maio de 2003. Ambos espécimens foram identificados pela Prof^a Maria Lenise S. Guedes, curadora do Herbário Alexandre Leal da Costa do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, onde as exsiccatas dos espécimens encontram-se depositadas sob os números 031077 e 61884, respectivamente.

As folhas de *Tapirira guianensis* coletadas em 05/09/1996 (espécime 1), após secagem (2668 g) foram maceradas em hexano PA e o resíduo foi macerado em metanol. O extrato hexânico foi lavado com MeOH:H₂O (9:1). A fase hidrometanólica (26,0 g) foi submetida à CC em SiO₂, eluída com CH₂Cl₂, CHCl₃, e misturas de CHCl₃/CH₃OH (98:2, 95:5 e 90:10). A fração eluída com

CHCl₃/CH₃OH 90:10 (6,02 g) foi submetida a CC (SiO₂, CH₂Cl₂/CH₃OH em gradiente de polaridade).

A partir desse procedimento, a fração eluída com CH₂Cl₂/CH₃OH 98:2 (279,5 mg), após ser submetida à CCDP, eluída duas vezes com mistura de CHCl₃-CH₃OH 98:2 possibilitou o isolamento de SJC-4 (100,4 mg).

A fração eluída com CH₂Cl₂-CH₃OH 97:3 (422,0 mg) foi purificada por CC sob média pressão de N₂ em gel de sílica 60H, eluída com misturas de CHCl₃-CH₃OH em gradiente crescente de polaridade, o que possibilitou o isolamento de SJC-1 (137,8 mg).

A fração eluída com CH₂Cl₂-CH₃OH 93:7 (236,7 mg) foi submetida à CCDP em gel de sílica. As placas foram eluídas três vezes com mistura de CHCl₃-CH₃OH 9:1. Deste procedimento, após revelação com radiação UV e vapores de iodo, foram isoladas SJC-5 (97,3 mg) e SJC-3 (65,7 mg)

O extrato metanólico foi solubilizado em MeOH:H₂O (9:1), filtrado e extraído com hexano. A fração hexânica do extrato metanólico (11,83 g) foi submetida à CC, em gel de sílica 60 eluída em hexano-AcOEt em gradiente de polaridade. A fração eluída em acetato puro (835,82 mg) foi purificada por CC submetida a fracionamento por em gel de sílica 60, eluída com Hexano-AcOEt em gradiente de polaridade. A fração eluída com Hexano-AcOEt 6:4, após ser submetida à cromatografia por permeação em gel em Sephadex LH20 possibilitou a obtenção de SJC-9 (9,3 mg) e SJC-7 (14,3 mg).

As folhas de um segundo espécime de *T. guianensis* (4139,0 g), coletado no Morro do Pati, município de Andaraí-BA (Lat 12° 46'23''S; Long 41° 20'46'' W) em 10/05/2003 (espécime 2), foram submetidas ao mesmo protocolo que as folhas do espécime 1. A partir dos mesmos procedimentos foram isolados SJC-1 e SJC-4. Além dessas substâncias foi identificado SJC-8 como substância majoritária. SJC-8 (237,6 mg) foi obtida a partir do fracionamento da fase hidrometanólica do extrato hexânico (5,50 g) quando esta foi submetida à CC em SiO₂, eluída com CHCl₃/CH₃OH 95:5.

3.2.2. Estudo da atividade citotóxica *in vitro*

3.2.2.1. Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais

A citotoxicidade foi obtida através do método do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) (MOSMANN, 1983) utilizando as seguintes linhagens celulares: HL-60 (leucemia), K-562 (leucemia), HCT-8 (côlon), MDA/MB-435, MDA/MB-231, MX-1 (mama) M-14, UACC-62 e UACC-257 (melanoma) e SF-295 (sistema nervoso central) obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD) (Tabela 4). O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas.

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm², 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 CO₂, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas, quando necessário as células foram replicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de 0,5-1,0 x 10⁶ células/mL (BUTLER & DAWSON, 1992).

Linhagem	Tipo Histológico	Origem
HL-60	Leucemia promielocítica	humana
K-562	Leucemia mielocítica crônica	humana
HCT-8	Carcinoma de cólon	humana
MX-1	Mama	humana
MDA/MB-231	Mama	humana
MDA/MB-435	Mama	humana
M-14	Melanoma	humana
UACC-62	Melanoma	humana
UACC-257	Melanoma	humana
SF-295	Sistema Nervoso Central	humana

Tabela 4 - Linhagens tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Procedimento Experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL, para células suspensas K-562 e HL-60; $0,7 \times 10^5$ células/mL para células aderidas HCT-8; $0,1 \times 10^6$, para células também aderidas MDA/MB-435, MX-1, MDA/MB-231, SF-295, M-14, UACC-62, UACC-257. As substâncias testes foram incubadas durante 72 horas juntamente com a suspensão de células com concentrações variando de 0,39 a 25 $\mu\text{g/mL}$. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,003 a 0,25 $\mu\text{g/mL}$. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (15 g/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200 μL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% CO_2 . Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (30 g/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspenso em 150 μL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550nm. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

Análise dos dados

As amostras foram testadas em diluição seriada, em duplicata ou triplicata. Foi registrada a porcentagem de inibição x log da concentração a fim de determinar suas CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software).

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

Esta metodologia, foi descrita segundo Costa-Lotufo *et. al.* 2002; Dresch *et al.* 2005, permite avaliar o potencial das substâncias-testes em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

Procedimento Experimental

Foi coletado o sangue de três camundongos (*Mus musculus* Swiss) por via orbital, sendo diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina por centrifugação (15 g/3 min.) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Os ensaios foram realizados em multiplacas com 96 cavidades. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 100 µL de solução salina e 100 µL da substância teste em solução. Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X – 100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 1,5 a 200 µg/mL. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram plaqueados em todos os poços.

Após incubação de 1 hora, sob agitação constante à temperatura ambiente (26 ± 2°C), a amostra foi centrifugada (50 g/3 min.) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância no

espectrofotômetro de placa a 540nm. A atividade da substância teste foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo. Neste ensaio, a substância é considerada ativa quando apresenta $CE_{50} < 200\mu\text{g/mL}$.

3.2.2.3. Estudo da toxicidade aguda em larvas de *Artemia sp.*

O gênero *Artemia* é classificado como pertencente ao Filo Artropoda, Subfilo Crustacea, Classe Branchiopoda (RUPERT & BARNES, 1996). *Artemia sp.* é um pequeno crustáceo que tem sido bastante utilizado em muitos estudos fisiológicos. A *Artemia sp.* possui o desenvolvimento indireto, com capacidade de encistamento. Os náuplios (larvas características) são facilmente obtidos através da hidratação dos cistos. Passam por vários estágios larvais, antes da maturação. No primeiro estágio, náupilo I, o trato digestivo desses animais não entra em contato com o meio externo e sua alimentação consiste basicamente do vitelo do próprio ovo. Com a mudança para o estágio II, os náuplios começam a se alimentar de matéria orgânica em suspensão, através da ingestão contínua da água circulante. Sendo os náuplios mais sensíveis nesse estágio, os mesmos são utilizados nos testes de toxicidade. É uma metodologia simples que permite a avaliação da toxicidade aguda de extratos brutos, frações ou substâncias puras provenientes de produtos naturais.

Procedimento Experimental

Os cistos de *Artemia sp.* foram mantidos por 24h em um béquer com água do mar filtrada, sob aeração suave e iluminação intensa, até a eclosão dos náuplios I. Estas larvas foram separadas em um segundo béquer onde foram mantidas por mais 24h para atingirem o estágio de náuplio II. O plaqueamento foi realizado pela adição de 10 náuplios em placas com 24 poços, contendo os compostos em concentrações diferentes (1, 3, 10, 30 e 100

$\mu\text{g/mL}$), em triplicata. Como controle negativo, foi utilizado água do mar filtrada e o veículo usado para diluir as substâncias (DMSO). As placas foram incubadas à temperatura ambiente, por 24h. Depois foram contados as larvas vivas e mortas correspondentes a cada poço (JIMENEZ *et al.*, 2003).



Fonte: Bezerra (2005)

Figura 2 – Fotografia de um náuplio de *Artemia sp.*

Análise dos dados

O cálculo da dose que causa letalidade de 50% dos náuplios (DL_{50}) foi obtido pelo método dos probitos (LITCHFIELD & WILCOXON, 1949). Os dados correspondem à média e ao erro-padrão da média de dois experimentos independentes realizado em triplicata.

3.2.3. Estudo do mecanismo de ação em células leucêmicas

3.2.3.1. Curva de Crescimento Celular

A construção da curva de crescimento celular pode fornecer informações importantes sobre a cinética da cultura de células em questão. A observação, em curtos intervalos de tempo, dessas culturas tratadas permite avaliar a ação citotóxica temporal da amostra, SJC-8, assim como o acompanhamento das alterações morfológicas das células a medida que vão acontecendo.

Procedimento Experimental

Inicialmente, as células HL-60 foram distribuídas em multiplacas de 24 cavidades numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL e incubadas com SJC-8 nas concentrações de 0.5; 1.0; 2.0; 3.0 e 4.0 $\mu\text{g/mL}$. Nos intervalos programados de 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h após o plaqueamento, uma alíquota de cada amostra foi retirada e as células viáveis foram diferenciadas por exclusão de azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer.

Análise dos dados

O valor obtido para cada contagem foi plotado em um gráfico e construído uma curva com as variáveis: porcentagem de células viáveis x log da concentração, para cada tempo analisado, para a observação da cinética de crescimento das células tratadas. Foram determinadas suas CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software). Para verificação

da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os valores das CI_{50} foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.2.3.2. Estudo da 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 dessa maneira observar uma coloração azulada nas células mortas.

Procedimento Experimental

Células da linhagem HL-60, foram plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 h com a SJC-8 nas concentrações 1.0; 2.0 e 4.0 $\mu\text{g/mL}$, (2.2, 4.4 e 8.8 μM respectivamente) tendo sido examinadas ao microscópio de inversão. As concentrações foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada nas curvas de crescimento para a mesma linhagem celular. A Doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo. Foram retirados 90 μL da suspensão de células e adicionado a 10 μL do azul de tripan. As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer. (VERAS *et al.*, 2004).

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas

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

3.2.3.3. Inibição da síntese de DNA – BrdU

A bromodeoxiuridina (BrdU) é uma base nitrogenada análoga a Timidina. Quando as células estão sintetizando DNA o BrdU é incorporado no lugar da timidina. A detecção do BrdU incorporado nas células é feita por técnicas imunohistoquímicas. O BrdU é adicionado 3h antes do término do período de incubação (24 horas), para que esse seja incorporado ao DNA das células em mitose. 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%). São contadas as 200 (duzentas) primeiras células observadas em microscópio óptico. 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).

Procedimento Experimental

Células da linhagem HL-60, foram plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 h com a SJC-8 nas concentrações 1.0; 2.0 e 4.0 $\mu\text{g/mL}$, (2.2, 4.4 e 8.8 μM respectivamente) tendo sido examinadas ao microscópio de inversão. A Doxorrubicina (0.3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo. Três horas após a adição do BrdU (0.01 μM) na cultura de células HL-60, as lâminas para cada concentração da SJC-8 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 minutos. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 minutos a 70° C e pH 7.4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram circuladas com caneta hidrofóbica e incubadas com anticorpo primário e deixadas na geladeira

durante a noite em câmara úmida. As células foram incubadas com anticorpo secundário biotilado por 20 minutos e, em seguida, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 minutos. Foi adicionado o cromógeno DAB por 1-5 minutos e, em seguida, removido com água destilada. A contra coloração das células foi realizada com hematoxilina da Hanks a 0.1%. (VERAS *et al.*, 2004).

Análise dos dados

Duzentas células foram contadas, diferenciando-as entre núcleo marrom (incorporaram o BrdU) e não-marrom. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.2.3.4. Análise morfológica – Coloração diferencial por hematoxilina/eosina

A coloração utilizada nesse experimento permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. A hematoxilina é um corante alcalino que tem afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo uma cor azul. A eosina, ao contrário, liga-se ao citoplasma conferindo-lhe uma coloração rósea.

Procedimento Experimental

Células da linhagem HL-60, foram plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 h com a SJC-8 nas concentrações 1.0; 2.0

e 4.0µg/mL, (2.2, 4.4 e 8.8µM respectivamente) tendo sido examinadas ao microscópio de inversão. A Doxorrubicina (0.3 µg/mL) foi usada como controle positivo. Para observar a morfologia, 50µL da suspensão de células foram utilizados na preparação das lâminas em citocentrífuga (cytospin). Após a adesão das células na lâmina a fixação foi feita com metanol 96% por 5 minutos e a coloração primeiramente utilizada foi a hematoxilina, seguida pela eosina. (VERAS *et al.*, 2004).

Análise dos dados

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

3.2.3.5. Análise morfológica por fluorescência – Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

O método de coloração pelo brometo de etídio / laranja de acridina (MCGAHON *et al.*, 1995) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da coloração diferencial por fluorescência. Este método baseia-se na revelação das células (controle e tratadas) com a coloração por brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA) no núcleo. A laranja de acridina intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas. O brometo de etídio é incorporado majoritariamente por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA corando-o de laranja; ligando-se fracamente ao RNA, que se mostrará com uma coloração vermelha. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA; O BE marca muito fracamente ou muitas vezes não marca, pois não atravessa a membrana íntegra. As células em apoptose inicial

(membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE; morfológicamente observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células em necrose (lesão de membrana) apresentam um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e não há formação de corpos apoptóticos. Possivelmente, as membranas plasmáticas permaneçam intactas durante o fenômeno apoptótico até os últimos estágios quando se tornam permeáveis aos solutos normalmente retidos (KUMMAR *et al.* 2004).

Procedimento Experimental

Células da linhagem HL-60, foram plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 h com a SJC-8 nas concentrações 1.0; 2.0 e 4.0 $\mu\text{g/mL}$, (2.2, 4.4 e 8.8 μM respectivamente) tendo sido examinadas ao microscópio de inversão. A Doxorrubicina (0.3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo. A suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 3 min em baixa rotação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas nos tubos em 20 μL de solução de PBS. Em seguida, 1 μL da solução de BE:LA (100 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células foi transferida para uma lâmina e montada com lamínula. Posteriormente essas lâminas foram levadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares. (GENG *et al.*, 2003).

Análise dos Dados

Foram contadas 300 células, em duplicata, para quantificação do percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas) para cada concentração. Em seguida as lâminas foram fotografadas para o registro visual dos efeitos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os

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

3.2.4. Estudo de Genotoxicidade

3.2.4.1. Teste do cometa

Desenvolvido por OSTLING & JOHANSON (1984) e modificado por OLIVE (1989) e SINGH *et al.* (1988), o teste do cometa, também chamado de *Single-cell gel electrophoresis (SCGE)*, vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas (RIBEIRO *et al.*, 2003) e, portanto, alcançou o status de um ensaio padrão em uma bateria de testes usados para avaliar a segurança de novos fármacos e outros compostos (COLLINS, 2001).

A análise do teste do cometa alcalino avalia a extensão de quebra ao DNA após exposição das células a substâncias com potencial genotóxico. Este teste não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa podem ser de correção ou levar a apoptose. Assim sendo, este teste pode ser utilizado em estudos de análise de reparo do DNA (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Neste trabalho, foram usadas células de leucemia promielocítica HL-60.

Preparação das Amostras

Neste ensaio foi utilizado como controle positivo a doxorubicina (0.3µg/mL) e, como controle negativo as células HL-60 foram expostas ao DMSO (0.5%). As células foram incubadas com a SJC-8 nas concentrações

0.5, 1.1, 2.2, 4.4 e 8.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1.1, 2.4, 4.8, 9.6 e 19.2 μM , respectivamente) por 24h a 37°C, assim como os grupos controle positivo e negativo.

Ao término da incubação em cada cultura, foi retirada uma alíquota de 20 μL de células, a qual foi adicionada a 110 μL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% para preparo das lâminas. Para estes testes as lâminas foram preparadas em duplicata, com dois experimentos independentes.

Preparação das lâminas e lise celular

As lâminas foram previamente cobertas por solução de agarose de ponto de fusão normal 1,5% a 60°C e mantidas a temperatura ambiente por 24h até a solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão da segunda camada de agarose de baixo ponto de fusão, a qual foi preparada previamente. Em seguida, foram cobertas com lamínulas (24x60mm) para uniformizar a distribuição das células e mantidas a 4°C para solidificação da agarose. Após solidificação da agarose, a lamínula foi gentilmente removida e a lâmina mergulhada em solução de lise a 4°C (mantida na geladeira), protegida da luz por no mínimo 1h antes da corrida de eletroforese.

Neutralização e Eletroforese

Depois de removidas da solução de lise, as lâminas foram neutralizadas por 15min em solução de neutralização e dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese. A cuba foi mantida em “banho de gelo” para a manutenção da temperatura em torno de 4°C, tendo sido acrescentada a solução de eletroforese até completa imersão das lâminas.

Antes de iniciar a corrida de eletroforese, as lâminas ficaram em repouso por 20min para permitir o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios álcali-lábeis. Posteriormente, a eletroforese

foi conduzida em baixa luminosidade, usando 25v (volts) e corrente de 300mA por 20min. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas na solução de neutralização por 5 minutos, a fim de neutralizar a alcalinidade.

Fixação e Coloração

As lâminas foram fixadas em etanol 100%. Posteriormente, foram coradas com 50µl de solução de Brometo de Etídio (20µg/mL) e, em seguida, cobertas com lamínula, sendo analisadas em microscópio de fluorescência.

Escore das lâminas

A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (figura 5). Foram contados 50 cometas por lâmina e classificados dentre as cinco categorias (0; 1; 2; 3 e 4) que representam a porcentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de lesão sofrido pela célula.

0 = sem danos (<5%)

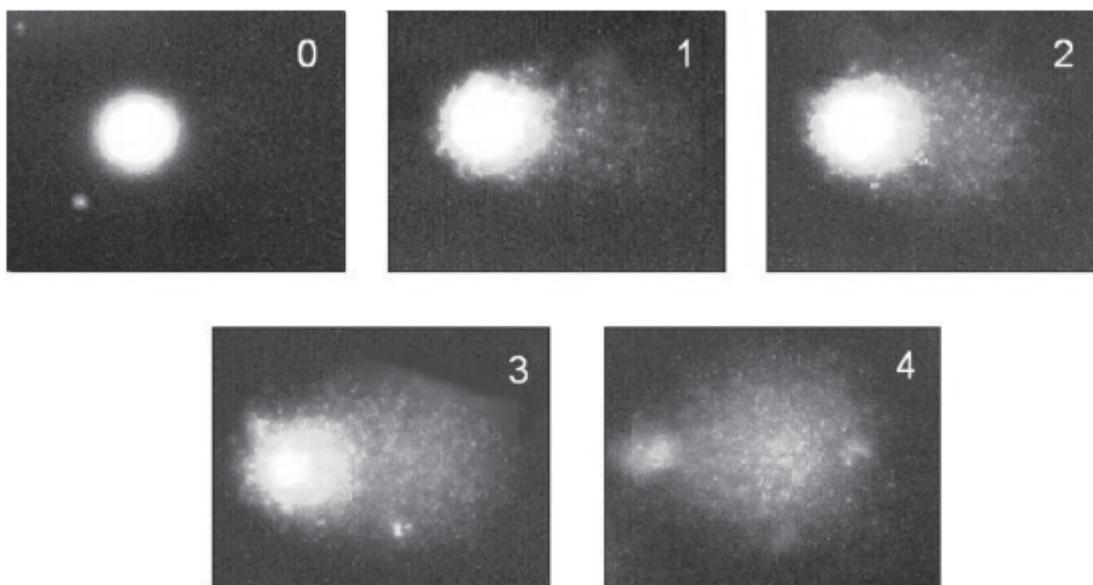
1 = baixo nível de danos (5-20%)

2 = médio nível de danos (20-40%)

3 = alto nível de danos (40-95%)

4 = dano total (95%)

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



Fonte: Collins (2004)

Figura 3: Tipos de cometa: Representação dos cometas, sendo indicado o escore atribuído a cada cometa de acordo com o dano ao DNA.

Análise Estatística

Para análise estatística dos experimentos, foram utilizados os testes ANOVA e Tukey no software Prism® versão 4.0 (GraphPad Prism Software), sendo os resultados considerados significantes quando $p < 0,05$.

3.2.5 Teste de relaxamento de DNA

As Topoisomerases 1 e 2 do DNA são enzimas que modulam o estado topológico do DNA. Alterações como a superhelicoidização do DNA são consideradas processos que influenciam a replicação, transcrição e empacotamento de DNA. O presente experimento é capaz de demonstrar a capacidade de inibição destas enzimas pelo método de eletroforese em gel de agarose.

Procedimento Experimental

Os efeitos inibitórios da SJC-8 nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ (22 e 44 μM) na Topoisomerase 1 foram medidos usando o kit Topo I (TopoGEN, Inc.). O plasmídeo superhelicoidizado (250ng) foi incubado com quatro unidades de Topoisomerase 1 humana a 37°C por trinta minutos em tampão de relaxamento (10 mM de tampão Tris pH 7.9, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.1% BSA, 0.1 mM espermidina e 5% glicerol), na ausência ou presença de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ de SJC-8 (final 20 μL). Campotecina (0.1mM) foi usada como controle positivo. A reação foi terminada com adição de 10% de SDS (2 μl) e proteinase K (50 $\mu\text{g/mL}$), seguida de incubação a 37 °C por 30 minutos. As amostras de DNA foram adicionadas com o tampão de leitura (2 μl) e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% por 120 minutos a temperatura ambiente, sendo visualizados pela coloração com brometo de etídio.

Análise do Gel

Na análise foi avaliada a capacidade da SJC-8 de intercalar ou inibir o desenrolamento do DNA, através da intensidade das bandas visualizadas no gel.

3.2.6. Estudo da atividade antitumoral *in vivo*

3.2.6.1. Obtenção e manutenção dos animais

Os testes para avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foram realizados utilizando camundongos (*Mus musculus* Swiss) fêmeas pesando entre 25-30g oriundos do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, mantidos com água e alimento *ad libitum*. O manejo dos animais foi realizado procurando seguir todos princípios éticos, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento dos animais.

3.2.6.2. Avaliação do efeito da SJC-8 em camundongos transplantados com Sarcoma 180

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

Procedimento Experimental

Para o teste de atividade antitumoral, foi utilizado o tumor sólido do tipo Sarcoma 180, com 10 dias de implantação na região axilar. O animal doador, ou da manutenção, foi sacrificado por deslocamento cervical, sendo realizado assepsia com álcool iodado. Em seguida, foi retirado o líquido ascítico da cavidade abdominal, tendo sido preparado uma suspensão de células com 5,0mL de Ringer lactato, 0,2mL de gentamicina (5mg/mL) e 0,5mL do líquido ascítico, para posterior contagem de células. Nos animais receptores, foram injetadas 2×10^6 céls/0,5mL na região axilar direita dos camundongos (*Mus musculus* Swiss). Nesse experimento, foram utilizados 10 animais por grupos, num total de 6 grupos, sendo todas fêmeas, apresentando massa corpórea variando entre 25-30 g, os quais foram inoculados com tumor Sarcoma 180. Em seguida, 24 h após a inoculação do tumor foi iniciado o tratamento durante 7 dias consecutivos, utilizando as doses de 25 ou 50 mg/Kg para SJC-8 e no controle positivo 25 mg/Kg de 5 - Fluorouracil, além dos animais tratados com veículo (DMSO 2%). Vinte quatro horas após o termino do tratamento os animais foram sacrificados, sendo em seguida retirados os tumores, rins, fígado e baço para pesagem e análise histológica.

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

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

Onde:

A = média dos pesos dos tumores no grupo controle.

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

Análise dos dados

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

3.2.6.3. Análise morfológica e histopatológica

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

Procedimento Experimental

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

Análise dos dados

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

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Estudo da atividade citotóxica *in vitro*

4.1.2. Inibição da Proliferação de Células Tumorais *in vitro*

O potencial citotóxico dos sete hidrobenzofuranóides foi avaliado em células de linhagens tumorais humanas e (HL-60, MDA/MB-435, HCT-8 e SF-295) através do método do MTT, após 72 horas de exposição. A tabela 5 apresenta os valores das CI_{50} obtidos.

Neste ensaio foi observado que as amostras SCJ-3, SCJ-5, SCJ-7 e SC-9 não apresentaram potencial citotóxico em nenhuma das linhagens testadas, cujas CI_{50} foram superior a $13\mu\text{g/mL}$. Enquanto, as amostras SJC-1 e SCJ-4 apresentaram potencial citotóxico apenas em uma linhagem celular, cuja CI_{50} foi $4.7\mu\text{g/mL}$ para célula HCT-8 e $4.4\mu\text{g/mL}$ para célula MDAMB-435 respectivamente. A amostra SJC-8 foi a que mais apresentou potencial citotóxico, uma vez que suas CI_{50} variaram entre 1.7 a $5.2\mu\text{g/mL}$, não sendo seletiva para nenhuma das linhagens testadas (Tabela 5).

Posteriormente, a SJC-8 foi testada em adicionais linhagens celulares, cuja citotoxicidade foi mais elevada para as linhagens de melanoma, com CI_{50} de $0.3\mu\text{g/mL}$ para UACC-62, e $0.4\mu\text{g/mL}$ para M-14 e UACC-257. Enquanto que para as células de mama foram $2.6\mu\text{g/mL}$ para MX1 e $2.7\mu\text{g/mL}$ para MDA MB-231. Tendo sido menos citotóxica para a K-562 cuja CI_{50} foi de $6.2\mu\text{g/mL}$ (Tabela 6)

Linhagem celular	HCT-8	HL-60	MDA/MB-435	SF-295
Doxorrubicina	0.01 (0.02)	0.02 (0.03)	0.01 (0.02)	-
CI ₅₀ [µg/m]	0.01 – 0.02	0.01 – 0.02	0.01 – 0.02	
SJC-1	4.70 2.3-9.3	6.5 4.8-8.6	>25	17.2 12.5-23.5
SJC-3	> 25	18.2 14.6-22.8	13.0 8.3-20.4	>25
SJC-4	> 25	12.2 8.6-17.5	4.4 1.8-10.4	>25
SJC-5	16.69 8.2-33.8	21.6 13.2-35.1	19.2 13.8-26.7	20.59 13.6-30.9
SJC-7	>25	>25	>25	>25
SJC-8	3.7 2.4-5,7	1.7 1.2-2.4	1.9 1.4-2.7	5.2 2.8-9.8
SJC-9	>25	>25	>25	>25

Tabela 5 – Atividade citotóxica dos hidrobenzofuranóides em linhagens de células tumorais. A tabela esta apresentando os valores de CI₅₀ e o intervalo de confiança de 95% de dois experimentos independentes realizado em triplicata pelo método do MTT após 72 horas de incubação com as amostras.

Linhagem celular	SJC-8
	CI ₅₀ [µg/ml(µM)]
M-14	0.4 (0.8) 0.3-0.5
UACC-62	0.3 (0.6) 0.2-0.3
UACC-257	0.4 (0.8) 0.3-0.4
K-562	6.2 (13.6) 2.7-8.3
MX-1	2,6 (5.7) 2,2 - 3,1
MDA/MB-231	2,71 (5.9) 2,3 - 3,1

Tabela 6 – Atividade citotóxica do composto 3a,7a-Di-hidroxi-2-[(8'Z)-heineicosan-8'-enil]-2,3,3a,7a-tetra-hidro-1-benzofuran-5(4H)-ona (SJC-8) em linhagens de células tumorais. A tabela esta apresentando os valores de IC₅₀ e o intervalo de confiança de 95% de dois experimentos independentes realizado em triplicata pelo método do MTT após 72 horas de incubação com a amostra.

4.1.3. Atividade Hemolítica

O efeito hemolítico da SJC-8 foi avaliado em eritrócitos de camundongos *Mus musculus Swiss*. Neste ensaio, foi observada ausência de atividade hemolítica nas concentrações testadas até 200µg/mL, sendo este o valor máximo testado.

4.1.4. Toxicidade Aguda em *Artemia sp.*

No teste de toxicidade aguda em larvas de *Artemia sp.*, a SJC-8 apresentou valor para a dose letal média maior que 100µg/mL. Nenhuma concentração conseguiu reduzir o número de larvas vivas não sendo possível determinar a DL₅₀.

4.2. Estudo do mecanismo de ação em células leucêmicas

4.2.1. Curva de crescimento celular

Este ensaio avaliou a cinética de crescimento das células tratadas com SJC-8 nos intervalos de tempo de 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h na célula HL-60. A SJC-8 causou uma significativa redução na viabilidade celular da linhagem celular de leucemia humana testada, que ocorreu de modo dependente da concentração X tempo de exposição, de acordo com suas CI₅₀ (Figura 4).

Nas células expostas à SJC-8 por 6h e 12h não foram observadas alterações na viabilidade celular. Depois de 24h de exposição à SJC-8, ocorreu uma redução no número de células viáveis em todas as concentrações testadas. ($p < 0,05$). Assim, baseado nos dados de três experimentos

independentes realizados em duplicata, os valores de CI_{50} após 24h foram de $2.9 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ ($6.3 \mu\text{M}$), para as células leucêmicas HL-60 (Tabela 7).

Durante a exposição de 36h, a citotoxicidade da SJC-8 foi mais elevada do que a encontrada no tempo de exposição de 24h ($p < 0,05$). Os valores da CI_{50} no tempo de 36h foram de $1.1 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ ($2.4\mu\text{M}$), para as células HL-60 (Tabela 7). Após 36 horas de exposição o efeito citotóxico da SJC-8 aumentou de maneira tempo e dose dependente entre os intervalos de 48h, 60h e 72h. Não houve diferença estatística na atividade citotóxica da SJC-8 entre os tempos 48h e 60h de exposição, cujas CI_{50} foram de $1.0 \pm 0.01\mu\text{g/mL}$ e $0.9 \pm 0.16\mu\text{g/mL}$ respectivamente, entretanto no intervalo de 72h a CI_{50} foi de $0.7 \pm 0.01\mu\text{g/mL}$ ($1.5 \mu\text{M}$), tendo sido significativo quando comparado entre os intervalos de tempo analisados, $p > 0,05$. (Figura 4).

Tempo	HL-60 µg/ml(µM)
6 horas	> 4 (> 8.7)
12 horas	> 4 (> 8.7)
24 horas	2.9 ± 0.06 ^a (6.3)
36 horas	1.1 ± 0.15 ^a (2.4)
48 horas	1.0 ± 0.10 (2.2)
60 horas	0.9 ± 0.16 (1.9)
72 horas	0.7 ± 0.01 ^a (1.5)

Tabela 7 – Determinação cinética da citotoxicidade da SJC-8 em linhagem de célula de leucemia humana. Os dados correspondem aos valores de CI_{50} (média ± E.P.M.) de três experimentos independentes realizados em duplicata para as células de leucemia humana HL-60 (leucemia promielocítica). ^a ($p < 0,05$) ANOVA seguido por Student Newman Keuls comparado entre as horas de HL-60. Os valores de CI_{50} foram determinados por regressão não-linear usando o programa Prism versão 4.0 (Graphpad Software, Inc).

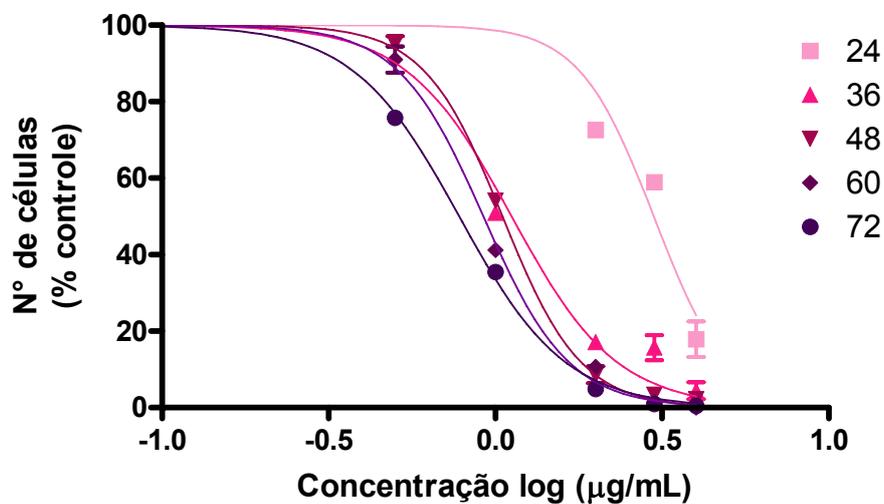


Figura 4 – Curva de crescimento da célula de leucemia humana tratadas com SJC-8. A viabilidade celular foi determinada por exclusão de azul de tripan nos tempos de 24 (■), 36 (▲), 48 (▼), 60 (◇) e 72 (●) horas após a incubação. Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizado em duplicata para as células de leucemia humana HL-60. Os resultados com 6h e 12h não foram mostrados.

4.2.2. Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán

O ensaio da viabilidade celular de exclusão por azul de tripan permitiu a comparação do padrão de crescimento das células tratadas e não-tratadas pela contagem diferencial das células viáveis e não-viáveis de cada tratamento.

As análises da viabilidade celular em linhagem leucêmica HL-60 por exclusão de azul de tripan, depois de 24 horas de exposição demonstram que a SJC-8 causou uma significativa redução no número de células viáveis e um aumento do número de células não viáveis apenas na concentração de 4 μ g/ml (8.8 μ M) ($p < 0,05$), Não houve diferenças significativas entre as concentrações 1 μ g/mL (2.2 μ M) e 2 μ g/mL (4.4 μ M). A doxorubicina foi testada como controle positivo na concentração de 0.3 μ g/mL causando 58% de redução no número de células viáveis para HL-60. (Figura 5)

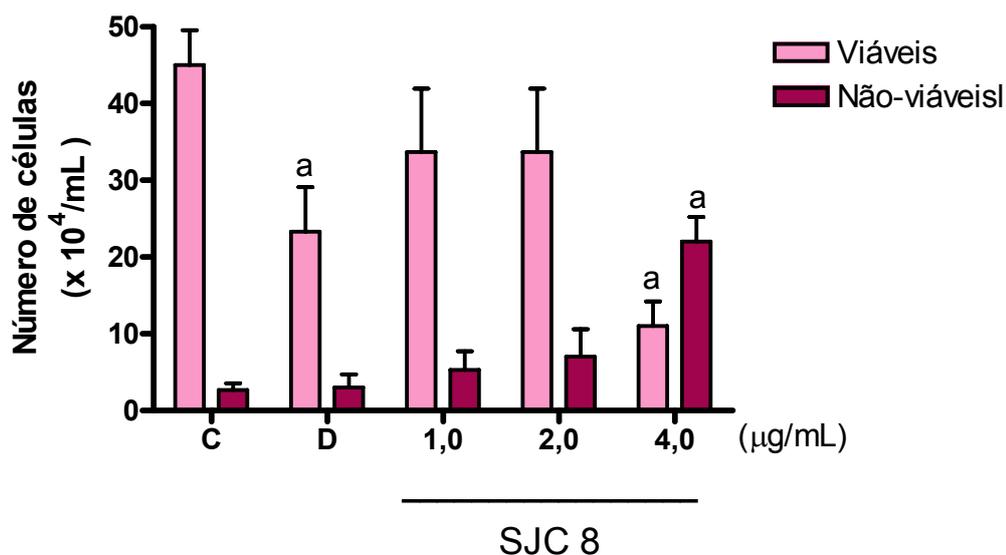


Figura 5 – Efeito da SJC-8 na viabilidade das células leucêmicas HL-60 determinada por exclusão de azul de tripan depois de 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 0,2%). Doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentes independentes. a, $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman Keuls.

4.2.3. Inibição da síntese de DNA – Incorporação de BrdU

Neste ensaio, foi avaliada a capacidade proliferativa das células tratadas em comparação as não-tratadas pela incorporação de BrdU no DNA. A figura 6 apresenta o efeito da SJC-8 na incorporação de BrdU por células leucêmicas HL-60 depois de 24 horas de exposição.

Na concentração de 1µg/ml, a SJC-8 causou uma incorporação de BrdU de 43%, enquanto na concentração de 2µg/mL a incorporação foi de 38%, não havendo diferença nestas concentrações. Porém, na concentração de 4µg/mL a incorporação foi de 27%, havendo diferença significativa em relação as duas últimas concentrações ($p < 0,05$) (Figura 6). A doxorubicina (0.3µg/mL) foi usada como controle positivo e causou incorporação de BrdU em 24% em HL-60.

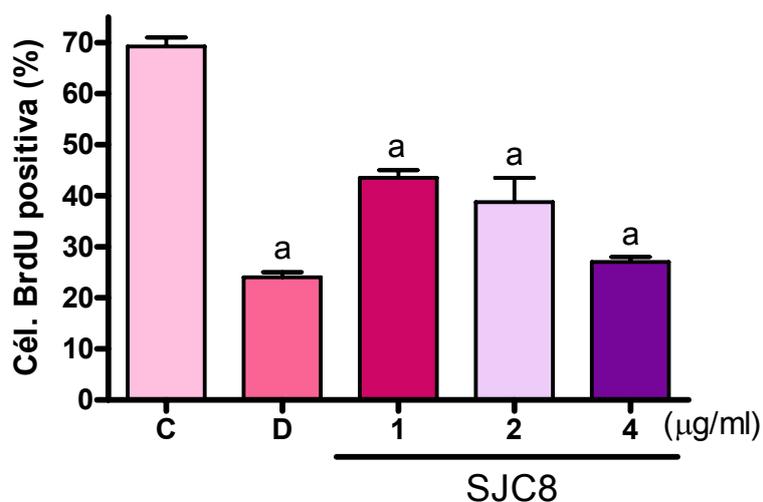


Figura 6 – Efeito da SJC-8 na incorporação da 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) em células leucêmicas HL-60 depois de 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 0,2%). Doxorrubicina (0.3µg/mL) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. a, $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman Keuls.

4.2.4. Análise morfológica – Coloração diferencial por hematoxilina/eosina

A figura 7 apresenta a análise morfológica das células HL-60 tratadas e não-tratadas com SJC-8. A coloração das células não-tratadas permitiu observar que estas se apresentaram normais, com núcleos volumosos, citoplasmas homogêneos e ocasionais figuras mitóticas.

As células tratadas com SJC-8 na concentração de 1µg/mL apresentaram poucas alterações, diferindo do controle negativo apenas em raras vacuolizações do citoplasma e irregularidades na membrana (Figura C). Na concentração de 2µg/mL, a SJC-8 causou condensação da cromatina irregular e fragmentação nuclear, juntamente com irregularidades na membrana (Figura 7D). Na concentração de 4µg/mL houve aparente redução no volume das células e perda da integridade da membrana plasmática, indicando um aumento no número de células mortas (Figura 7E). Condensação da cromatina e fragmentação nuclear também foram observadas na presença da doxorrubicina 0.3µg/ml (Figura 7B).

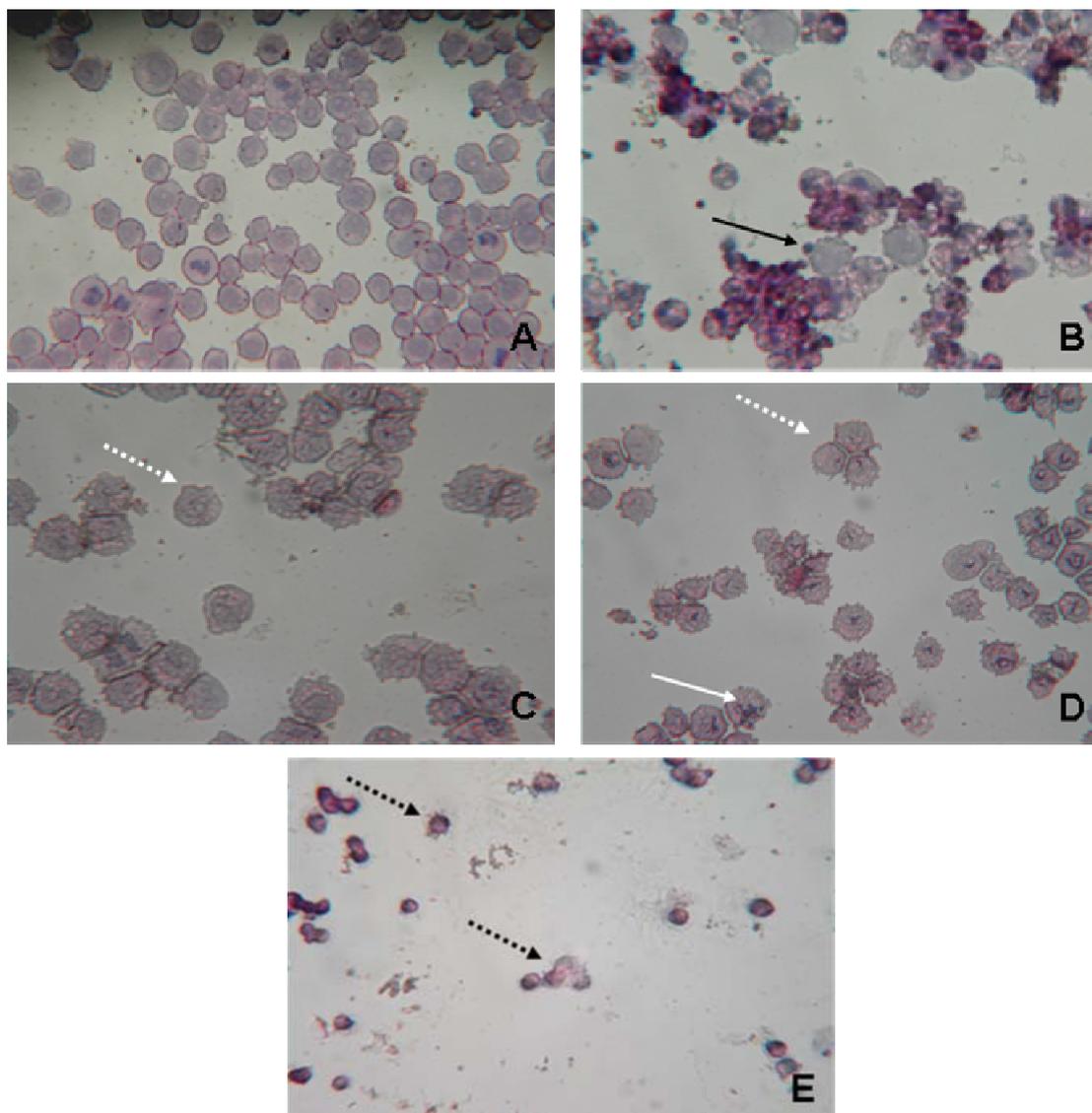


Figura 7 – Fotomicrografia das células HL-60 coradas com hematoxilina/eosina. Células não-tratadas (A), tratadas com SJC-8 (1,0 µg/mL, C), (2,0 µg/mL, D) ou (4,0 µg/mL, E) em células leucêmicas HL-60 analisados por microscopia óptica (x400). Doxorubicina (0.3µg/mL) foi usada como controle positivo (B). As setas brancas indicam fragmentação e condensação da cromatina irregular, as setas pretas indicam núcleo picnóticos, as setas pretas tracejadas restos celulares e as setas brancas tracejadas irregularidade de membrana.

4.2.5. Análise morfológica – Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

Após as 24 horas de exposição das células HL-60 com SJC-8, nas concentrações de 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$ foi observado uma significativa diminuição de células viáveis e aumento do número de células apoptóticas ($p < 0,05$). Entretanto na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$, observamos além dessas mesmas alterações o aumento do número de células necróticas, $p < 0,05$ (Figura 8 e 9). As células tratadas com doxorrubicina apresentaram características de células apoptóticas e raríssimas células necróticas (Figura 9B). O controle negativo experimental apresentou ocasionais células apoptóticas (Figura 9A).

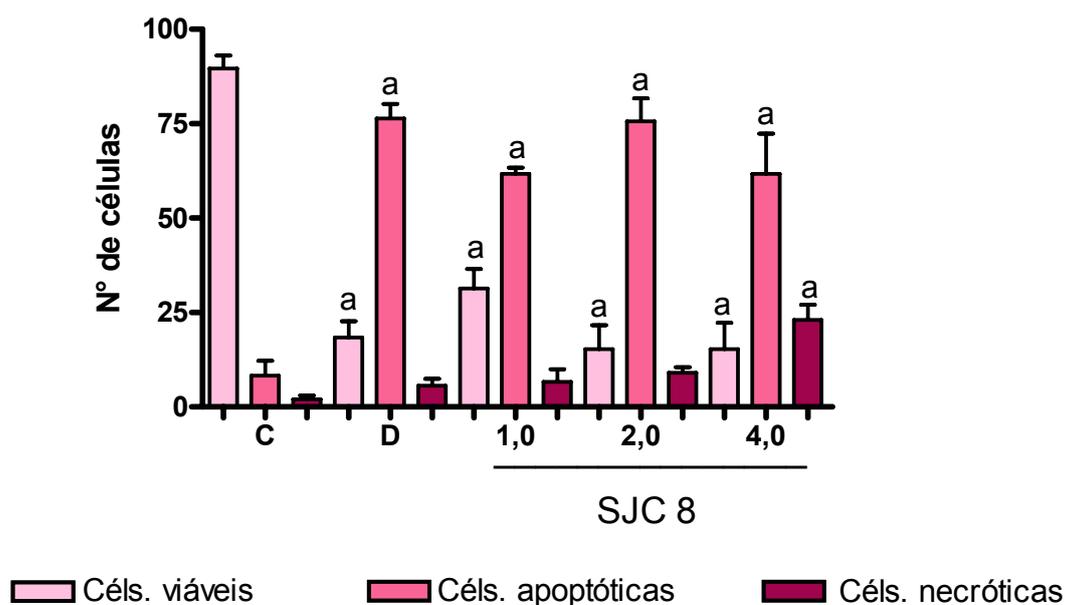


Figura 8 – Efeito da SJC-8 em células leucêmicas HL-60 analisados por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina depois de 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 2%). Doxorrubicina (0.3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. a, $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman Keuls.

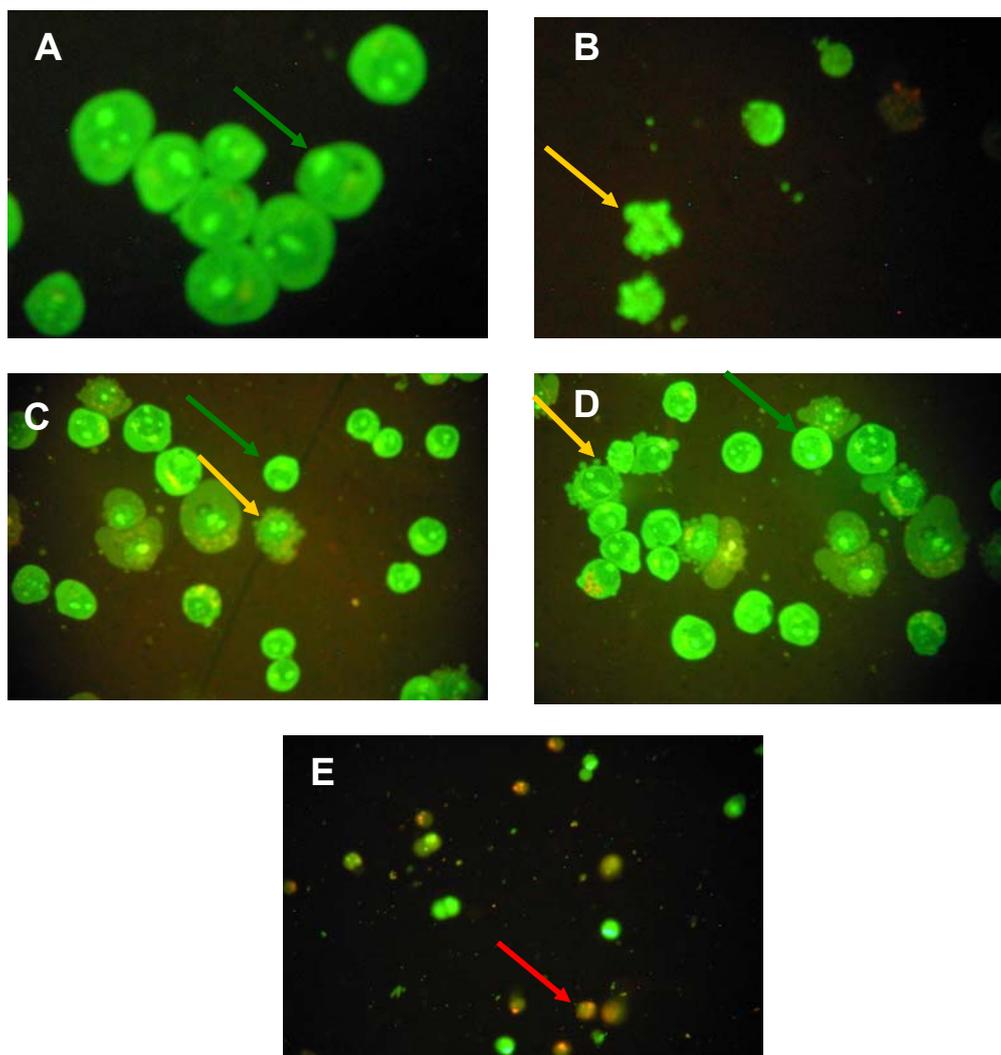


Figura 9 – Fotomicrografia das células HL-60 coradas com Brometo de Etídio/Laranja de Acridina. Células não-tratadas (A), tratadas com SJC-8, 1,0 μ g/mL (C), 2,0 μ g/mL (D) e 3,0 μ g/mL (E) em células HL-60 e analisados por microscopia de fluorescência (x400). Doxorubicina (0,3 μ g/mL) foi usada como controle positivo (B). As setas verdes indicam células viáveis, as amarelas indicam células apoptóticas e as vermelhas indicam células necróticas.

4.3 Teste de Genotoxicidade

4.3.1 Teste do cometa

O dano ao DNA nas células HL-60 induzido pela SJC-8 foi intenso nas diferentes concentrações testadas, apresentando índice de dano superior a 77.00 ± 6.55 em todas as amostras a partir da concentração de $0.5\mu\text{g/mL}$ ($1.1\mu\text{M}$). Na concentração de $8.8\mu\text{g/mL}$ ($19.2\mu\text{M}$), o índice de dano foi de 235.66 ± 3.21 , o qual não diferenciou da amostra tratada com a doxorubicina na concentração de $0,3\mu\text{g/mL}$, cujo o índice foi de 240.66 ± 4.72 (Tabela 8)

A frequência de dano a partir de $0,5\mu\text{g/mL}$ ($1.1\mu\text{M}$), foi superior a 60% em todas as concentrações, atingido o valores próximos de 100% de dano na maior concentração de $8.8\mu\text{g/mL}$ ($19.2\mu\text{M}$) (Tabela 8).

Todas as concentrações testadas induziram dano ao DNA de maneira concentração – dependente e os valores de índice e frequência de dano foram estatisticamente diferentes quando comparadas ao controle negativo.

Os tipos dos danos foram comparados ao controle negativo, onde a SCJ-8 na concentração de $0.5\mu\text{g/mL}$ ($1.1\mu\text{M}$), causou danos do tipo 0, 1 e 2, enquanto na concentração de $1.1\mu\text{g/mL}$ ($2.4\mu\text{M}$) iniciou a presença do dano tipo 3, o qual permaneceu nas concentrações de 2.2; 4.4 e $8.8\mu\text{g/mL}$ (4.8, 9.6 e $19.2\mu\text{M}$). Já, o dano tipo 4 apareceu nas concentrações 4.4 e $8.8\mu\text{g/mL}$ (9.6 e $19.2\mu\text{M}$) (Figura 10).

Substância	Concentração (µg/mL)	ID ± DP	FD ± DP
DMSO		13.33 ± 4.93	12.33 ± 3.21
Doxorrubicina	0.3	240.66 ± 4.72	89.00 ± 3.60
	0.5	77.00 ± 6.55*	60.66 ± 2.51*
	1.1	114.66 ± 15.53*	83.00 ± 2.00*
SJC-8	2.2	145.00 ± 13.07*	86.33 ± 3.78*
	4.4	196.33 ± 5.68*	95.66 ± 2.08*
	8.8	235.66 ± 3.21*	99.33 ± 0.57*

Tabela 8: Índices de danos (ID) e freqüências de danos (FD) ao DNA de células tumorais da linhagem HL-60 (leucemia humana) obtidos através do teste do cometa após 24 horas de tratamento com SJC-8 nas concentrações 0.5, 1.1, 2.2, 4.4 e 8.8 µg/mL. A doxorrubicina (0.3µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Valores ± desvio padrão (DP). *p<0,001.

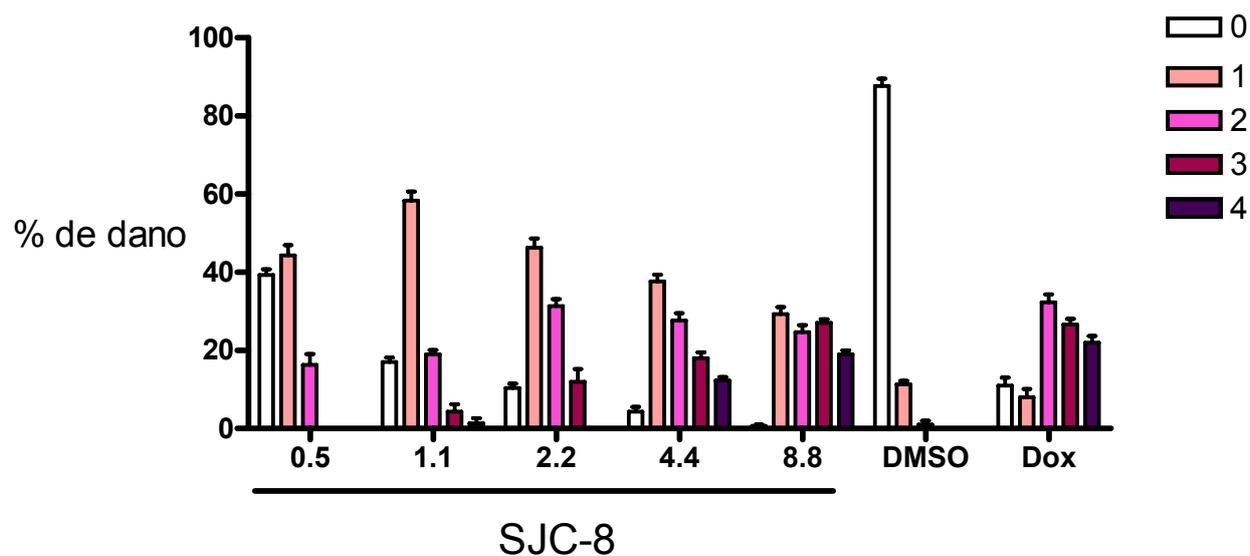


Figura 10: Porcentagem dos tipos de danos causados em células da linhagem tumoral HL-60 (leucemia humana), obtidos através do teste do cometa após 24 horas de tratamento com a SJC-8 nas concentrações 0.5, 1.1, 2.2, 4.4 e 8.8 µg/mL. A doxorubicina (0.3 µg/mL) foi utilizada como controle positivo.

4.4. Teste de relaxamento do DNA

A síntese de DNA pode ser alterada por diversos processos como, por exemplo, alteração na topologia do DNA. A SJC-8 foi capaz de inibir a enzima a enzima Topoisomerase 1 apenas na concentração de 20 μ g/mL (44 μ M) (Figura 11).

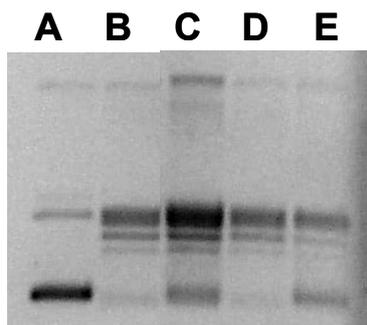


Figura 11. Efeito da SJC-8 nas concentrações de 20 e 10 μ g/mL (C e D) sobre o relaxamento do DNA pela inibição da atividade da enzima Topoisomerase 1. Branco (A) DNA-SC e DMSO. O controle negativo (B) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO), DNA-SC e enzima. Campotecina 0.1mM (E) foi usada como controle positivo. Amostras submetidas a eletroforese (80v) em gel de agarose 1%.

4.5. Estudo da atividade antitumoral *in vivo*

4.5.1. Avaliação do efeito da SJC- 8 em camundongos transplantados com Sarcoma 180

A atividade antitumoral *in vivo* da SJC-8 foi determinada utilizando o modelo experimental do Sarcoma 180. Foi observado que a SJC-8 reduziu de forma significativa o crescimento tumoral apenas na dose de 50 mg/kg. 24 horas após a última dose os animais foram sacrificados e os tumores foram dessecados e pesados. A figura 12 apresenta valores da massa úmida dos tumores dos animais tratados e não-tratados. A massa úmida dos tumores dos animais controle (DMSO 2%) foi de $1.68 \pm 0.14\text{g}$, enquanto que os animais tratados com SJC-8 foram de $1.45 \pm 0.10\text{g}$ e $0.66 \pm 0.26\text{g}$ para as doses de 25 e 50mg/kg/dia respectivamente ($p < 0,05$). Já os animais tratados com 5-Fluorouracil (25mg/kg/dia) apresentaram valores de $0.42 \pm 0.06\text{g}$ ($p < 0,05$). Os percentuais para inibição do crescimento tumoral foram de 12.30% e 59.80% nas doses de 25 e 50mg/Kg/dia ($p < 0,05$ para a última dose). Nos animais tratados com 5-fluorouracil (25mg/Kg/dia), a inibição tumoral foi de 74.07% ($p < 0,05$) (Tabela 9).

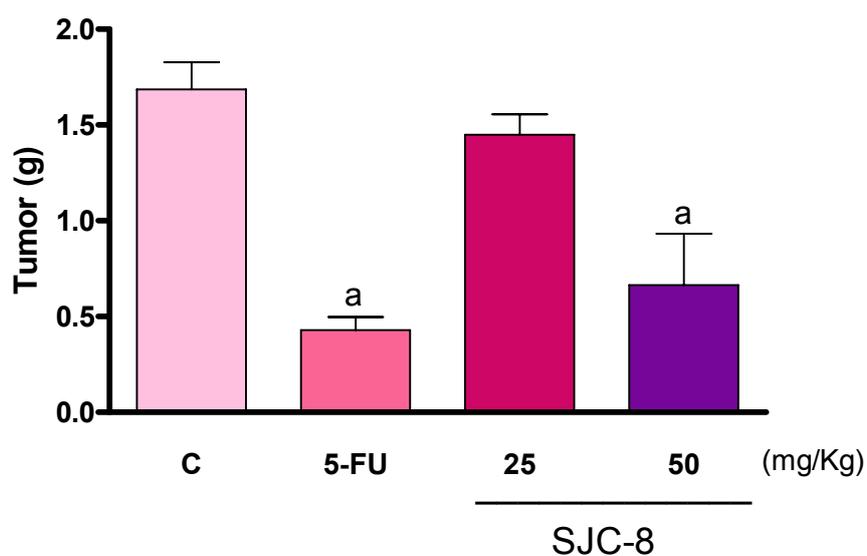


Figura 12 – Efeito da SJC-8 (25 e 50mg/Kg/dia) sobre a massa tumoral de animais transplantados com Sarcoma 180. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 2%). 5-Fluorouracil (5-FU) (25mg/Kg/dia) foi usado como controle positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de dez animais. a, $p < 0,05$ comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

4.5.2. Análise morfológica e histopatológica

Após o tratamento com a SJC-8, os pesos dos rins, fígados e baços não mostraram diferenças significantes em nenhuma das doses utilizadas (25 ou 50mg/Kg/dia) quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). Já o tratamento com 5-fluorouracil (25mg/Kg/dia) apresentou uma redução significativa nos pesos dos baços ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, não havendo alteração dos pesos nos rins e fígado (Tabela 9).

As análises histopatológicas dos animais do grupo controle apresentaram o rim com estrutura glomerular preservada e hemorragia glomerular tubular. As análises histopatológicas dos rins dos animais tratados com SJC-8 mostraram estrutura glomerular preservada com hemorragia glomerular do epitélio tubular proximal, uma discreta tumefação turva e presença de raríssimos cilindrohialino. (Figura 13A e B).

As análises histopatológicas dos fígados dos animais do grupo controle, mostrou discreta tumefação turva dos hepatócitos e hiperplasia das células de Kupffer, com presença de dilatação e congestão da veia centrolobular, congestão portal e discreta hemorragia sinusoidal, enquanto que nos animais tratados foi observada uma tumefação turva dos hepatócitos mais intensa nas duas doses. (Figura 14A).

Diferente do que foi observado nos rins, a análise histopatológica da toxicidade dos fígados dos animais tratados com SJC-8 apresentou-se de maneira mais intensa. Não foi encontrada diferença nas análises dos baços dos animais tratados com a SJC-8 em relação ao grupo controle. (Figura 15A e C). Somente nos animais tratados com 5-FU (25mg/Kg/dia) foi observada diminuição significativa do peso úmido dos baços ($p < 0,05$) e algumas alterações histopatológicas. (Tabela 5).

As análises histopatológicas realizadas nos rins após tratamento com 5-FU (25mg/Kg/dia) apresentaram discretas áreas de tumefação turva do epitélio tubular, hemorragia glomerular e tubular e foco inflamatório justa-glomerular com preservação da estrutura glomerular. (Figura 13B) Enquanto no fígado

foram observadas: congestão da veia portal e dilatação da veia centrolobular, tumefação turva dos hepatócitos (indicando intenso trabalho do fígado para a metabolização da droga), moderada hiperplasia das células de Kupffer, discreta hiperplasia sinusoidal e moderada esteatose em microgotas. Estas alterações indicam discreta hepatotoxicidade, porém de natureza reversível. (Figura 14B)

As análises histopatológicas realizadas nos baços no grupo controle revelaram estrutura normal com visualização de folículos linfóides e megacariócitos dispersos pela medular e cortical não diferindo assim dos baços do grupo tratado com SJC-8. (Figura 15A e C) Após tratamento com 5-FU (25mg/Kg/dia) e visualização de folículos linfóides bem circunscritos e raros megacariócitos dispersos pela medular e cortical. (Figura 15B)

As análises histopatológicas dos tumores retirados de camundongos do grupo controle negativo mostraram neoplasia constituída por células redondas e poligonais, com núcleos hipercromáticos, exibindo por vezes binucleação, anisocariose e graus variados de pleomorfismo celular e nuclear. (Figura 16A) Foi visulalizado elevado nível mitótico, invasão muscular e áreas de necrose de coagulação. Nos tumores dos animais tratados com 5-FU e SJC-8, as áreas de necrose de coagulação eram mais extensas do que as observadas no grupo controle, com baixo índice mitótico e presença de mitoses atípicas, demonstrando morte celular (Figura 16B e C).

Droga	Dose (mg/kg/dia)	Fígado (g/100g de massa corpórea)	Baço (g/100g de massa corpórea)	Rins (g/100g de massa corpórea)
Controle	-	4.6 ± 0.23	0.74 ± 0.10	1.16 ± 0.04
SJC-8	25	4.88 ± 0.12	0.62 ± 0,06	1.26 ± 0.07
	50	5.09 ± 0.34	0.52 ± 0.04	1.47 ± 0.10
5-FU	25	4.47 ± 0.17	0.36 ± 0.10 ^a	1.19 ± 0.07

Tabela 9 – Efeito da SJC-8 (25 ou 50mg/Kg/dia) e 5-Fluorouracil (25mg/Kg/dia) sobre os pesos dos órgãos (fígado, rins e baço) dos animais, transplantados com Sarcoma 180. Os valores correspondem à média ± E.P.M. de dez animais. ^a, p < 0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

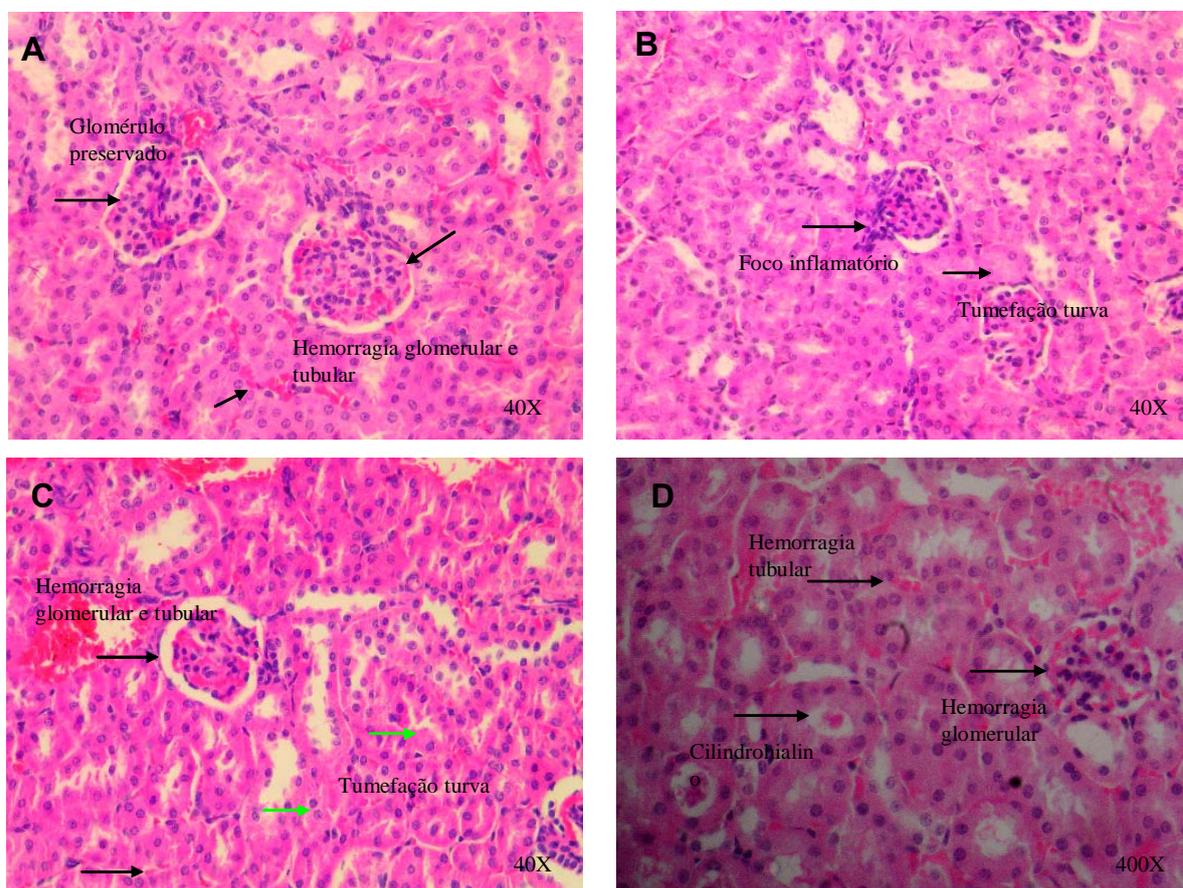


Figura 13 – Histopatologia dos rins de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 2%). 5-fluorouracil (5-FU) 25mg/Kg/dia (B) foi usado como controle positivo. Os animais foram tratados com SJC-8, 25 (C) e 50 mg/Kg/dia (D).

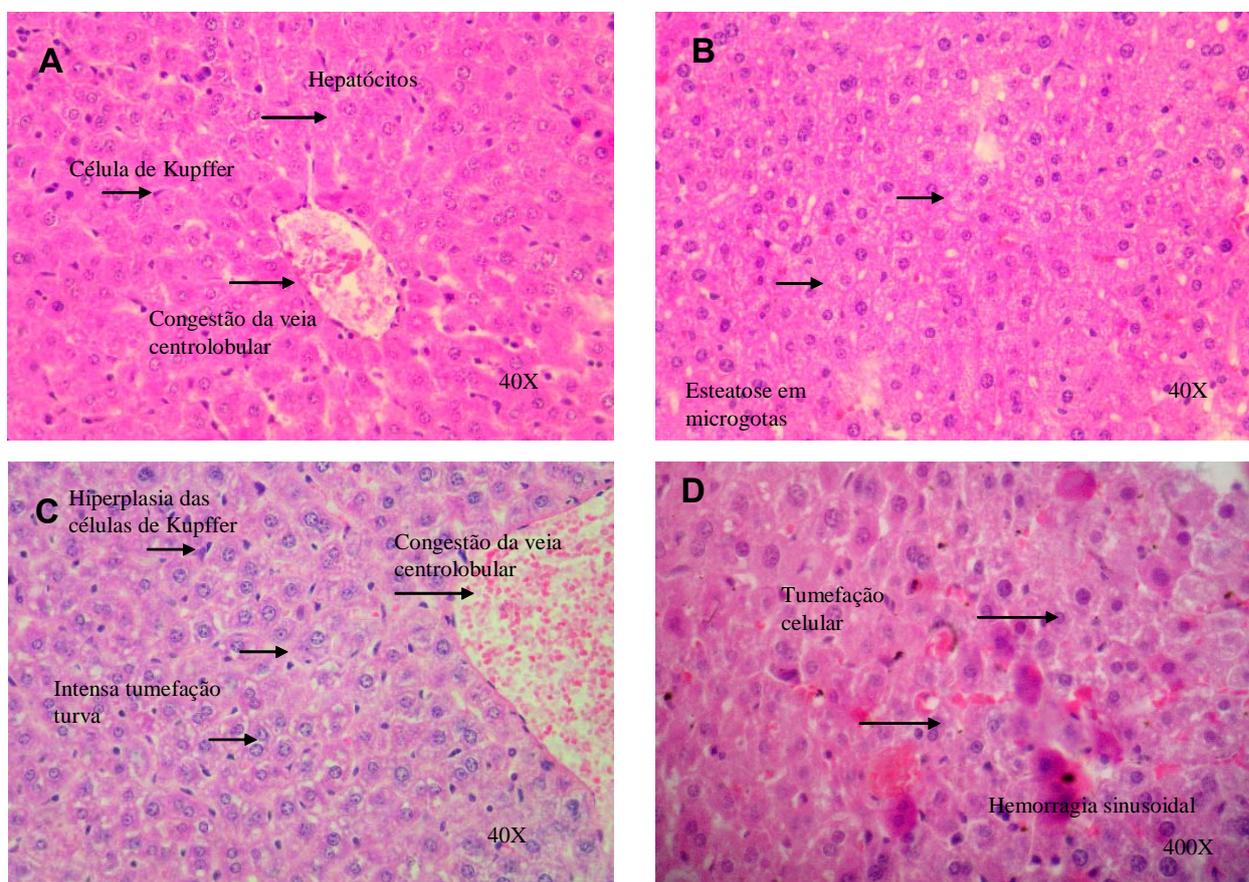


Figura 14 – Histopatologia do fígado de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 2%). 5-fluorouracil (5-FU) 25mg/Kg/dia (B) foi usado como controle positivo. Os animais foram tratados com SJC-8, 25 (C) e 50 mg/Kg/dia (D).

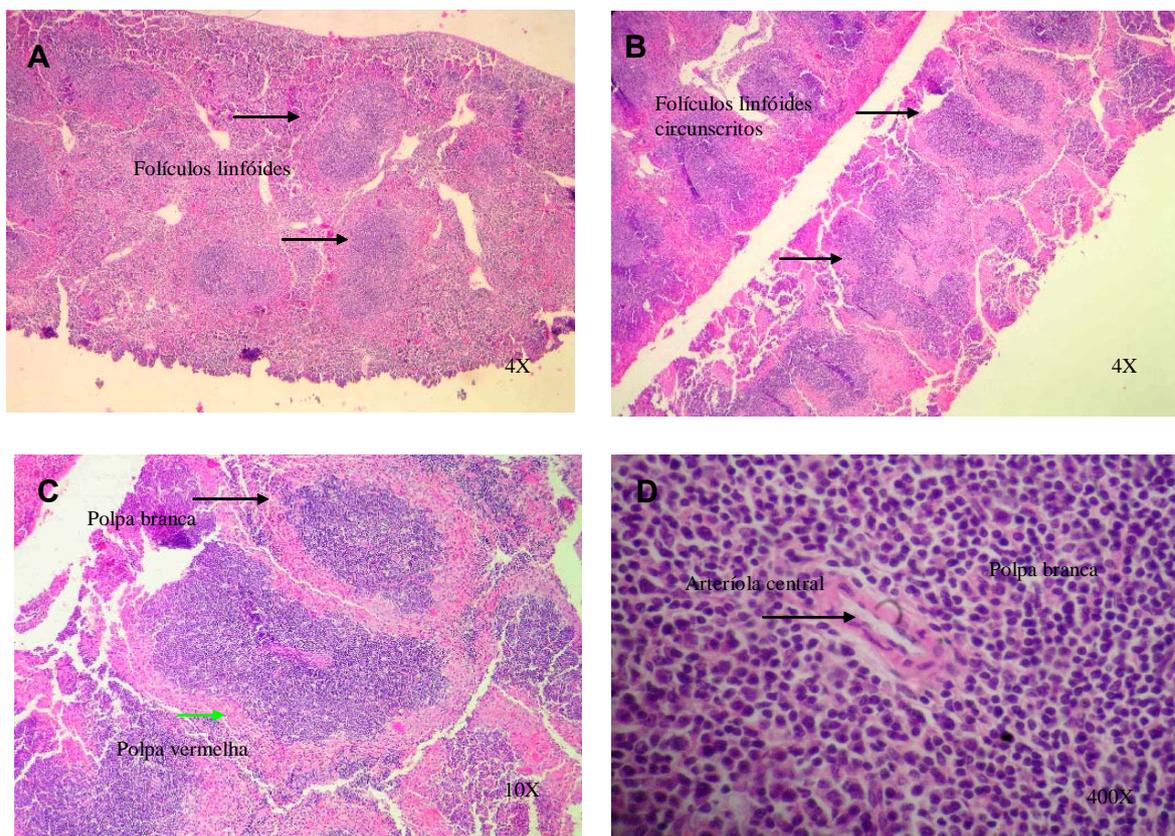


Figura 15 – Histopatologia do baço de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 2%). 5-fluorouracil (5-FU) 25mg/Kg/dia (B) foi usado como controle positivo. Os animais foram tratados com SJC-8, 25 (C) e 50mg/Kg/dia (D).

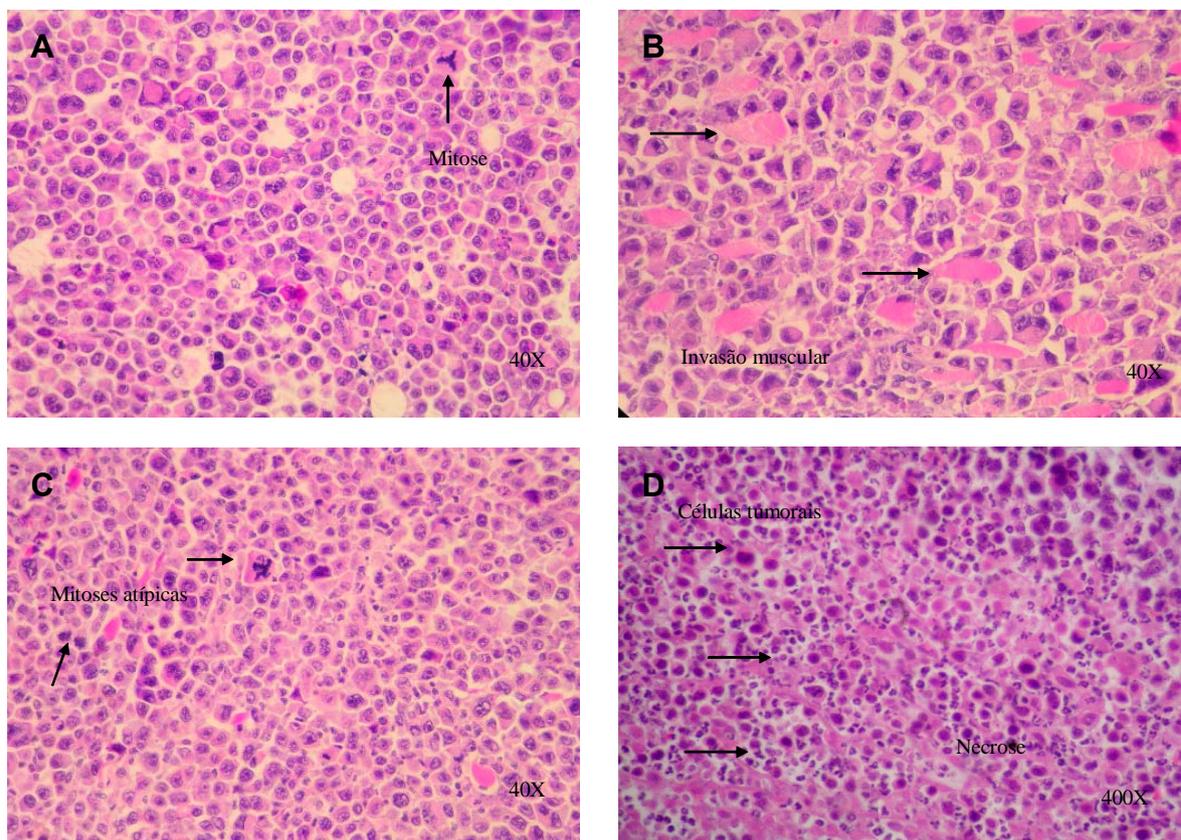


Figura 16 – Histopatologia do tumor de camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 2%). 5-fluorouracil (5-FU) 25mg/Kg/dia (B) foi usado como controle positivo. Os animais foram tratados com SJC-8, 25 (C) e 50mg/Kg/dia (D).

Discussão

5. DISCUSSÃO

A grande maioria das drogas convencionais, usadas no tratamento do câncer são largamente derivadas de plantas superiores e embora o número de plantas terrestres seja em torno de quatro milhões de espécies, menos de 10% delas tem sido extraídas e avaliadas quanto a sua atividade antitumoral básica (PESSOA, 2000a).

Neste sentido, este trabalho objetivou estudar uma planta da família Anacardiaceae, a qual é constituída por cerca de 76 gêneros. Seus gêneros são subdivididos em cinco tribos (Anacardieae, Dobineae, Rhoeeae, Semecarpeae e Spondiadeae). Do ponto de vista químico, os gêneros mais estudados nesta família são *Tapirira*, *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lannea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Melanorrhoea*, *Mangifera*, *Rhus* e *Anacardium*. Essas se destacam pelo número de investigações relativas à composição química de suas espécies e atividades biológicas de seus extratos e metabólitos (CORREIA, 2006).

Sendo que do ponto de vista químico, as mais estudadas são *Mangifera indica*, *Anacardium occidentale*, nesta última foram realizados estudos para avaliar a atividade citotóxica contra células de carcinoma de mama humano (BT20) $IC_{50} < 20\mu\text{g/mL}$ (KUBO *et al.*, 1993), além de algumas espécies de *Rhus*, isso se deve provavelmente devido à importância econômica e a toxicidade demonstrada por essas espécies. Extrato da castanha de caju *Semecarpus Anacardium* L. (Anacardiaceae), apresentou efeito citotóxico, com valores de IC_{50} variando de 1,4 a 1,6 $\mu\text{g/ml}$ (HARTLEY, 1998). No entanto estes estudos representam menos de 10% das espécies descritas para estes gêneros. Onde, menos de 7% das espécies conhecidas dessa família tiveram estudos fitoquímicos e de atividade biológica realizados (CORREIA, 2006).

Assim, a partir do estudo fitoquímico da *Tapirira guianensis* foram isolados sete derivados de lipídios fenólicos inéditos, os quais são considerados não usuais na família Anacardiaceae, porém são identificados

nas espécies dos gêneros *Tapirira* e *Lannea*. Isso ocorre, devido ao isolamento dos derivados alquilados da ciclohexanona (Figura 17) os quais são precursores dos lipídios fenólicos (CORREIA, 2001). Portanto, nos poucos estudos fitoquímicos pode-se constatar a presença de duas classes químicas predominantes nessa família: os flavonóides, especialmente biflavonóides e os lipídios fenólicos, encontrados em espécies que normalmente apresentam propriedades tóxicas ou alergênicas.

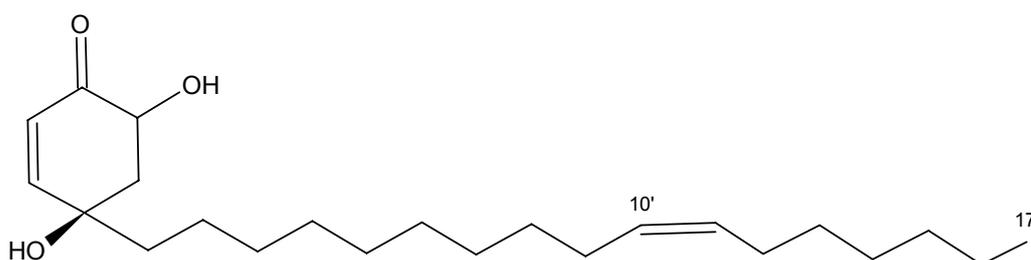


Figura 17: Estrutura química do derivado alquilado da ciclohexanona isolado da *Tapirira guianensis*.

Dessa maneira, a atividade antiproliferativa dos sete hidrobenzofuranóides foi avaliada em modelo celular de linhagem tumoral humana. Onde, dos sete compostos, dois não apresentaram atividade citotóxica em nenhuma linhagem testada, os SJC-9 e SCJ-7 e essa ausência de atividade provavelmente se deve ao fato de que as respectivas estruturas químicas não apresentam o anel benzofurano, o qual está presente nos demais fitocompostos, SJC-1, SJC-3, SJC-4, SJC-5 e SJC-8. Provavelmente a presença desse anel induza uma moderada toxicidade nas demais amostras. Os compostos SJC-1 e SJC-4 apresentaram atividade moderada em apenas uma linhagem testada, HCT-8 e MDA/MB-435, respectivamente, essa atividade se deve provavelmente a configuração cis das hidroxilas nos carbonos C5 e C6, valendo ressaltar que a configuração trans das hidroxilas provavelmente seja responsável pela diminuição da atividade citotóxica, como podemos observar nos compostos SJC-3 e SJC-5. A SJC-8 apresentou uma elevada

citotoxicidade, quando comparada dentre os sete fitocompostos estudados, uma vez que sua CI_{50} variou entre 1.7- 5.2 μ g/mL.

O potencial citotóxico da SJC-8 possivelmente se deve pelo fato da presença de uma dupla ligação, entre os carbonos 6 e 7, conjugada a uma carbonila formando o sítio farmacofórico da molécula (complexo cetona α β insaturado) e uma região eletrofílica no Carbono 7, que favorece adições de Michael aumentando a afinidade da molécula, SJC-8, aos grupos amino do DNA celular e levando a um efeito citotóxico mais elevado.

O potencial citotóxico da SJC-8 foi evidenciado em um painel adicional de células, obtidos de tumores sólidos e de leucemia mielocítica crônica (K-562). Onde, apenas na linhagem K-562 ela apresentou moderada atividade citotóxica cuja CI_{50} foi de 6.2 μ g/mL, enquanto nas demais linhagens a CI_{50} variou entre 0.3- 2.7 μ g/mL. Essa resistência apresentada na linhagem K-562, possivelmente se deve ao fato de que ela é resistente à apoptose induzida por vários agentes anti-câncer incluindo etoposídeo e cisplatina. Esta apresenta o cromossomo Ph, que confere resistência a vários agentes antileucêmicos. (SLUPIANEK *et al.*, 2000; DI BACCO *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2002).

Como observado no screening, a SJC-8 apresentou os resultados mais promissores como agente citotóxico, enquanto que os outros compostos foram apenas fracamente ativos ou até mesmo inativos frente as linhagens testadas. Assim, a SJC-8 foi estudada quanto ao seu mecanismo de ação em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Um dos primeiros ensaios foi avaliação do seu potencial em induzir lise em hemácias de camundongos. Neste ensaio, a mesma não apresentou efeito hemolítico nas concentrações testadas. Sugerindo, que o mecanismo de citotoxicidade desta amostra não está relacionado a danos nas membranas celulares, mais provavelmente esteja atuando por caminhos mais específicos, talvez por seletividade a linhagens de células tumorais. Essa análise é peculiar, pois determinadas drogas podem alterar significativamente a estrutura delicada da membrana dos eritrócitos (NG *et al.*, 1986; BADER *et al.*, 1996; GRINBERG *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 1997).

Posteriormente, foi realizado o ensaio da letalidade de organismos simples, como o microcrustáceo marinho *Artemia sp.*, o qual permite a avaliação da toxicidade geral e é considerado um bioensaio preliminar no estudo de extratos e metabólitos secundários com potencial atividade biológica (MEYER *et al.*, 1982). Este ensaio, apesar de não selecionar compostos com atividade antitumoral, tem mostrado uma boa correlação com a existência de substâncias que possuem esse tipo de toxicidade e tem sido amplamente utilizado para *screening* com essa finalidade (MUNRO *et al.*, 1987). Entretanto, no estudo com SJC-8 essa correlação não pode ser verificada, uma vez que a SJC-8 não apresentou toxicidade nas larvas da *Artemia*, o que não inviabiliza o seu potencial citotóxico e antitumoral.

Em seguida, foi realizada a construção da curva de crescimento celular a qual fornece informações importantes sobre a cinética da cultura de células em questão. A observação, em curtos intervalos, dessas culturas tratadas permite avaliar a ação citotóxica temporal da substância, assim como o acompanhamento das alterações morfológicas das células a medida que vão acontecendo. Assim, foi avaliado o efeito da SJC-8 durante vários intervalos de tempo em células leucêmicas (HL-60) nas diferentes concentrações, baseadas no valor da IC_{50} de 24 horas. Foi observado que a SJC-8 apenas foi capaz de afetar a viabilidade celular depois de um período de exposição de 24 horas, sugerindo que a atividade citotóxica da SJC-8 pode ser devida a alguma interferência com uma fase específica do ciclo celular, necessitando um maior tempo de exposição da substância com as células, independente da concentração.

A SJC-8 apresentou um efeito citostático e citotóxico dependente da concentração. Nas duas maiores concentrações, a SJC-8 causou uma redução do número de células viáveis associada com um aumento do número de células não-viáveis, o que seria um efeito citotóxico. Entretanto, nas menores concentrações não houve um aumento do número de células não-viáveis, mas apenas uma redução da proliferação celular, o que corresponde a uma ação citostática. Isto sugere a participação da SJC-8 em mais de uma via patológica, na qual dependendo da intensidade do dano e do tempo de exposição esta pode apresentar-se como uma droga citotóxica ou citostática. Isto confirma que

a indução da morte celular e o efeito citostático causada pela SJC-8 são devido a alterações em alguma fase específica do ciclo celular (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 1997; FENECH, 2000), o que corrobora com sua ação mais seletiva em tumores sólidos.

Modelos celulares são ferramentas úteis e necessárias para estudar o potencial citotóxico de um composto, traduzido, inicialmente, pela sua capacidade de induzir a morte celular, e a linhagem HL-60 (leucemia promielocítica) é um dos modelos celulares de origem mielóide mais amplamente utilizados (GRZANKA *et al.*, 2003; DELGADO *et al.*, 2005), sendo a mesma escolhida para o estudo do possível mecanismo de ação citotóxico da SJC-8.

Os modelos propostos para estudar a citotoxicidade da SJC-8 em células HL-60 após 24h foram: análise da viabilidade celular por exclusão de azul de tripan, inibição da síntese de DNA por incorporação do BrdU, análise morfológica por coloração diferencial por hematoxilina/eosina, brometo de etídio/acridina laranja e análise da inibição da enzima Topoisomerase 1. Além disso, foi realizado o teste do cometa para avaliar o comportamento genotóxico da SJC-8 nesta linhagem.

A exclusão por azul de tripan é um ensaio de viabilidade celular em que a absorção deste corante é um forte indicativo de dano na membrana plasmática que culmina na morte celular e fornece uma resposta sobre a viabilidade através da comparação do padrão de crescimento das células tratadas e não-tratadas pela contagem diferencial de células viáveis e não-viáveis (HYNES *et al.*, 2003). Neste ensaio, a SJC-8 nas menores concentrações, 1µg/mL (2.2µM) e 2µg/ml (4.4µM), não diminuíram o número de células viáveis, nem aumentou o número de células não-viáveis. Apenas na maior concentração, 4µg/ml (8,8µM) foi observada de forma significativa a diminuição de células viáveis concomitante com o aumento de não-viáveis, esses dados confirmam com os encontrados na curva de crescimento celular, indicando que possivelmente seu efeito consista no possível bloqueio da divisão celular.

Para avaliar se a inibição de proliferação celular observada tanto na curva de crescimento quanto no teste de exclusão por azul de tripan era devido ao bloqueio da divisão celular, foi realizada a análise da síntese de proteína e/ou DNA, onde a SJC-8 foi testada quanto a sua capacidade de inibir a síntese de DNA através da detecção da incorporação de BrdU (DOLBEARE *et al.*, 1983). Nesse ensaio, a SJC-8 diminuiu a síntese de DNA em todas as concentrações testadas, sendo o efeito mais pronunciado na maior concentração, 4µg/ml (8,8µM), resultando em menor número de divisões celulares, o que complementa os resultados do ensaio do MTT, a curva de crescimento celular e a exclusão por azul de tripan. Provavelmente, a SJC-8 estaria interferindo na fase S, de síntese, do ciclo celular impedindo a fabricação de novo material genético, mecanismo de ação este observado em vários agentes antineoplásicos que são considerados ciclo celular específicos (CCS). Um exemplo é o do agente antimetabólico 5-fluorouracil que exerce seus efeitos bloqueando bioquimicamente a síntese do DNA e, portanto, sendo restritos à fase S do ciclo celular. (ALMEIDA *et al*, 2005)

Nas análises das alterações dos processos celulares são observados os fatores de sinalização molecular. Este fenômeno é verificado de maneira bem similar em muitos compostos testados como drogas com potencial anti-câncer (CZYZ, *et al.*, 2005). Dependendo da concentração usada, vários processos celulares diferentes podem ser influenciados. Assim, tentando encontrar o mecanismo responsável pelo efeito citotóxico do composto testado nós acessamos as mudanças na morfologia celular, no processo de indução de apoptose e/ou necrose celular, usando as concentrações correspondentes a $IC_{50}/2$, IC_{50} e $IC_{50} \times 2$, no período de 24 horas.

As colorações por H/E e brometo de etídio e acridina laranja (BE/AL) permitem analisar as características morfológicas das células, estas são úteis para sugerir o tipo de morte celular, seja por necrose ou apoptose. A morte celular é um fenômeno essencial para manter a homeostase e sua ocorrência tem sido documentada durante o desenvolvimento embrionário e pós-embrionário. Esta não é apenas importante para o desenvolvimento normal, mas também para a vida adulta de muitos organismos vivos (GERCHENSON & ROTELLO, 1992). Apoptose e necrose são dois distintos modos de morte

celular que diferem na forma em que os compostos citotóxicos podem afetar tanto a morfologia quanto o mecanismo da proliferação celular normal (SAVILL, 1994).

Diferente da apoptose, a necrose normalmente ocorre em consequência de uma lesão celular. Entretanto, pesquisas recentes têm revelado que o início do processo necrótico possa depender da concentração do composto usado e da duração do tratamento, considerando que a indução de necrose é uma resposta tardia relativa ao acontecimento da apoptose. Assim, eventos intracelulares que levam a apoptose e necrose podem ocorrer sequencialmente, onde numa primeira fase uma dose relativamente baixa do composto testado causa um colapso no potencial de membrana mitocondrial e inibidores da caspase podem prevenir a morte celular; e durante uma segunda fase, usando uma dose maior, ocorre rompimento da membrana plasmática, levando ao processo necrótico (ROY, 2006).

Na análise morfológica, por coloração com H/E, das células tratadas com SJC-8, por 24 horas, na menor concentração, 1µg/mL (2.2µM), as alterações morfológicas incluíram poucas vacuolizações do citoplasma mantendo os núcleos volumosos e ocasionais figuras mitóticas. Entretanto, na concentração de 2,0µg/mL (4.4µM) a presença da condensação da cromatina e fragmentação do DNA irregular foram observadas, revelando uma aparência de sinais morfológicos de apoptose (HU *et al.*, 2003). Estes sinais podem ser decorrentes da presença do complexo cetona $\alpha\beta$ instaurada presente na molécula da SJC-8, grupamento este encontrado em outros análogos da ciclohexanona, onde em trabalhos de relação estrutura atividade, se comprovou que a atividade citotóxica e indução de apoptose está relacionada com a presença deste grupamento químico (DIMMOCK *et al.*, 2000). Na concentração de 4µg/mL (8.8µM), houve diminuição do volume celular e perda da integridade da membrana, sendo estas, características que indicam ocorrência do processo necrótico (DEZOIZE, 1992). Estes dados reforçam os resultados revelados pela coloração de brometo de etídio e acridina laranja (BE/AL), onde nas menores concentrações foram vistas características de apoptose e na maior concentração figuras necróticas constantes acompanhadas de desestabilização da membrana plasmática, sendo esta

última uma marca predominante do processo necrótico. De forma resumida, a ocorrência de fragmentação do DNA e alterações nucleares em concomitância com a manutenção da integridade de membrana são características de apoptose, enquanto que a desestabilização da membrana é característica marcante de necrose (KUMMAR *et al.*, 2004; DARTSCH, 2002; COHEN, 1993).

A indução do processo de apoptose, promove a morte celular de forma altamente regulada que elimina células ou tecidos indesejados protegendo o organismo contra a formação de neoplasia ou levando a uma redução do volume tumoral (MAJNO & JORIS, 1995). Desse modo, a indução de apoptose em células tumorais é vista como um grande benefício na quimioterapia do câncer (LOS, *et al.*, 2003). Mas não podemos esquecer que, por outro lado a necrose ativa a cascata do processo inflamatório e mobiliza o sistema imune auxiliando o ataque ao tumor. Esta ação pode vir a desencadear um efeito mais profundo e longo do que a apoptose.

Desta maneira, a morte celular programada é vista como um importante mecanismo para manutenção da homeostase celular e pode ser morfológicamente diferenciado do processo necrótico (KERR, 1972). Entretanto, o impacto gerado pela morte celular programada na quimioterapia deixa algumas dúvidas, pois esta via pode não ser a única a ativar de forma efetiva a morte celular no tumor. Kiaris e Schally têm sugerido que, por várias razões, quando comparada com a morte celular programada, a indução de necrose pode ser preferível na quimioterapia do câncer. Além disso, há uma evidência de que durante a eliminação da malignidade por agentes anti-câncer em geral, existe morte de células normais podendo ocorrer também por necrose (BLAGOSKLONNY, 2000; GONZALEZ, 2001).

Vários medicamentos com atividade anti-câncer são inibidores da Topoisomerase (GRYNBERG, 2002). A superhelicoidização do DNA é um processo precisamente regulado que influencia a replicação, transcrição e empacotamento de DNA. As Topoisomerasas são enzimas que modulam o estado topológico do DNA. Como já mencionado, existem duas classes de topoisomerasas: Tipo 1 que age apenas em uma das fitas duplas de DNA e o Tipo 2 que age em ambas fitas e é dependente de ATP (WANG, 1996). O

interesse nessas enzimas tem crescido nos últimos anos, pois elas são alvos de muitas drogas efetivas no tratamento do câncer, especialmente as oriundas de produtos naturais. Interessantemente, flavonóides de ocorrência em plantas verdes possuem atividade inibitória em uma variedade de enzimas, incluindo topoisomerases (MIDDLETON & KANDASWAMI, 1993).

O efeito inibitório da SJC-8 na Topoisomerase 1 foi testado pelo relaxamento do plasmídeo de DNA superhelicoidizado. A SJC-8 foi capaz de inibir a ação da Topoisomerase 1, na concentração de 20µg/mL, dado que reforça os resultados obtidos no teste de inibição de BrdU (síntese de DNA). Uma vez que, a síntese de DNA pode ser alterada por diversos processos como topologia e organização intracelular de DNA, as Topoisomerases (I e II) desenvolvem uma função celular crítica, alterando a topologia do DNA, sendo uma das suas maiores funções impedir o superespiralamento excessivo do DNA intracelular, embora esta enzima possa estar envolvida também em processos proliferativos como replicação e transcrição de DNA, condensação e segregação de cromossomos, podendo a mesma ser alvo para a ação de uma larga variedade de drogas com ação anti-câncer (WANG, 1996).

Neste contexto, um agente com potencial genotóxico pode interagir com a molécula de DNA e provocar danos em regiões de genes com fundamental importância no controle do ciclo de divisão celular (CANALLE *et al.*, 2001). Fato esse observado com a SJC-8, em que a partir da menor concentração, 0.5µg/mL (1.1µM), causou índice de dano superior a $77,00 \pm 6.55$ e frequência de dano superior a 60% na linhagem tumoral de leucemia promielocítica (HL-60). Em todas as concentrações, foi observada diferença significativa ($p < 0,001$) das frequências (12.33 ± 3.21) e índices de dano (13.33 ± 4.93), quando comparadas com o controle negativo (DMSO 0,5%).

O teste do cometa é usado para detectar dano ao DNA, bem como a fragmentação do DNA no curso do processo apoptótico, a qual pode constituir um dado para a correta interpretação do teste do cometa, como indicador de genotoxicidade. Assim, cometas com perda total ou parcial de cabeça (dano tipo 4), considerados como “células fantasmas”, são geralmente interpretados como imagens microscópicas de células apoptóticas ou necróticas. (BRINK *et*

al, 2006) Nas concentrações de 1.1µg/mL (2.4µM) e 2.2µg/mL (4.8µM) a presença de danos do tipo 1, 2 e 3 foi observada, mas a partir da concentração de 4.4µg/mL (9.6µM) já foi observada presença, também, de dano tipo 4, sugerindo dose dependência na agressividade dos tipos de dano. Assim, comparando esses dados com os resultados das análises morfológicas pelas colorações de hematoxilina/eosina e acridina/laranja, foi observado que na dose de 2.0µg/mL (4.4µM) e na maior dose de 4.0µg/mL (8.8µM) ocorreram eventos apoptóticos e necróticos, respectivamente.

Apesar disso, a correlação desses dados nem sempre indicam que o aumento da fragmentação de DNA é uma marca constante da presença de processo apoptótico, visto que estágios muito iniciais de apoptose podem gerar resultados falso-positivos no teste do cometa. (HARTMANN *et al*, 2003)

Foi identificado que a genotoxicidade da SJC-8, em relação ao índice de dano nas duas maiores concentrações e a frequência de dano, com exceção da menor concentração (0.5µg/mL), apresentou um perfil genotóxico semelhante à doxorrubicina (0.3µg/mL), que é um antineoplásico estabelecido usado no tratamento de leucemias agudas. Isso é de se esperar de todos os compostos que têm potencial atividade anti-câncer, já que as suas ações interferem de algum modo na estabilidade do DNA. A doxorrubicina liga-se ao DNA e inibindo a síntese de DNA e RNA, em decorrência de sua principal ação na interferência na ação da Topoisomerase 1 (TEWEY *et al*, 1984). Esse perfil de ação foi o caracterizado de maneira semelhante com a SJC-8, uma vez que a mesma causou alterações na estrutura do DNA, inibindo a Topoisomerase 1.

A evolução da oncologia experimental tem permitido a identificação de parâmetros que vêm sendo utilizados na descoberta de diversos compostos úteis no tratamento clínico das neoplasias (CARTER, 1980). Acredita-se que a quimioterapia do câncer, em animais e no homem, tem como objetivo reduzir o número de células tumorais viáveis, abaixo do qual, as células que sobrevivam ao tratamento á droga não sejam capazes de restabelecer a doença. Dessa maneira, os critérios estabelecidos das condições experimentais são primordiais. Assim, a seleção de tumores deverá ser baseada em alguns fatores como: diferentes índices cinéticos (*pool* proliferativo), diferentes

susceptibilidades a compostos antitumorais conhecidos, ser universalmente usado e fazer comparações com resultados obtidos por outros investigadores, ser preferencialmente realizado em camundongos para reduzir a quantidade necessária do composto a ser testado, entre outras (PESSOA, 2000b). Fundamentado no uso de tumores experimentais para a identificação de produtos naturais originais de plantas com potencial antitumoral, a atividade antitumoral da SJC-8 foi avaliada em modelo experimental usando camundongos transplantados com Sarcoma 180. O 5-fluorouracil, um agente anti-câncer de amplo espectro, vastamente utilizado na clínica para o tratamento de tumores sólidos, foi usado como controle positivo na dose de 25mg/kg.

Sarcoma 180 é um tumor original de camundongo e uma das linhagens celulares mais freqüentemente usadas na pesquisa de atividade antitumoral *in vivo* (LEE *et al.*, 2003). Apenas na maior dose, (50mg/Kg) a SJC-8 apresentou atividade antitumoral apreciável, com um percentual de inibição de crescimento tumoral correspondente a 59.80%, neste modelo. Este foi o primeiro trabalho a relatar a atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* de um hidrobenzofuranóide isolados das folhas de *Tapirira guianensis*.

Quanto à análise do tecido tumoral, os animais do grupo controle negativo apresentaram áreas de necrose de coagulação, sendo, provavelmente devido à hipóxia tecidual causada durante o processo cirúrgico de retirada dos tumores. (KUMMAR *et al.*, 2004). Nos grupos tratados com a SJC-8 essas áreas devem-se provavelmente a atividade antitumoral. Nenhuma das duas doses usadas causaram alterações renais, sendo as alterações epiteliais observadas nos rins consideradas reversíveis, não indicando quadro de nefrotoxicidade. Nos outros órgãos analisados, não foi observado aumento ou diminuição da massa úmida significativa com nenhuma das doses testadas, diferentemente do que foi visto nos animais tratados com 5-fluorouracil, onde houve diminuição da massa dos baços nos animais tratados. Alguns autores indicam a perda de massa deste órgão como um dado sugestivo de efeito imunossupressor (DOGRA *et al*, 2004).

As análises histopatológicas dos órgãos removidos de animais tratados com a SJC-8 sugerem que o fígado pode ser considerado como alvo potencial de toxicidade. Isso condiz com muitos achados de drogas com atividade antitumoral *in vivo*, onde ocasionalmente e amplamente suas ações farmacológicas dão origem às lesões importantes *in vivo* no fígado (SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000).

De qualquer modo, regeneração do tecido hepático ocorre em muitas doenças, exceto quando ocorre um grande dano. Até quando a necrose hepatocelular está presente, mas o tecido conjuntivo está preservado, a regeneração é quase completa. As alterações hepáticas observadas nos animais tratados com SJC-8 podem ser consideradas reversíveis (MCGEE *et al.*, 1992; SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000; KUMMAR, 2004).

Tendo em vista que, nos animais do grupo controle também foi visualizada uma discreta tumefação turva dos hepatócitos e áreas de congestão portal e da veia centrolobular, é sugerido que estes efeitos estão relacionados ao metabolismo dos hepatócitos. Além disso, os animais tratados com 5-FU também apresentaram hiperplasia das células de Kupffer, o que sugere a toxicidade da droga, diferindo apenas na presença de esteatose em microgotas neste grupo (KUMMAR *et al.*, 2004).

Os dados *in vivo* aqui apresentados reforçam o potencial antitumoral *in vitro* deste hidrobenzofuranóide, sugerindo que ele apresenta potencial atividade antitumoral *in vivo*. A possível via para esta ação seria de maneira direta na célula, por induzir genotoxicidade, inibindo a síntese de DNA da célula tumoral, através da inibição de enzimas envolvidas no processo proliferativo, possivelmente a Topoisomerase 1, o que levaria a morte celular por apoptose e de uma maneira mais tardia, dependendo da dose, indução de morte por necrose.

Além destes fatores, temos em vista que, a toxicidade da droga testada *in vivo*, foi baixa, comparando com a do controle positivo, sendo as alterações histopatológicas observadas consideradas reversíveis. Aliado a isto, foi observada também uma redução do volume tumoral na maior dose testada. Estudos mais detalhados são necessários para elucidar o mecanismo de ação

da SJC-8, bem como produzir novos derivados químicos para avaliar a relação estrutura-atividade que justifique de forma mais detalhada o poder citotóxico da mesma, frente aos outros hidrobenzofuranóides e até mesmo outros análogos derivados da ciclohexanona.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Dos sete hidrobenzofuranóides isolados das Folhas de *Tapirira guianensis*, apenas o fitocomposto, 3a,7a-Di-hidroxi-2-[(8'Z)-heineicosan-8'-enil]-2,3,3a,7a-tetra-hidro-1-benzofuran-5(4H)-ona (SCJ-8), apresentou potencial antitumoral *in vivo*, reduzindo o crescimento do tumor da linhagem Sarcoma 180 e inibindo o crescimento celular nas linhagens tumorais humanas *in vitro*, não tendo mostrado atividade hemolítica. Essa ação foi devida a sua capacidade de inibir a síntese de DNA, possivelmente por ação inibitória na enzima Topoisomerase 1, levando a apoptose e necrose celular.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERELE, O. WHO Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. **HerbalGram**, v. 28, p. 13-20, 1993.

ALMEIDA, V. L.; LEITAO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C.C.; DONNICI, C.L. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. **Química Nova**, v. 28, p.118-129, 2005.

ARCAMONE, F. Isolamento et attività antitumorale di un antibiotico da *Streptomyces* sp., **Giorno Microbiology** v. 9, p. 83, 1961.

www.arvores.brasil.nom.br/cerrd.tapiriri.jpg, acesso em 20 de setembro de 2006.

BADER, G.; PLOHMANN, B.; HILLER, K. & FRANZ, G. Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells in vitro and hemolytical index. **Pharmazie**, 51, 414 - 417, 1996.

BAER, H. Allergic contact dermatitis from plants. **Handbook of natural toxins**. vol I. Plant and fungal toxins. Marcel Dekker, New York and Basel, 1983.

BENSON, F.K.; HORWITZ, M. Familial leukemia. **Best Practice & Research Clinical Hematology**, v. 19, p. 269-279, 2006.

BEZERRA, D.P. Potencial anti-câncer da pipartina e piperina, amidas isoladas de plantas do gênero *Piper*. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** – Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2005.

BLAGOSKLONNY, M.V. Cell death beyond apoptosis. **Leukemia**, v. 14, p. 1502-1508, 2000.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste**. Coleção Mossoroense: Ed: by Escola superior de Agricultura de Mossoró: Mossoró; v. XLIII, p. 352, 1976.

BRINK, A.; SCHULZ, B.; KOBRAS, K.; LUTZ, W.K.; STOPPER, H. Time dependent effects of sodium arsenit on DNA breakage and apoptosis observed in the comet assay. **Mutation Research**, v. 603, p. 121-128, 2006.

BROCKMANN, H. **Anthracyclinone und anthracycline (Rhodomycinone, Pyrromycinone und Ihre Glycoside)**, in *Forschritte der Chemie Organische Naturstoffe*, Zechmeister, L, Ed., Springer, Vienna, v. 21, p. 121-182, 1963.

BUTLER & DAWSON. **Cell culture**. Blackwell, Scientific Publications, 1992.

www.cancer.gov, acesso em 17 de maio de 2006.

CANALLE, R.; TAKAHASHI, C.S. Assessment of the cytotoxic and clastogenic activities of the sesquiterpenes lactone lynchnopholide in mammalian cells in vitro and in vivo. **Cancer Detection Prevention**, v. 25, p. 93-101, 2001.

CARTER, S.K. Cancer chemotherapy: new developments and changing concepts. **Drugs**, v. 20, p. 375-397, 1980.

COE, F.G and ANDERSON, G.J. Screening of medicinal plants used by the Garífuna of Eastern Nicaragua for bioactive compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p.29-50, 1996.

COHEN, J.J. Apoptosis. **Immunology Today**, v. 14, p.126-130, 1993.

COLLINS, A. R. & HORVÁTHOVÁ, E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, p. 337-341, 2001.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-61, 2004.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAIS, L. E. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. Petrópolis, RJ. Ed. Vozes, 1998.

CORREIA, S.J.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; CHAI, H-B.; PEZZUTO, J.M.; CORDELL, G.A. Alkyl phenols and derivatives from *Tapirira obtusa*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 781-84, 2001.

CORREIA, S.J. Flavonóides, Terpenóides e novos hidrobenzofuranóides bioativos das folhas de *Tapirira guianensis*. **Tese (Doutorado em Farmacologia)** – Universidade Federal da Bahia, Curso de Pós-graduação em Química, Bahia, 2005.

CORREIA, S.J., DAVID, J.M., DAVID, J.P. Metabólitos secundários de espécies Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, p. 1287-1300, 2006.

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

CRAGG, M. & NEWMAN, D. J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Investigation**. v. 17, n. 2, p. 153-63, 1999.

CRAGG, G.M; KINGSTON, D.G.I.; NEWMAN, D.J. **Anticancer agents from natural products**, In: Introduction. Taylor e Francis group, p. 1-2, 2005.

CZYZ, M., SZULAWSKA, A., BEDNAREK, A.K., DUCHLER, M. Effects of anthracycline derivatives on human leukemia K562 cell growth and differentiation. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p. 1431-1442, 2005.

DARTSCH, D.C.; SCHAEFER, A; BOLDT, S.; KOLCH, H. AND MARQUARDT, H. Comparison of anthracycline-induced death of human leukemia cells: Programmed cell death versus necrosis. **Apoptosis**, v. 7, p. 537-548, 2002.

DAVID, J.M., CHÁVEZ, J.P., CHAI, H-B., PEZZUTO, J.M., CORDELL, G.A. Two new cytotoxic compounds from *Tapirira guianensis*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 287-289, 1998.

DELGADO, H. P., PILLADO, F. G., SORDO, M., APAN, T.R., VAZQUEZ, M. M. & WEGMAN, P.O. Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of Argentatins A and B from *Parthenium argentatum* (Gray). **Life Sciences**, v. 77, p. 2855-2865, 2005.

DEZOIZE, B.; SEN, S. L'apoptose ou mort cellulaire programmée: Concepts, mécanismes et apports en cancérologie. **Bulletim du Cancer**, v. 79, p. 413-425, 1992.

DI BACCO, A.; KEESHAN, K.; MCKENNA, S.L. & COTTER, T.G. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia deregulation of cell growth and apoptosis. **The Oncologist**, v. 5, p. 405-415, 2000.

DIMMOCK J. R.; KUMAR, P.; NAZARALI, A.J.; MOTAGANAHALLI, N.L.; KOWALCHUK, T.P.; BEAZELY, M.A.; QUAIL, J.W.; OLOO, E.O.; ALLEN, T.M.; SZYDLOWSKI, J.; DECLERCQ, E.; BALZARINI, J. Cytotoxic 2,6-bis(arylidene)cyclohexanones and related compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 967-977, 2000.

DOGRA, R.K.S.; KHANNA, S. & SHANKER, R. Immunotoxicological effects of piperine in mice. **Toxicology**, v. 196, p. 229-236, 2004.

DOLBEARE, F.; GRATZNER, H.; PALLAVICINI, M.G. & GRAY, J.W. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 80, p. 5573-5577, 1983.

DRESCH, R.R.; HAESER, A.S.; LERNER, C.; MOTHES, B.; VOZÁRI-HAMPE, M.M. & HENRIQUES, A.T. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porífera) nativas da costa atlântica do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 16-19, 2005.

DU, Y.; OSHIMA, R.; KUMANOTANI, H. I. High-resolution gas—liquid chromatographic analysis of urushiol of the lac tree, *rhus vernicifera*, without derivatization. **Journal of chromatography A**, v. 295, p. 179-186, 1984.

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal Plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 111-120, 1996.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCÍA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SELLÉS, A.J.; DELGADO, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®) **Pharmacology Research**, v. 50, p. 143-49, 2004.

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

GERCHENSON, M.A. & ROTELLO, R.J. Apoptosis: a different type of cell death. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 6, p. 2450-2455, 1992.

GONZALEZ, V.M.; FUERTES, M.A.; ALONSO, C.; PEREZ, J.M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Molecular Pharmacology**, v. 59, p. 657-663, 2001.

GRINBERG, L.N., NEWMARK, H., KITROSSKY, N., RAHAMIM, E., CHEVION, M. & RACHMILEWITZ, E.A. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. **Biochemical Pharmacology**, 54, 973 - 978, 1997.

GRYNBERG, N.F.; CARVALHO, M.G.; VELANDIA, J.R.; OLIVEIRA, M.C.; MOREIRA, I.C. R.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 819-822, 2002.

GRZANKA, A.; GRZANKA, D. & ORLIKOWSKA, M. Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1611-1617, 2003.

HANNUN, Y.A. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. **Blood**, v. 89, p. 1845-1863, 1997.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet

assay. Fourth International Comet Assay Workshop, **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2003.

HARTLEY, L. Secondary compounds within the Anacardiaceae. 1998. www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers_1998/hartley.htm. Acesso em 13 de setembro de 2006.

HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antimicrobial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 39, p. 418-421, 1991.

HSIANG, Y. -H *et al.* Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 14873, 1985.

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

HU, W. & KAVANAGH, J.J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. **Lancet Oncology**, v. 4, p. 721-29, 2003.

www.inca.gov.br, acesso em 17 de maio de 2006.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; NAKAHARA, K.; MAEZURU, M.; TAKEYA, K.; KONDO, M.; INAMATSU, M.; MORITA, H. A quantitative structure-activity relationship for antitumor activity of long-chain phenols from *Ginkgo biloba* L. **Chemical Pharmacology Bulletin**, v. 37, p. 1619-1621, 1989.

IUCN - **Guidelines on the conservation of medicinal plants**. IUCN, WHO, WWF. Gland, Switzerland, 1993.

JIMENEZ, P. C.; FORTIER, S. C.; LOTUFO, T. M. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. & COSTA-LOTUFO, L. V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 287, p. 93-01, 2003.

KALISH, R.S. Poison ivy dermatitis pathogenesis of allergic contact dermatitis to Urishiol. **Progress in dermatology**, v. 29, p. 1-12, 1995.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KIARIS, H.; SCHALLY, A.V. Apoptosis versus necrosis: Which should be the aim of cancer therapy? **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 221, p. 87-88, 1999.

KINGSTON, D.G.I. **Anticancer agents from natural products**, In: Taxol and its analogs. Taylor e Francis group. p. 89-90, 2005.

KIRSCH-VOLDERS, M.; ELHAJOUJI, A.; CUNDARI, E. & VAN, H.P. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. **Mutation Research**, v. 392, p. 19-30, 1997.

KUBO, I.; OCHI, M.; VIEIRA, P.C.; KOMATSU, S. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 41, p. 1012-1015, 1993.

KUBO, I.; KINST-HORI, I.; YOKOKAUA, Y. Tyrosinase Inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 545-51, 1994.

KUBO, J.; LEE, J.R.; KUBO, I. Anti- *Helicobacter pylori* agents from the cashew apple. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 47, p. 533-537, 1999.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS & COTRAN. **Pathology Basis of Disease**, 7th ed. China: WB Saunders, p.1552, 2004.

LEE, K. H. Novel Antitumor Agents from Higher Plants. **Medicinal Research Reviews**, v. 19, p. 569-596, 1999.

LEE, Y.L.; KIM, H.J.; LEE, M.S., KIM, J.M.; HAN, J.S.; HONG, E.K.; KWON, M.S. & LEE, M.J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited

tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Experimental Animals**, v. 52, p. 371-375, 2003.

LEE, K.H. Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. **Journal of natural products**, v. 67, p. 273-283, 2004.

LEWINSOHN, T.M. & PRADO, P.I. **Biodiversidade Brasileira, Síntese do Estado Atual do Conhecimento**. Ministério do Meio Ambiente/Conservation International do Brasil, ed. Contexto Acadêmico, p. 154, 2002.

LITCHFIELD, J. T. & WILCOXON, F. A. simplified method of evaluating dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 95, p. 99-113, 1949.

LIU, W.M.; STIMSON, L.A. & JOEL, S.P. The in vitro activity of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in Bcr-Abl positive chronic myeloid leukemia cells: Synergistic interactions with antileukemic agents. **Breast Journal of Cancer**, v. 86, p. 1472-1478, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 158-159, 2002.

LOS, M.; BUREK, C.J.; STROH, C.; BENEDYK, K.; HUG, H.; MACKIEWICZ, A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design. **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 67-77, 2003.

MAJNO, G. & JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v. 146, p. 3-15, 1995.

MCGAHON, A. J., MARTIN, S. M., BISSONNETTE, R. P., MAHBOUBI, A., SHI, Y., MOGIL, R. J., NISHIOKA, W. K. & GREEN, D.R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods in Cell Biology**, v. 46, p. 153-185, 1995.

MCGEE, J.O.D.; ISAACSON, P.A. & WRIGHT, N.A. **Oxford Textbook of Pathology: Pathology of Systems**. New York: Oxford University Press, p. 1708, 1992.

MIDDLETON, E. & KANDASWAMI, C. **The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implication for immunity, inflammation and cancer.** In: Harbone JB (Editor), *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986.* Chapman and Hall, London, England, p. 619-652, 1993.

MEIJERS-HEIJBOER, H.; VAN, D.O.A.; KLIJN, J. *et al.* Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. **Nature Genetics**, v. 31, p. 55-59, 2002.

MERG, A.; LYNCH, H.T.; LYNCH, J.F & HOWE, J.R. Hereditary colon cancer - part I. **Current Problems in Surgery**, v. 42, p. 195-256, 2005.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E., & MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MITCHELL, J.D.; MORI, S.A. The Cashew and its relatives (*Anacardium: Anacardiaceae*). **The New York Botanical Garden**, v. 42, p. 1-76, 1987.

MITCHELL, J.D. **Advances in economic botany**, v. 8, p. 103, 1990.

MOERTEL, C.G.; SCHUT, A.J.; REITEMEIER, R.J. Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 56, p. 95, 1972.

MORS, W.B.; NASCIMENTO, M.C.; PEREIRA, B.M.R. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, p. 627-642, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 16, 55 – 63, 1983.

MUNRO, M.H.G.; LUIBRAND, R.T. & BLUNT, J.W. **The search for antiviral and anticancer compounds in marine organisms.** In: Scheuer, PJ (ED) *Bioorganic Marine Chemistry.* Ed. By Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1987.

NAROD, S.A & FOULKES, W.D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 665-676, 2004.

NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.P.; PURCELL, A.H.; LINDOW, S.E. Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p.7319-7327, 2003.

NG, T.B., LI, W.W. & YEUNG, H.W. A steryl glycoside fraction with hemolytic activity from tubers of *Momordica cochinchinensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, 18, 55-61, 1986.

OBERLIES, N.H. AND KROLL, D.J. Camptothecin and Taxol: Historic Achievements in Natural Products Research. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 129-135, 2004.

O'HAGAN, D. **The polyketide metabolites**, Ellis Horwood, Chichester, 1991.

OLIVE, P.L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiation Research**, v. 117, p. 79-92, 1989.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation – induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, p. 291-298, 1984.

PESSOA, C; SILVEIRA, E.R.; LEMOS, T.L.G; WETMORE, L.A.; MORAES, M.O.; LEYVA, A. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 187-191, 2000a.

PESSOA, C. Determinação do mecanismo de ação citotóxica de alguns compostos extraídos de plantas do nordeste brasileiro. **Tese (Doutorado em Farmacologia)** - Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2000b.

PERKINS, A. S. & STERN, D.F. **Molecular Biology of Cancer: Oncogenes**. In: Devita, V.T., Hellman, S., Rosenbreg, S.A. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 79-102, 1997.

PY, L.A & JACQUES, H. **A linguagem da saúde** - Ed. Campus, São Paulo, 2003.

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

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA, p. 356, 2003.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional**. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1995.

ROUHI, A.M & WASHINGTON, E. Rediscovering natural products. **Chemical and engineering news**, v. 81, p. 77-91, 2003.

ROY, M.K.; TAKENAKA, M.; KOBORI, M.; NAKAHARA, K.; ISOBE, S.; TSUSHIDA, T. Apoptosis, Necrosis and Proliferation-inhibition by Cyclosporine A in U937 cells (a human monocytic cell line), **Pharmacological Research**, v. 53, p. 293-302, 2006.

RUPERT, E.E. & BARNES, R.B. **Zoologia dos Invertebrados**. Ed. Rocca Ltda, 6ª edição. São Paulo, 1996.

SAVILL, J. Apoptosis in disease. **European Journal Clinical Investigation**, v. 24, p. 715-723, 1994.

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

SCHEUER, P.J. & LEFKOWITCH, J.H. Drugs and Toxins. In: Scheuer PJ, Lefkowitz, JH, eds. **Liver Biopsy Interpretation**, 6th ed. London: WB Saunders, p. 134-150, 2000.

SCHWARTSMANN G & WORKMAN P. "Anticancer Drug Screening and Discovery in the 1990s: A European Perspective", **European Journal of Cancer**, v. 29, p. 3-14, 1993.

SHAAG, A.; WALSH, T.; RENBAUM, P. *et al.* Functional and genomic approaches reveal an ancient CHEK2 allele associated with breast cancer in the ashkenazi jewish population. **Human Molecular Genetics**, v. 14, p. 555-563, 2005.

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

SKORSKI, T. Bcr/Abl regulates mammalian RecA homologs resulting in drug resistance. **Molecular Cell**, v. 8, p. 795-806, 2001.

SLUPIANEK, A.; SCHMUTTE, C.; TOMBLINE, G.; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; HOSER, G.; NOWICKI, M.O.; PIERCE, A.J.; FISHEL, R. & SULLIVAN, J.T.; RICHARDS, C.S.; Loyd, H.A.; KRISHNA, G. Anacardic Acid: Molluscicide in cashew nut shell liquid. **Planta Medica**, v. 44, p. 175-177, 1982.

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

SUFFNESS, M.; ABBOTT, B.; STATZ, D.W.; WONILOWICZ, E.; SPJUT, R. **Phytotherapy Research**, v. 2, p. 89-87, 1988.

SULLIVAN, J. T.; RICHARDS, C. S.; LLOYD, H. A.; KRISHNA, G. Anacardic acid: molluscicide in cashew nut shell liquid. **Planta Medica**, v. 44, p. 175-177, 1982.

TEWEY, K.M.; ROWE, T.C.; YANG, L.; HALLIGAN, B.D.; LIU, L.F. Adriamycin induced DNA damage mediated by mammalian DNA Topoisomerase II, **Science**, v. 226, p. 466, 1984.

TULP, M & BOHLIN, L. Functional versus chemical diversity: Is biodiversity important for drug discovery? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, p. 225, 2002.

TYMAN, J.H.P.; MORRIS, L.J. The composition of cashew nut-shell liquid (CNSL) and the detection of a setel phenolic ingredient. **Journal of chromatography**, v. 27, p. 287-288, 1967.

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

VIEGAS JR, C., BOLZANI, V.S., BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-37, 2006.

VOGL, O.; MITCHELL, J. D.; **Pure and Applied Chemistry**, v. 33, p. 1581, 1996.

VOGL, O.; MITCHELL, J. D. **Cellular and Chemical Technology**. v. 29, p. 273, 1995.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T.; SIM, G. A.; Plant antitumor agents I. The isolation and structure of camptotecin, a setel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, p. 3880-3890, 1966.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; **The alkaloids**, Academic Press: New York, 1998.

WALTERS, D. S.; CRAIG, R.; MUMMA, R. O. Fatty acid incorporation in the biosynthesis of anacardic acids of geraniums. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1815-1822, 1990.

WANG, J.C. DNA Topoisomerases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 635-692, 1996.

WANG, H.K. & LEE, K.H. Plant-derived anticancer agents and their analogs currently in clinical use or in clinical trials. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 38, p. 225, 1997.

WHO, BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regulatory situation of herbal medicines**. A worldwide review, Geneva, 1998.

YUNES, R.A. & CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Argos, Chapecó, p. 17-46, 2001.

ZHANG, A.; ZHU, Q.Y.; LUK, Y.S.; HO, K.Y.; FUNG, K.P. & CHEN, Z.Y. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sciences**, v. 61, p. 383-394, 1997.