



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

**BIOPROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM
POTENCIAL ANTITUMORAL EM ASCÍDIAS DO
LITORAL CEARENSE:
ESTUDOS COM EUDISTOMA VANNAMEI MILLAR,
1977 (UROCHORDATA, ASCIDIACEA)**

PAULA CHRISTINE JIMENEZ

FORTALEZA – CE

2004

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

**BIOPROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTITUMORAL
EM ASCÍDIAS DO LITORAL CEARENSE:**

**ESTUDOS COM Eudistoma vannamei MILLAR, 1977
(UROCHORDATA, ASCIDIACEA)**

Paula Christine Jimenez

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 Leticia Veras Costa Lotufo

Fortaleza - CE

Maiο, 2004

**BIOPROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTITUMORAL
EM ASCÍDIAS DO LITORAL CEARENSE:
ESTUDOS COM Eudistoma vanamei MILLAR, 1977
(UROCHORDATA, ASCIDIACEA)**

Paula Christine Jimenez

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.

A citação de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

Aprovada em 10 de maio de 2004

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Leticia Veras Costa Lotufo
Universidade Federal do Ceará
- Orientadora -

Prof Dr. Norberto Peporine Lopes
Universidade de São Paulo – RP

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

*Ao Márcio,
sem mais palavras... ζ*

*À minha mãe,
todos os dias, olhando por mim ζ*

*À Dra. Leticia Lotufo,
com satisfação e orgulho dessa nossa primeira ζ*

*“Nature herself must be our advisor;
the path she chalks must be our walk.
For as long as we confer with our own eyes,
and make our ascent from lesser things to higher,
we shall be at length received into her closest-secrets.”*

William Harvey

(De Generatione Animalium, 1651)

AGRADECIMENTOS

À Dra. Letícia Veras Costa Lotufo pela oportunidade de estudar os produtos naturais marinhos, pela sempre dedicada orientação deste trabalho, pela inesgotável paciência e compreensão, pela confiança, pela amizade e por todo o resto;

Ao Dr. Manoel Odorico de Moraes por ter me recebido no Laboratório de Oncologia Experimental, por ter acolhido o meu projeto e por ter proporcionado as melhores condições de trabalho para que fosse realizado;

À Dra. Claudia do Ó Pessoa pelo apoio diário, aconselhamentos e amizade;

Ao Dr. Norberto Peporine Lopes pela oportunidade de conviver com a química orgânica, pela contribuição científica dada a este trabalho e pelo incentivo;

Ao Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo pelas fotos e outras ilustrações, pela identificação das espécies utilizadas nesse trabalho e pelo apoio no estudo das ascídias;

À Dra. Maria Elizabete Amaral de Moraes pela cessão da Unidade de Farmacologia para a realização de etapas deste trabalho;

Ao Dr. Gordon Cragg do US-NCI, por abrir o caminho para o estudo dos produtos naturais marinhos no LOE;

Ao Dr. William Fenical do Scripps Institution of Oceanography (SIO), pela oportunidade em estudar os microorganismos marinhos e pela confiança;

Ao Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira pela cessão do microscópio, da paciência e do pessoal;

Ao amigo Diego Veras Wilke pela amizade, confiança, aprendizado, *reggae*, *blues* e determinante participação neste nosso trabalho;

Aos amigos Thiago Olitta Basso e Renata Takeara do Laboratório de Química Orgânica da USP-RP pela ajuda na parte química e pelo apoio ao trabalho;

Aos amigos Kelen, Michel e Neri e demais colegas do Laboratório de Química Orgânica da USP-RP pelo aprendizado, convivência e apoio;

À amiga Ana Paula Espíndola, do SIO, pela grande ajuda e constante incentivo no estudo dos produtos naturais marinhos;

Às amigas Raquel Montenegro e Marne Vasconcellos pela lembrança dos prazos, dos horários, das reuniões... pelo apoio constante e estimada amizade;

Aos amigos Bruno Cavalcanti e Marcelle Nogueira pela colaboração em várias etapas deste trabalho e pela amizade;

Aos pós-graduandos do LOE Alessandra, Ana Angélica, Ana Paula, Ferdinando, Hélio, Hemerson, Gardênia, Márcio, Patrícia, Raimundo e Rômulo por compartilharem as experiências, o dia-a-dia e a amizade;

Aos colegas do LOE e do Ecotox Ivana, Clarissa, Juliana, Hidelbrando, Ivna, Rafael, Lícia, Denissa, Eduardo, Danúzia, Nancy, Germana, Sabrina, Jeamylyle, Carol, Ana Raquel, Ryuga e Sammya pela confiança e o companheirismo na convivência diária;

Aos amigos da Unidade de Farmacologia Adriano, Aline, Demétrius, Gilmara, Giovanni, Isabelle, Ismael, Ismênia e Janaína pelo companheirismo, apoio e amizade;

À Silvana pela imensurável ajuda neste e em todos os outros trabalhos realizados no LOE;

Aos técnicos Fátima, David, Evanir e Paulo por sempre se prontificarem a ajudar;

Às secretárias Fábria, Maria Tereza, Sílvia e Áurea por resolverem todos os meus probleminhas e as tais burocraciazinhas...;

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

A Rose, Fernando, Chiquinho, Íris, Sílvio, D. Bia, Sr. Francisco e demais funcionários da Unifac e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, por fornecerem sempre boas condições de trabalho e estudo;

Ao Márcio, sempre...;

Ao amigo Sérgio Fortier pela amizade incondicional;

Ao amigo Marco Aurélio por palavras e silêncios compartilhados;

À amiga Gina Gláucia, em nome do nosso Natal na Alemanha (ah, amiga... só saiu isso!);

Ao amigo George Luiz por compartilhar do amor pela ciência e pela tão sincera amizade;

Ao amigo Luis Ernesto pelo carinho, apoio e as coisas em comum;

À minha mãe, que construiu uma carreira acadêmica exemplar, sem nunca abrir mão de seus princípios, se colocando, assim, como a minha maior inspiração;

Ao meu pai, que acompanhou de longe todo o meu crescimento pessoal e acadêmico, sem, contudo, questionar quaisquer das minhas decisões;

A Dilma e Nágela, que, por tantos anos, vêm ampliando o meu conceito de família;

Às primas Yáskara e Yamara por uma vida inteira de companheirismo e amizade;

Às tias Simone e Salésia e demais familiares pelo apoio e incentivo;

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

ÍNDICE

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xii
Lista de Símbolos e Abreviaturas	xiv
Resumo	xvi
Abstract	xvii
INTRODUÇÃO	1
1. O Estudo de Produtos Naturais Marinhos	1
2. As Ascídias	8
2.1. Sistemática	8
2.2. Biologia	9
2.3. Considerações sobre a defesa química	11
2.4. Importância Farmacológica	12
2.5. O Gênero <i>Eudistoma</i>	15
2.6. Potencial Farmacológico de Ascídias Brasileiras	18
OBJETIVOS	21
1. Geral	21
2. Específicos	21
MATERIAIS E MÉTODOS	22
1. Materiais Utilizados	22
1.1. Equipamentos	22
1.2. Soluções	23
1.3. Reagentes	26
1.4. Fármacos	26
1.5. Modelos Biológicos Experimentais	26
2. Metodologia Experimental	27
2.1. Coleta do Material	27
2.1.1. Identificação das Espécies	28
2.2. Obtenção dos Extratos Brutos	30

2.3. Fracionamento do Extrato Hidroalcoólico Bruto de <i>Eudistoma vannamei</i>	30
2.3.1. Fracionamento do Primeiro Extrato	30
2.3.2. Fracionamento do Segundo Extrato	32
2.3.3. Fracionamento do Terceiro Extrato	34
2.3.4. Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC)	35
2.3.5. Cromatografia de Camada Delgada Preparativa (CCDP)	35
2.4. Avaliação da Toxicidade dos Extratos Brutos	36
2.4.1. Toxicidade aguda em larvas de <i>Artemia salina</i>	36
2.4.1.1. Procedimento Experimental	36
2.4.1.2. Análise dos Dados	37
2.4.2. Potencial antimitótico em ovos de ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i>	37
2.4.2.1. Procedimento Experimental	37
2.4.2.2. Análise dos Dados	38
2.4.3. Avaliação do Potencial Hemolítico	38
2.4.3.1. Procedimento Experimental	38
2.4.3.2. Análise dos Dados	39
2.5. Teste de Citotoxicidade <i>in vitro</i> - Ensaio do MTT	39
2.5.1. Linhagens Celulares Utilizadas	39
2.5.2. Manutenção das Células	40
2.5.3. Ensaio do MTT	40
2.5.3.1. Procedimento Experimental	40
2.5.3.2. Análise dos Dados	41
2.6. Análise dos Efeitos Celulares em HL-60 – Determinação do Mecanismo de Ação	41
2.6.1. Viabilidade Celular – Exclusão por Azul de Tripán	41
2.6.1.1. Procedimento Experimental	42
2.6.1.2. Análise dos Dados	42
2.6.2. Curva de Crescimento Celular	42
2.6.2.1. Procedimento Experimental	42
2.6.2.2. Análise dos Dados	43
2.6.3. Inibição da Síntese de DNA – Incorporação de BrDU	43
2.6.3.1. Procedimento Experimental	43
2.6.3.2. Análise dos Dados	44

2.6.4. Análise Morfológica – Coloração Diferencial por Hematoxilina/Eosina	44
2.6.4.1. Procedimento Experimental	44
2.6.4.2. Análise dos Dados	45
2.6.5. Externalização da Fosfatidil-serina – Anexina V	45
2.6.5.1. Procedimento Experimental	45
2.6.5.2. Análise dos Dados	46
2.6.6. Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Acridina Laranja	46
2.6.6.1. Procedimento Experimental	46
2.6.6.2. Análise dos Dados	46
RESULTADOS	47
1. Ensaio com os Extratos Hidroalcoólicos Brutos das Ascídias – Seleção da Espécie	47
1.1. Toxicidade Aguda em <i>Artemia salina</i>	47
1.2. Potencial Antimitótico em Ovos de Ouriço do Mar	48
1.3. Atividade Hemolítica	49
1.4. Inibição da Proliferação de Células Tumorais <i>in vitro</i> – Ensaio do MTT	49
2. Fracionamento Bioguiado do Extrato Hidroalcoólico de <i>E. vannamei</i>	51
3. Análise dos Efeitos Celulares em HL-60	55
3.1. MTT – 24 horas de incubação	55
3.2. Viabilidade Celular - Exclusão por Azul de Tripán	55
3.3. Curva de Crescimento Celular	56
3.4. Inibição da Síntese de DNA – Incorporação de BrDU	58
3.5. Análise Morfológica – Coloração Diferencial por H/E	59
3.6. Externalização da Fosfatidil-Serina – Anexina V	61
3.7. Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Acridina Laranja	62
DISCUSSÃO	65
CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição de amostras com significativa citotoxicidade no <i>screening</i> pré-clínico realizado pelo US-NCI. O número absoluto de amostras está representada ao lado de cada barra. Fonte: Munro <i>et al.</i> , 1999	3
Figura 2	Desenho esquemático de ascídia solitária	9
Figura 3	Estrutura química da didemnina B	13
Figura 4	Estrutura química da aplidina	14
Figura 5	Estrutura química da ecteinascidina 743	15
Figura 6	Estrutura química da granulatinida, em A, e isogranulatinida, em B	19
Figura 7	Estrutura química das tamandarinas	19
Figura 8	Mapa identificando os pontos de coleta do material ao longo da costa do estado do Ceará	27
Figura 9	Fotografia das espécies de ascídias utilizadas neste trabalho	29
Figura 10	Processamento do primeiro extrato hidroalcoólico (EHA) bruto de <i>Eudistoma vannamei</i>	31
Figura 11	Processamento do segundo extrato hidroalcoólico (EHA) bruto de <i>Eudistoma vannamei</i>	33
Figura 12	Processamento do terceiro extrato hidroalcoólico (EHA) bruto de <i>Eudistoma vannamei</i>	34
Figura 13	Estrutura molecular da 6-etilamino-1-metil-piperazina-2,5-diona isolada de <i>Eudistoma vannamei</i>	54
Figura 14	Avaliação da viabilidade das células HL-60 tratadas e não tratadas pelo método de exclusão por azul de tripan: em A, contagem de células viáveis e, em B, contagem de células não-viáveis. 24h de incubação. *p < 0,05	56
Figura 15	Curva de crescimento das células HL-60 tratadas com cada uma das frações (0,1 µg/mL e 1,0 µg/mL) por 72 h. A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo. * p < 0,05	57
Figura 16	Microfotografias das células HL-60 controle e tratadas com doxorubicina e cada uma das frações por 24h. Coloração por H/E –setas pretas indicam fragmentação nuclear e condensação de cromatina, as laranjas indicam desestabilização da membrana plasmática, as róseas apontam as células de volume reduzido, as brancas, as picnóticas e as setas azuis evidenciam fragmentos celulares. Aumento 400X	60
Figura 17	Microfotografias das células HL-60 controle e tratadas com doxorubicina e cada uma das frações por 24h. Coloração por BE/AL – setas verdes indicam células viáveis, as amarelas indicam apoptose e as vermelhas, necrose. Aumento 400X	63

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1</u>	Alguns compostos derivados de fontes marinhas em fase de testes para o tratamento do câncer	4
<u>Tabela 2</u>	Quadro-resumo de algumas substâncias isoladas de ascídias do gênero <i>Eudistoma</i> sp.	17
<u>Tabela 3</u>	Relação das espécies de ascídias estudadas e respectivas Famílias e locais de coleta	28
<u>Tabela 4</u>	Reunião das frações obtidas de B+C	31
<u>Tabela 5</u>	Reunião das frações obtidas de EB	31
<u>Tabela 6</u>	Reunião das frações obtidas de DCM	33
<u>Tabela 7</u>	Reunião das frações obtidas de DCM II	35
<u>Tabela 8</u>	Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	39
<u>Tabela 9</u>	Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos de ascídias em larvas de <i>Artemia salina</i>	47
<u>Tabela 10</u>	Atividade antimitótica dos extratos hidroalcoólicos brutos das ascídias em ovos do ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i>	48
<u>Tabela 11</u>	Atividade hemolítica dos extratos hidroalcoólicos brutos das ascídias em hemácias de camundongo <i>Mus musculus</i>	49
<u>Tabela 12</u>	Atividade antiproliferativa em células tumorais <i>in vitro</i> dos extratos hidroalcoólicos brutos das ascídias avaliado pelo método do MTT	50
<u>Tabela 13</u>	Quadro-resumo das atividades tóxicas apresentadas pelo extrato bruto de cada espécie de ascídia estudada nos ensaios de toxicidade iniciais	51
<u>Tabela 14</u>	Amostras ativas, em destaque, avaliadas, em concentração única, pelo ensaio do MTT	52
<u>Tabela 15</u>	Atividade antiproliferativa em células tumorais <i>in vitro</i> das amostras obtidas do fracionamento do EHA de <i>Eudistoma vannamei</i> avaliado pelo método do MTT. Em destaque, amostras selecionadas para prosseguir em estudo	53
<u>Tabela 16</u>	CI ₅₀ das frações avaliadas pelo método do MTT com 24h de incubação com as células HL-60 - Relação CI ₅₀ 24h/CI ₅₀ 72h	55
<u>Tabela 17</u>	Inibição da incorporação de BrdU pelas células HL-60 tratadas e não tratadas - 24h de incubação * p < 0,05; ** p < 0,001	58
<u>Tabela 18</u>	Características morfológicas das células HL-60 tratadas e não-tratadas - Coloração por H/E. 24h de incubação	59
<u>Tabela 19</u>	Avaliação de apoptose/necrose pelo método da externalização da fosfatidil-serina – anexina-V - em células HL-60 tratadas e não tratadas - 24h de incubação	61

<u>Tabela 20</u>	Avaliação da viabilidade, apoptose e necrose celular em células HL-60 tratadas e não tratadas - Coloração BE/AL. 24h de incubação. * p < 0,05; ** p < 0,001	62
<u>Tabela 21</u>	Quadro-resumo das atividades apresentadas pelas frações selecionadas incubadas por 24h com as células HL-60	64

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
&	E
χ^2	Teste do qui-quadrado
μL	Microlitro
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celcius
[]	Concentração
<	Menor que
>	Maior que
AcOEt	Acetato de etila
ANOVA	Analisis of Variance (Análise de variância)
BE/AL	Brometo de Etídeo/Acridina Laranja
BrdU	Bromodeoxiuridina
CCDC	Cromatografia de camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia de camada delgada preparativa
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono (gás carbônico)
DAB	Diaminobenzidina
DCM	Diclorometano
DE ₅₀	Dose efetiva média
DL ₅₀	Dose letal média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	Epithelial growth factor (Fator de crescimento epitelial)
EHA	Extrato hidroalcoólico bruto
HEPES	Ácido hidroximetil piperazina etanossulfônico
EtOH	Álcool etílico
g	Gramas
h	Hora

H/E	Hematoxilina/Eosina
H ₂ O	Água destilada
IC	Intervalo de confiança
km	Quilômetro
L	Litro
M	Molar
m/v	Massa/Volume
MDR	Multi-drug resistance (Resistência a múltiplas drogas)
MeOH	Álcool metílico
mg	Miligrama
min	Minuto
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromida
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
n ^o	Número
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
pH	Potencial hidrogeniônico
PKC	Proteína-quinase C
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNM ¹ H	Ressonância Nuclear Magnética de Prótons
rpm	Rotações por minuto
SE	Solução de Eritrócitos
TBS	Tris buffer solution (Tampão tris)
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
X	Vezes

BIOPROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTITUMORAL EM ASCÍDIAS DO LITORAL CEARENSE: ESTUDOS COM Eudistoma vannah MILLAR, 1977 (UROCHORDATA, ASCIDIACEA) Dissertação de Mestrado. Autor: Paula Christine Jimenez. Orientadora: Dra. Letícia Veras Costa Lotufo. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. Aprovada em 10 de maio de 2004.

RESUMO

Este trabalho avaliou, inicialmente, a citotoxicidade dos extratos hidroalcoólicos das 10 espécies de ascídias mais abundantes do litoral cearense através dos seguintes métodos: toxicidade aguda em larvas de artemias, inibição do desenvolvimento dos ovos de ouriço-do-mar, potencial hemolítico e inibição da proliferação celular de linhagens tumorais. A espécie *Eudistoma vannah* mostrou-se a mais ativa em 3 dos 4 ensaios realizados, sendo, portanto, selecionada para prosseguir com a caracterização química e farmacológica de seus princípios ativos. O extrato foi particionado em diversos solventes e fracionados por cromatografia em sílica gel 60 e sephadex LH-20. A atividade das amostras foi monitorada pelo método do MTT. Das 60 amostras coletadas, 15 foram ativas. A CI_{50} dessas 15 amostras foi verificada, novamente pelo método do MTT, em 5 linhagens celulares tumorais: CEM, HL-60, MCF-7, HCT-8 e B-16. As frações DCM-14 a DCM-18, derivadas da fase diclorometânica e quimicamente muito semelhantes entre si, como evidenciado por CCDC, foram as mais ativas, apresentando CI_{50} de até 1,0 $\mu\text{g/mL}$ na maioria das linhagens. A dicetopiperazina 6-etilamino-1-metil-piperazina-2,5-diona foi isolada da fase CH_2Cl_2 e detectada como o componente majoritário, no entanto, foi inativa sobre a proliferação celular. O espectro de $^1\text{H-NMR}$ das frações DCM-14 a DCM-18 indicou, como componentes minoritários, uma série de derivados desta dicetopiperazina, que não foram identificados. O estudo dos efeitos das frações sobre a viabilidade (exclusão por azul de tripan), proliferação (incorporação de BrdU e curva de crescimento) e indução de morte (morfologia celular – coloração por H/E – anexina e coloração por BE/AO) nas células HL-60 demonstrou que DCM-16 e DCM-17 foram as mais fortes redutoras da proliferação celular. DCM-16 apresentou um pronunciado efeito inibitório sobre a incorporação de BrdU, o que pode indicar uma interferência na duplicação de DNA. DCM-17 inibiu satisfatoriamente a incorporação de BrdU, mas a indução de apoptose é, aparentemente, seu mecanismo predominante. DCM-14 e DCM-15 também apresentam perfis de indutoras de apoptose celular, sendo que a última demonstra alguns indícios de atividade necrótica. Os efeitos de DCM-18 foram pouco pronunciados. As atividades apresentadas por essas frações são concentração-dependente e o aumento do tempo de contato intensifica o efeito citotóxico.

BIOPROSPECTION OF POTENTIAL ANTICANCER COMPOUNDS IN TUNICATES FROM THE COAST OF CEARÁ: STUDIES ABOUT Eudistoma vannamei MILLAR, 1977 (UROCHORDATA, ASCIDIACEA) Master's Dissertation.

Author: Paula Christine Jimenez. Advisor: Dr. Letícia Veras Costa Lotufo. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. Approved on May 10th, 2004

ABSTRACT

The study, initially, evaluated the cytotoxicity of the hydro-alcoholic extracts of the 10 most abundant ascidian species from the coast of Ceará (Brazil), through the utilization of the following methods: brine shrimps lethality assay; inhibition of sea urchin eggs development; hemolytic potential, and inhibition of *in vitro* tumor cell growth. In three out of the four assays performed, the *Eudistoma vannamei* specie proved to be the most active one, and it was, therefore, selected for chemical and pharmacological characterization of its active principles. The extract was partitioned by various solvents and fractionated by chromatography in silica gel 60 and sephadex LH-20 columns. The samples' activities were monitored through the MTT method. Of the 60 collected samples, 15 were active. The IC₅₀ of the 15 samples was evaluated through the MTT method, in 5 tumor cell lines: CEM, HL-60, MCF-7, HCT-8 e B-16. The fractions DCM-14 to DCM-18, derived from the CHCl₂ phase and chemically very similar to each other, as indicated by CTLC were the most active ones, with an IC₅₀ under 1,0 µg/mL in the majority of lines. The diketopiperazine 6-ethylamino-1-methyl-piperazine-2,5-dione was isolated from CH₂Cl₂ phase and identified as the major component, however, it was inactive upon cell proliferation. The H¹RNM spectra of DCM 14 to DCM 18 fractions showed a number of compounds derived from that major diketopiperazine, which were not identified, as minor components. The study about the fractions effect upon HL-60's viability (exclusion by trypan blue), proliferation (BrdU uptake and growth curve) and cell death induction (cell morphology - H/E staining – annexin and BE/AO) revealed DCM-16 and DCM-17 as the most potent cell proliferation reducers. DCM-16 displayed a pronounced BrdU uptake inhibitory effect, which may indicate interference in the DNA duplication process. DCM-17 showed a satisfactorily inhibition upon BrdU uptake, however, the apoptosis induction seems to be its main mode of action. DCM-14 and DCM-15 also displayed a cell apoptosis inductor profile, while the latter indicated some signs of necrotic activity. The activities presented by these fractions are concentration and time dependent since longer periods under cell contact intensifies its cytotoxic effect.

**BIOPROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM
POTENCIAL ANTITUMORAL EM ASCÍDIAS DO
LITORAL CEARENSE:
ESTUDOS COM EUDISTOMA VANNAMEI
MILLAR, 1977 (UROCHORDATA, ASCIDIACEA)**

INTRODUÇÃO

1. O Estudo de Produtos Naturais Marinhos

A natureza é uma atrativa fonte de compostos com funções terapêuticas e a utilização de produtos naturais como medicamentos é reconhecida desde a antiguidade. A grande diversidade química distribuída em milhões de espécies de plantas, animais, fungos e demais microorganismos reflete o impacto da evolução na seleção e conservação de mecanismos de defesa para repelir ou destruir predadores (Farnsworth *et al.*, 1985; Cragg *et al.*, 1997; Faulkner, 2000). A exploração dos metabólitos secundários de organismos vivos é certamente um aspecto de incontestável valor para a ciência, por suas aplicações farmacológicas diretas, como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos ou como instrumentação científica.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial utiliza-se diretamente de recursos naturais no tratamento de doenças (Farnsworth *et al.*, 1985; Cragg & Newman, 1999). Agentes medicamentosos derivados destes produtos respondem pelos cuidados em saúde dos restantes 20% da população, principalmente em países em desenvolvimento, onde mais de 50% dos fármacos em uso clínico têm sua origem em fontes naturais (Balandrin *et al.*, 1993; Cragg & Newman, 1999).

De todas as fontes naturais de fármacos, o ambiente marinho é certamente a última grande fronteira. Evitado por muito tempo, apenas recentemente o ecossistema marinho foi reconhecido como fonte de produtos naturais com potencial terapêutico,

tendo, os pesquisadores, aí descoberto um ambiente de biosíntese totalmente distinto, com novas estruturas químicas e reações enzimáticas peculiares. O resultado foi o reconhecimento dos organismos marinhos como detentores de um significativo potencial na geração de novos fármacos (Davidson, 1993; Fenical, 1998).

O trabalho pioneiro de Bergmann e Feeney, no início da década de 50, com o isolamento dos arabinonucleosídeos espongotimidina e espongouridina da esponja caribenha *Cryptotethya crypta* (Tethyidae), despertou o interesse nos produtos naturais marinhos e em seu potencial biomédico (Bergman & Feeney, 1951; Munro *et al.*, 1999; Schwartzmann *et al.*, 2001). Esses nucleosídeos serviram de protótipo para o desenvolvimento de uma nova classe de análogos - Ara-A e Ara-C. A atividade da arabinosil citosina (Ara-C) deriva de sua conversão em arabinosil citosina trifosfato e sua subsequente incorporação ao DNA, havendo inibição da DNA polimerase. Ara-C (Citarabina), e Ara-A (Vidarabina) são os únicos derivados sintéticos de produtos naturais marinhos atualmente utilizados em tratamentos clínicos de viroses e tumores (Köning & Wright, 1996; Schwartzmann *et al.*, 2001).

A citotoxicidade parece ser a atividade mais comum dos compostos de origem marinha, o que ratifica a hipótese de que esses metabólitos têm uma função defensiva (De Vries & Beart, 1995; Faulkner 2000). Segundo estatísticas do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI), os invertebrados marinhos apresentam maior ocorrência de substâncias citotóxicas do que outras fontes avaliadas, como plantas, animais e microrganismos terrestres (figura 1) (Garson, 1994; Munro *et al.*, 1999).

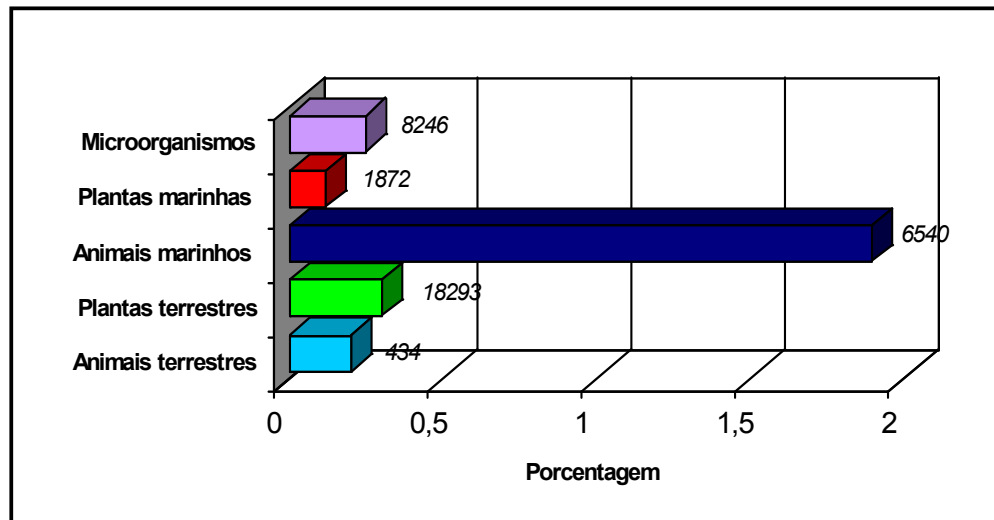


Figura 1 – Distribuição de amostras com significativa citotoxicidade no *screening* pré-clínico realizado pelo US-NCI. O número absoluto de amostras está representada ao lado de cada barra. Fonte: Munro *et al.*, 1999.

Avanços tecnológicos em coletas de profundidade e aquicultura trouxeram um grande número de novas moléculas aos testes pré-clínicos e clínicos (Schwartzman, 2000; Schwartzman *et al.*, 2001; Berlinck *et al.*, 2004). Com relação ao tratamento de neoplasias os estudos encontram-se bastante adiantados. Nas três últimas décadas, cerca de 3000 novos compostos foram isolados de organismos marinhos e essas novas moléculas vêm demonstrando atividade citotóxica contra diversos tipos de tumores (Rinehart, 2000). A tabela 1 resume os principais compostos derivados de fontes marinhas em fase experimental ou de testes clínicos para o tratamento do câncer.

Tabela 1: Alguns compostos derivados de fontes marinhas em fase de testes para o tratamento do câncer.

Composto	Espécie	Mecanismo de Ação	Situação Experimental
Citarabina	<i>Cryptotethya crypta</i>	Inibição da síntese de DNA	Fase III/IV
Briostatina I	<i>Bugula neritina</i>	Ativação de PKC	Fase III
ET-743	<i>Ecteinascidia turbinata</i>	Alquilação de DNA	Fase III
Didemmina B	<i>Trididemnum solidum</i>	Inibição da síntese protéica Apoptose	Fase II (retirada)
Aplidina	<i>Aplidium albicans</i>	Bloqueio do ciclo celular em G1	Fase II
Dolastatina	<i>Dolabella auricularia</i>	Inibição de microtúbulos Apoptose	Fase II
Halicondrina B	<i>Halichondria okadai</i> <i>Lissodendoryx</i> sp.	Interação com tubulina	Pré-clínica
Discodermolida	<i>Discodermia dissoluta</i>	Estabilização da tubulina	Pré-clínica
Eleuterobina	<i>Eleutherobia</i> sp.	Estabilização dos microtúbulos	Pré-clínica
Curacina A	<i>Lyngbya majuscula</i>	Interação com tubulina	Pré-clínica
Criptoficina	<i>Nostoc</i> sp.	Hiperfosforilação de Bcl-2	Pré-clínica
Ácido ocadaico	<i>Prorocentrum lima</i>	Interação com fosfatases protéicas	Pré-clínica
Aplironina A	<i>Aplysia kurodai</i>	Inibição de polimerização da actina	Pré-clínica
Jaspamida	<i>Jaspis splendens</i>	Inibição de polimerização da actina	Pré-clínica (retirada)
Dercitina	<i>Dercitus</i> sp.	Intercalação no DNA	Pré-clínica
Macaluvaminas	<i>Zyzya</i> sp.	Inibição da topoisomerase II	Pré-clínica
Neoanfimedina	<i>Xestospongia carbonaria</i>	Inibição da topoisomerase II	Pré-clínica
Naamidina A	Espanja	Inibição de EGF	Pré-clínica
Agosterol A	Alga vermelha	Reversão de MDR	Pré-clínica
Deidrotirsiferol	esponja	Inibição da síntese de DNA	Pré-clínica
Isogranulatimida	<i>Didemnum granulatum</i>	Bloqueio do ciclo celular em G2	Pré-clínica

Fonte: Mayer, 1999; Schwartzmann *et al*, 2001.

Depois da citarabina, o primeiro composto a entrar nos testes clínicos foi a didemnina B, isolada do tunicado *Trididemnum solidum*, por meados da década de 80. Alcançou a fase II, mas foi retirada por ter demonstrado alta toxicidade cardíaca e neuromuscular. Um composto relacionado, a dehidrodidemnina B ou aplidina, isolado do tunicado *Aplidium albicans* demonstrou uma maior atividade em estudos pré-clínicos e encontra-se em fase II (Rinehart, 2000; Rocha *et al.*, 2001).

As briostatinas formam um grupo de moléculas isoladas do briozoário *Bugula neritina*. A briostatina 1 encontra-se em fase II de testes clínicos contra melanoma, linfoma não-Hodgkins, câncer renal e colo-retal, mas continua em avaliação de fase I para uso em combinação com outras drogas. Possui baixa mielotoxicidade e promove efeitos imunoestimulantes, aumentando a produção de interferons e interleucina-2. (Pettit, 1991; Rocha *et al.*, 2001).

As dolastatinas, isoladas do molusco *Dolabella auricularia*, possuem potente atividade citotóxica e, dentre elas, a dolastatina 10 tem recebido o maior interesse por parte da clínica. Já em fase II dos testes clínicos, têm demonstrado pouca atividade contra diversos tipos de tumores sólidos (Poncet, 1999; Rocha *et al.*, 2001).

Numerosas ecteinascidinas foram isoladas do tunicado *Ecteinascidia turbinata*. Dentre elas, a ecteinascidina 743 (ET-743) demonstrou toxicidade em diversas linhagens tumorais em concentrações sub-nanomolares. No momento, encontra-se em fase III (Rinehart, 2000; Rocha *et al.*, 2001).

Inúmeros outros compostos encontram-se em fase pré-clínica, derivados de vários grupos e com diferentes alvos celulares. A discodermolida é um metabólito isolado da esponja *Discodermia dissoluta*. Inicialmente foi descrita como um agente imunossupressor e citotóxico. Sua potente atividade antiproliferativa é devido à estabilização de microtúbulos e encontra-se em fase pré-clínica de desenvolvimento. A eleuterobina, isolada do coral *Eleutherobia sp.*, também em fase pré-clínica, age pela mesma via. Curacina A, de *Lyngbya majuscula*, um inibidor da polimerização da

tubulina, é um forte agente antitumoral *in vitro*, mas não vem demonstrando sucesso em experimentos *in vivo*.

As macavulaminas A - F são pirroloiminoquinonas citotóxicas isoladas de esponjas do gênero *Zyzya* sp. Exibem forte citotoxicidade contra a linhagem de carcinoma de cólon humano HCT-116, agindo sobre a enzima topoisomerase II. A jaspamida, também conhecida como jasplaquinolida, foi isolada da esponja *Jaspis splendens* e é um potente inibidor da polimerização da actina. No entanto, induziu uma toxicidade intolerável e foi retirada na fase de testes pré-clínicos. A aplironina A, de *Aplysia kurodai* também age por essa via, mas não se sabe ainda se essa alta toxicidade é comum a todos os inibidores de actina.

O ácido ocadaico foi inicialmente isolado da esponja *Halichondria okadai* e posteriormente provou ser sintetizado pelo dinoflagelado *Lyngbya majuscula*. Esse composto é um forte agente citotóxico e apresenta uma potente atividade antitumoral, além de ser um inibidor seletivo das fosfatases protéicas I e IIa. Essa última propriedade lhe proporcionou um extenso uso como uma ferramenta científica em experimentos na área de farmacologia e bioquímica (revisado por Schmitz *et al.*, 1998; Cartè, 1996; Mayer, 1999; Faulkner, 2000; Sennett, 2001; Blunt *et al.*, 2003).

A halicondrina B foi primeiramente isolada da esponja *Halichondria okadai* e mostrou-se muito potente contra a proliferação das linhagens P-388, B-16 e L1210 *in vivo*, também agindo sobre a tubulina. Essa esponja fornecia apenas uma pequena quantidade da substância ativa, em tentativas de cultivo artificial, a síntese era diminuída. Posteriormente foi detectada a presença de halicondrina B na esponja *Lissodendoryx* sp., juntamente com um análogo, a iso-homo-halicondrina B. Essa espécie teve sucesso na aquicultura e fornece a quantidade suficiente, tanto de halicondrina B como de iso-homo-halicondrina B, para a condução dos testes pré-clínicos (Hirata & Uemura, 1986; Litaudon *et al.*, 1994; Battershill *et al.*, 1998; Faulkner, 2000).

Além da atividade anticâncer, os produtos naturais marinhos vêm sendo também investigados como potenciais imunossupressores. Dentre estes, podemos citar a monoalida, isolada da esponja *Luffariella variabilis*, que se encontra em fase I e a pseudopterosina A, da gorgônia *Pseudopterogorgia elisabethae*, atualmente em fase pré-clínica (Fenical, 1997; Faulkner, 2000).

Os estudos do potencial anti-infeccioso dos produtos marinhos encontram-se também bastante adiantados. Jaspamida, isolada da esponja *Jaspis* sp. é um potente antifúngico e tem se mostrado altamente tóxico contra *Cândida albicans*. Como exemplo de agentes anti-micobacterianos podemos citar a 8-hidroxi-manzamina, a axisonitrila-3 e o litosterol, os primeiros isolados de esponjas e o último derivado de um coral. Estas substâncias são fortes inibidoras de *Micobacterium tuberculosis*. A atividade anti-protozoária pode ser exemplificada pelos peróxidos cíclicos com atividade leishmanicida isolados da esponja *Plakortis aff. angulospiculatus*. A busca por novos agentes antibacterianos no ambiente marinho resultou na descoberta das cribostatinas e jorumicina e pestalona, que demonstraram intensa atividade contra *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium*, respectivamente. Os compostos papuamida A, avarona e microspinosamida, derivados de esponjas, representam a classe dos antivirais que exibem uma promissora atividade anti HIV (revisado por Donia & Hamann, 2003).

As neoplasias malignas são a segunda causa de mortes em humanos, superadas apenas pelos acidentes cardiovasculares (Ministério da Saúde, 2004). Apesar do considerável arsenal de drogas já existente para o tratamento de neoplasias e o sucesso terapêutico em vários tipos de tratamentos, ainda não se chegou a um composto ideal. Por isso, a busca incessante por novos compostos mais seletivos, com menos efeitos colaterais, maior potência terapêutica e menor índice de resistência é de extrema relevância.

Novas estruturas químicas são requeridas para gerar inovações terapêuticas. A química combinatória e a exploração da diversidade estrutural obtida de origem natural servem de guias para descoberta e síntese de novas moléculas. A maior vantagem do uso de produtos naturais marinhos como fonte para a descoberta de

novas drogas é a diversidade estrutural dos compostos ali reconhecidos, alguns com estruturas jamais encontradas em fontes terrestres e detentores de potentes atividades biológicas (Ireland *et al.*, 1988; König & Wright, 1996; Munro *et al.*, 1999).

Dentre os invertebrados marinhos, os tunicados, juntamente com as esponjas e os briozoários, têm sido os grupos de maior destaque na química de produtos naturais marinhos devido à presença de adaptações para sobrevivência em ambientes de intensas pressões seletivas relacionadas à ocupação do substrato e à predação (Munro *et al.*, 1999). Com relação aos tunicados, de acordo com levantamento feito recentemente, existem 63 espécies de ascídias desde a Bahia ao Ceará, muitas das quais nunca foram estudadas com relação à presença de substâncias bioativas (Lotufo, 2002).

2. As Ascídias

2.1. Sistemática

As ascídias pertencem ao Subfilo Urochordata (ou Tunicata) que, juntamente com Cephalochordata e Vertebrata, constituem o Filo Chordata. São características comuns a todos os cordados a presença de uma notocorda ou eixo de sustentação corporal, fendas branquiais na faringe, endóstilo (tireóide, nos vertebrados), tubo nervoso dorsal oco e cauda pós-anal em pelo menos um dos estágios da vida (Rocha, 2002). Dentre os urocordados ou tunicados, a Classe Ascidiacea representa o grupo mais numeroso de cordados inferiores, com aproximadamente 90% do número total de espécies. Encontram-se distribuídas em duas ordens, Enterogona e Pleurogona, e três subordens: Aplousobranchia, Phebobranchia e Stolidobranchia (Rodrigues *et al.*, 1998; Ruppert & Barnes, 1996; Monniot *et al.*, 1991).

2.2. Biologia

As ascídias são animais exclusivamente marinhos, bentônicos, na maioria sésseis. Externamente, são revestidas por uma túnica que envolve completamente o indivíduo, no caso das ascídias solitárias, ou podem formar uma cobertura comum, em espécies coloniais (figura 2). A túnica é um tecido vivo cujas principais funções são fixação ao substrato, sustentação e proteção. Sua matriz orgânica contém água, proteínas e polímeros de carboidratos chamados de tunicina (Rodrigues *et al.*, 1998; Rocha, 2002). O acúmulo de ácido sulfúrico na túnica lhe confere um baixo pH além de um sabor impalatável, o que pode constituir uma barreira primária contra a predação (Stoecker, 1980).

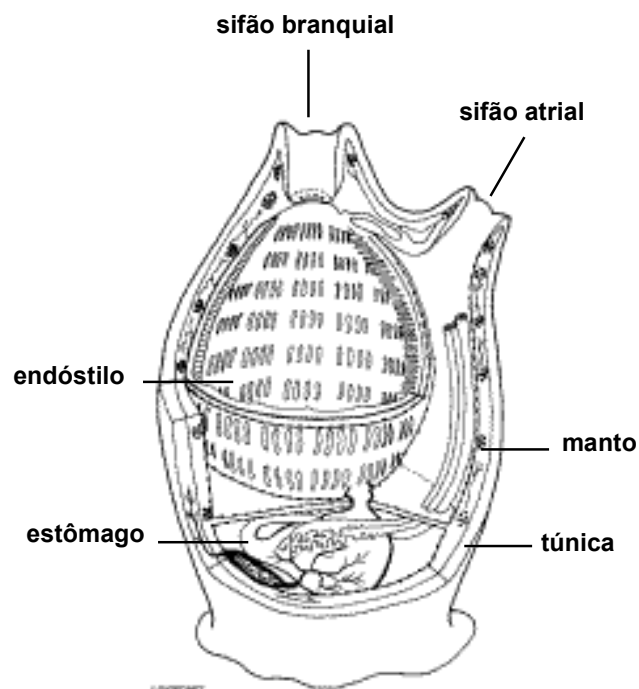


Figura 2 – Desenho esquemático de uma ascídia solitária.

Por serem animais filtradores, alimentam-se do microplâncton existente nas correntes marinhas. Possuem um sifão branquial, por onde entra a água e um atrial, por onde ela é eliminada juntamente com fezes e outras excretas. O tubo digestivo é completo e a digestão é extracelular (Rodrigues *et al.*, 1998; Rocha, 2002). O sistema circulatório é do tipo aberto e o plasma sanguíneo é isotônico ou ligeiramente hipertônico em relação à água do mar. O sangue das ascídias desperta grande interesse pelo acúmulo de metais pesados como ferro, nióbio, tantálio, titânio e, principalmente, vanádio (Rodrigues *et al.*, 1998; Rocha, 2002). As trocas respiratórias são realizadas, em grande parte, na parede da faringe, mas, por serem sésseis, não necessitam de muito oxigênio (Rocha, 2002).

O ciclo de vida da grande maioria das espécies de ascídias é indireto e envolve a formação de uma larva girinóide (Rodrigues *et al.*, 1998) nas quais a presença conjunta de uma cauda com notocorda e tubo nervoso dorsal oco evidencia a proximidade entre ascídias e cordados. As larvas, que representam a fase de dispersão, ao encontrarem um local para se fixar, sofrem uma metamorfose que envolve a reabsorção da cauda e a torção do tronco em aproximadamente 180 graus (Rocha, 2002).

O comensalismo é bastante comum entre as ascídias e outros animais devido a suas cavidades branquiais e atriais amplas, ausência de defesa mecânica efetiva e hábito filtrador, o que gera um suprimento contínuo de alimento e água. A simbiose é freqüentemente observada, principalmente entre ascídias coloniais e algas unicelulares proclorófitas. Dentre os predadores das ascídias, destacam-se caranguejos, poliquetas, estrelas-do-mar, gastrópodes, turbelários, peixes e mamíferos, entre eles, o homem (Rocha, 2002).

2.3. Considerações sobre a defesa química

As ascídias são organismos dominantes em muitas comunidades. De acordo com alguns autores, elevados níveis de vanádio e o baixo pH da túnica constituiriam uma barreira primária contra a predação ou epibiontes, uma vez que a túnica libera

ácido sulfúrico ao ser lesada e o vanádio, a não ser em concentrações residuais, é um veneno metabólico para um grande número de organismos (Stoecker, 1980). No entanto, o ácido sulfúrico é rapidamente neutralizado na água do mar e a hipótese de que o acúmulo de vanádio deteria a predação não é aplicável a todos os membros da classe: altas concentrações de vanádio são encontradas apenas nos organismos pertencentes à subordem Phlebobranchia e em alguns Aplousobranchia; já nos Stolidobranchia o vanádio não é encontrado (Parry, 1984).

Em estudos realizados por Davis e Wright (1989) com duas espécies de ascídia do gênero *Eudistoma* (Aplousobranchia, Polycitoridae) verificou-se que algumas colônias de *E. capsulatum* possuíam até 60% de suas superfícies cobertas por organismos epibiontes, enquanto que as colônias de *E. olivaceum* estavam livres de epibiontes. Os membros da família Polycitoridae acumulam tanto vanádio quanto ácido sulfúrico na túnica. A medida do pH da túnica de *E. olivaceum* estava próximo de 6 enquanto que a túnica de *E. capsulatum* estava mais próximo de 1, demonstrando que a acidez da túnica não é um mecanismo de defesa muito efetivo. Além disso, também foi observado que extratos de *E. olivaceum* apresentaram potentes atividades citotóxica, antimicrobiana e antiviral, enquanto que estas bioatividades não foram significantes para os extratos de *E. capsulatum* (Stoecker, 1980).

Visto que há espécies de ascídias que acumulam uma alta quantidade de vanádio e ácido sulfúrico e são intensamente predadas, como as da subordem Phlebobranchia, as que não acumulam quantidade alguma de vanádio ou ácido sulfúrico e não são predadas, como as da subordem Stolidobranchia, e a ausência de defesa mecânica (com a exceção de algumas famílias que apresentam espículas calcáreas), o sucesso evolutivo das ascídias seria também atribuído à capacidade de acumular ou sintetizar metabólitos secundários, característica que se encontra amplamente espalhada dentro de um determinado grupo de ascídias (Lindquist *et al.*, 1991), que seriam responsáveis por inibir o crescimento de epibiontes e reduzir o número de predadores.

2.4. Importância Farmacológica

As ascídias estão entre os invertebrados marinhos mais estudados pelos grupos que trabalham com produtos naturais. Por serem animais sésseis, de corpos moles e aparentemente desprotegidos, são fortes candidatos a produtores de metabólitos secundários bioativos, já que esta produção está supostamente associada a mecanismos químicos de defesa contra a predação, desenvolvimento de epibiontes, e proteção contra a radiação ultravioleta (Pawlik, 1993). Compostos nitrogenados, em geral alcalóides, peptídeos e outros derivados de aminoácidos, respondem por 85% dos produtos do metabolismo secundário já isolados de ascídias; os 15% restantes são compostos provenientes da rota do acetato e, em muito menor extensão, da rota do acetato-mevalonato (Monniot *et al.*, 1991; Davidson, 1993; Molinski, 1993; Ireland *et al.*, 1993; Watters & van den Brenk, 1993; Dietzmann, 1997).

A química de produtos naturais de ascídias teve início em meados da década de 70 quando Fenical e colaboradores isolaram o primeiro metabólito de uma ascídia, a geranil-hidroquinona da espécie *Aplidium* sp.. Este composto apresentou uma atividade quimiopreventiva contra algumas formas tumorais em cobaias. A ocorrência de um agente anticâncer em um organismo marinho unido à ausência de neoplasmas em ascídias muniram os químicos com incentivos para expandir a pesquisa com esses animais (Davidson, 1993).

Em expedição realizada ao Caribe, em 1978, observou-se que extratos da ascidia *Trididemnum solidum* apresentaram potente atividade antineoplásica, citotóxica, imunomoduladora e antimicrobiana. A posterior investigação química desse animal levou ao isolamento de uma série de depsipeptídeos cíclicos, denominados didemninas (Rinehart *et al.*, 1981, 1988; Li *et al.*, 1992; Sakai *et al.*, 1996), das quais a mais interessante é a didemnina B. (figura 3). *In vitro*, assim como *in vivo*, demonstrou significativa atividade contra o vírus *Herpes simplex* tipos I e II. Foi testada também contra uma gama de tumores em camundongos além de linhagens celulares humanas, também demonstrando significativa atividade anti-câncer, com CI_{50} variando entre 1 e 50nM. O mecanismo de ação da didemnina B permanece parcialmente incompreendido. Sabe-se apenas que ela age pela inibição da síntese

protéica durante a fase G1 - S do ciclo celular (Ireland, 1993). Chegou a completar a fase II dos testes clínicos em pacientes com tumores avançados de rim, mama e pele, mas teve de ser retirada por não demonstrar terapêutica significativa além de ter alta toxicidade cardíaca e neuromuscular (Rossof *et al.*, 1989; Faulkner, 2000). Os estudos realizados com as didemninas nos últimos 20 anos foram recentemente revisados por Vera & Joullié (2002).

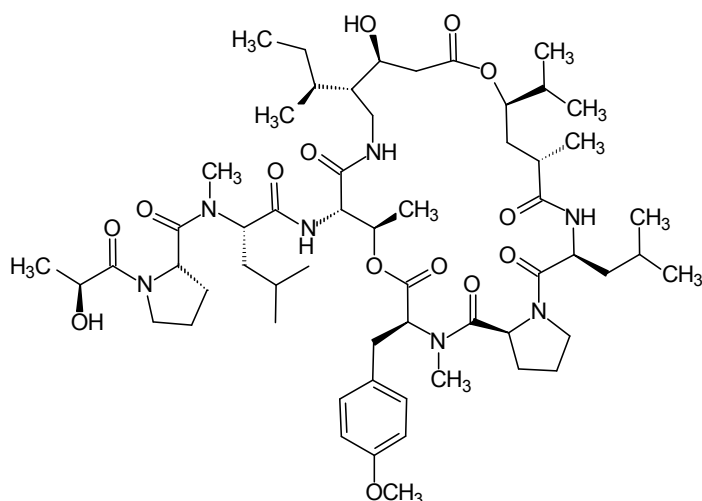


Figura 3 – Estrutura química da didemnina B.

No entanto, a dehidrodidemnina B ou aplidina (figura 4), isolada de *Aplidium albicans*, entrou como um substituto da didemnina B, demonstrando ainda maior potência em estudos pré-clínicos. A aplidina é também um depsipeptídeo cíclico formada pelos mesmos aminoácidos que a didemnina B, mas sua fórmula molecular difere daquela da didemnina B por conter mais dois átomos de hidrogênio, diferença essa que lhe confere uma redução na toxicidade (Sakai *et al.*, 1996; Geldof *et al.*, 1999). A sua toxicidade é devido ao bloqueio do ciclo celular na fase G1 e à diminuição da expressão de receptores de flt-1 o fator de crescimento de endotélio vascular (Erba *et al.*, 1999; Brogginini *et al.*, 1999). Encontra-se em fase II dos testes clínicos com atividade comprovada para o tratamento de melanomas, linfoma não-Hodgkins e carcinomas de rim, estômago e colos-retais. Em pacientes tratados com aplidina não foi demonstrado qualquer sinal de mielotoxicidade, nem mesmo nas mais altas doses toleradas, mas uma toxicidade neuromuscular e hepática foi registrada, além de uma prolongada emese (revisado por Albella *et al.*, 2002).

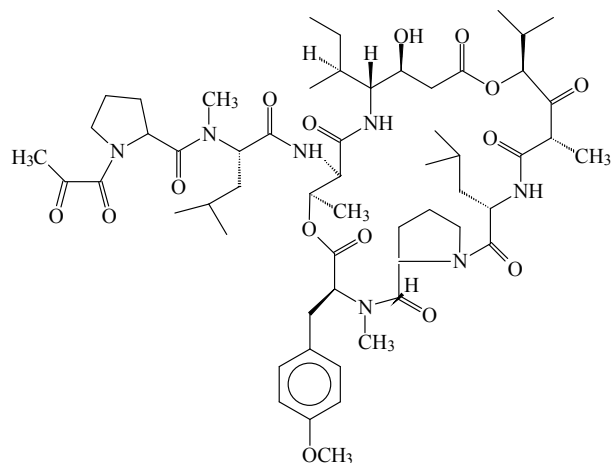


Figura 4 – Estrutura química da aplidina.

A ecteinascidina 743 (ET-743) (figura 6) é uma tetraidroisoquinona isolada da espécie *Ecteinascidia turbinata* (Rinehart *et al.*, 1990). A atividade antitumoral de extratos dessa ascídia é conhecida desde 1969, sendo que o isolamento e a elucidação estrutural do princípio ativo provou ser extremamente difícil (Siegel *et al.*, 1969). Atua como um agente alquilante seletivo para resíduos de guanina do DNA (Moore *et al.*, 1998), induzindo apoptose não-dependente de p53 e bloqueando o ciclo celular na fase G2-M (Erba *et al.*, 2001). Também foi observada uma interação entre ET-743 e proteínas nucleares (Minuzzo *et al.*, 2000). Atualmente, encontra-se no terceiro estágio de testes clínicos em humanos com atividade comprovada em câncer de mama e sarcoma de tecidos moles. A hematotoxicidade é o fator limitante para a utilização da ET-743 (Jimeno *et al.*, 1996). Outro composto desse grupo, a ecteinascidina 729, apresentou forte atividade em modelos tumorais murinos e encontra-se em avaliação pré-clínica em linhagens tumorais *in vitro* (Sakai *et al.*, 1992).

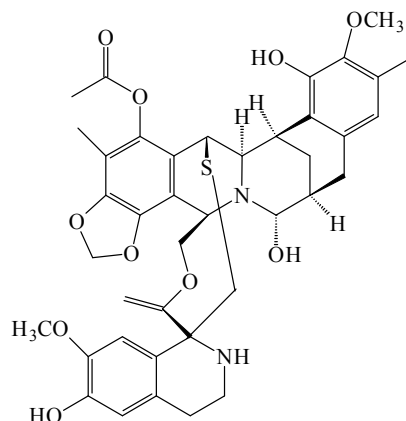


Figura 5 – Estrutura química da ecteinascidina 743.

3.5. O Gênero *Eudistoma*

A maioria das substâncias com atividade biológica têm sido isoladas de ascídias aplousobrânquias, principalmente daquelas pertencentes às famílias Didemnidae e Polycitoridae. Vários grupos de compostos já foram isolados de espécies do gênero *Eudistoma* (Polycitoridae) (Waters & van den Brenk, 1993), sendo que os alcalóides estão entre os grupos químicos mais relevantes.

As eudistominas são uma série de alcalóides β -carbolínicos derivados de aminoácidos, isolados, inicialmente, da ascídia caribenha *Eudistoma olivaceum*. Desta espécie foram isoladas as eudistominas A – T, que apresentaram atividades antibióticas, antivirais, antileucêmicas, indutoras da liberação de Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático e antagonistas da calmodulina, dentre outras (Rinehart *et al.*, 1984; 1987; Kinzer e Cardellina, 1987; Kobaiashi *et al.*, 1990). As eudistomidinas são outro grupo de compostos isolados de espécies do gênero *Eudistoma*, estruturalmente e farmacologicamente relacionados às eudistominas. Da espécie *Eudistoma glaucus* foram isoladas as eudistomidinas A – F que demonstraram atividades relacionadas à liberação de Ca^{2+} e ao antagonismo da calmodulina (Kobaiashi *et al.*, 1990; Murata *et al.*, 1991).

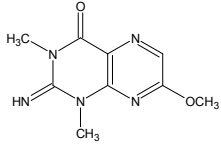
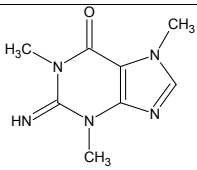
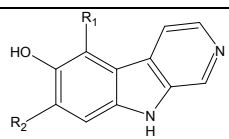
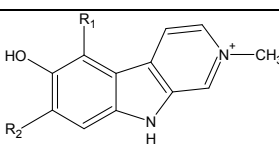
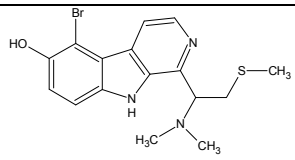
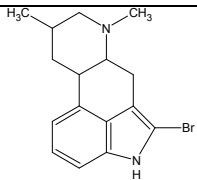
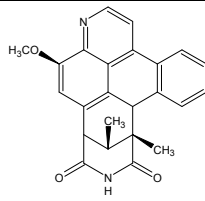
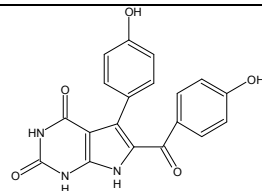
O fracionamento biomonitorado do extrato citotóxico de *Eudistoma gilboverde* levou ao isolamento de três alcalóides β -carbólicos N-metilados: 2-metileudistomina J, 2-metileudistomina D e 14-metileudistomina C, sendo que este último apresentou potente atividade citotóxica perante quatro diferentes linhagens de células tumorais ($CI_{50} < 1,0 \mu\text{g/mL}$) (Rashid *et al.*, 2001).

De outra espécie do gênero *Eudistoma*, foi isolado um alcalóide do tipo ergolina, o primeiro advindo de uma fonte marinha, nomeado pibocina. Este composto demonstrou atividade citotóxica contra células do carcinoma de Ehrlich em ratos ($DE_{50} 12,5 \mu\text{g/mL}$) (Makarieva *et al.*, 1999).

Do tunicado *Eudistoma cf. rígida* foram isolados os macrolídeos de 24 membros, nomeados iejimalidas A e B, ambos com moderada atividade citotóxica (Kobayashi *et al.*, 1988). Também foram isolados macrolídeos sulfatados com atividade antineoplásica, os quais foram nomeados iejimalidas C e D. Tais substâncias apresentaram potente citotoxicidade *in vitro* frente a células de carcinoma epidermóide humano KB [CI_{50} de 4,2 (C) e 0,2 (D) $\mu\text{g/mL}$] e a células do linfoma murino L1210 [CI_{50} de 1,0 (C) e 0,58 (D) $\mu\text{g/mL}$] (Kikuchi *et al.*, 1991). Rigidina, um alcalóide pirrolopirimidínico antagonista da calmodulina, também foi isolado de *Eudistoma cf. rígida* (Kobayashi *et al.*, 1990).

Adesanya *et al.* (1992) isolaram de *Eudistoma album* o composto eudistalbina A, com potente atividade citotóxica. Acredita-se que este composto é um derivado biossintético do triptofano e da leucina, indicando a habilidade desta ascídia em unir vários aminoácidos com o triptofano. A hidroxí-estaurosporina foi isolada da ascídia não identificada *Eudistoma sp.* coletada na Itália. Este composto induz uma potente inibição da proteína quinase C, maior até do que a estaurosporina, um metabólito isolado de fungo muito utilizado como ferramenta no estudo da PKC (Kinnel e Scheuer, 1992). Seis novos alcalóides foram isolados da ascídia *Eudistoma sp.* – segolinas A e B, isosegolina A, norsegolina e debromosegolina A e elaitina – mas registros farmacológicos não foram produzidos (Rudi & Kashman, 1989). A tabela 2 resume algumas substâncias isoladas de ascídias do gênero *Eudistoma*.

Tabela 2: Quadro-resumo de algumas substâncias isoladas de ascídias do gênero *Eudistoma* sp.

Espécie (Referência)	Composto	Estrutura
<i>Eudistoma</i> sp (Van Wagoner <i>et al.</i> , 2001)	1,3, <i>O</i> ⁷ -trimetilsoxantopterina	
<i>Eudistoma</i> sp (Perry <i>et al.</i> , 2001)	1,3,7-trimetilguanina	
<i>Eudistoma gilboverde</i> (Rashid <i>et al.</i> , 2001)	eudistomina C (R ₁ =Br e R ₂ =H) eudistomina E (R ₁ =H e R ₂ =Br)	
<i>Eudistoma gilboverde</i> (Rashid <i>et al.</i> , 2001)	2-metileudistomina D (R ₁ =Br e R ₂ =H) 2-metileudistomina J (R ₁ =H e R ₂ =Br)	
<i>Eudistoma gilboverde</i> (Rashid <i>et al.</i> , 2001)	14-metileudistomina C	
<i>Eudistoma</i> sp (Makarieva <i>et al.</i> , 1999)	Pibocina	
<i>Eudistoma bituminis</i> (Viracaoundin <i>et al.</i> , 2001)	Segolina C	
<i>Eudistoma cf. rigida</i> (Viracaoundin <i>et al.</i> , 2001)	Rigidina	

3.6. Potencial Farmacológico de Ascídias Brasileiras

Considerando-se que os organismos marinhos despontam como uma das mais promissoras fontes naturais de novos compostos com atividades biológicas e que o Brasil possui a segunda maior costa contínua no mundo, com aproximadamente 8.500 km de extensão, os mares brasileiros representam um grande potencial para a descoberta de novas substâncias bioativas de interesses médico e farmacológico. Entretanto, a busca de componentes antitumorais em organismos marinhos brasileiros é um campo muito recente de investigação. O número de estudos é inexpressivo diante da biodiversidade marinha no Brasil.

Berlinck *et al.* (1998) descreveram a ocorrência dos alcalóides aromáticos citotóxicos granulatinimida e isogranulatinimida (figura 6) em ascídias brasileiras da espécie *Didemnum granulatum*. Esses alcalóides foram os primeiros exemplares de uma nova classe de inibidores do ciclo celular específicos para a fase G2. O uso de inibidores do *checkpoint* em G2 em combinação com um agente genotóxico tem sido proposto como uma estratégia para a terapia do câncer, especialmente no caso de tumores sólidos onde se verifica ausência da função de p53 (Roberge *et al.*, 1998). De acordo com os autores, a inibição desse sistema inerente de reparo do DNA deveria aumentar dramaticamente o processo de destruição de células cancerosas sem essa função, uma vez que tais células são incapazes de ativar o *checkpoint* em G1 em resposta a algum dano no DNA. Outro ponto interessante a ser destacado é que os inibidores do *checkpoint* em G2 sozinhos não parecem afetar as células normais ou cancerosas, atenuando os efeitos colaterais dessas drogas. Isogranulatinimida é, provavelmente, a droga mais promissora isolada de um organismo marinho brasileiro. Vale a pena ressaltar que esse trabalho resultou de um programa de *screening*. Poucos anos mais tarde, outro alcalóide foi isolado dessa mesma espécie de ascídia, a 6-bromogranulatinimida (Britton *et al.*, 2001).

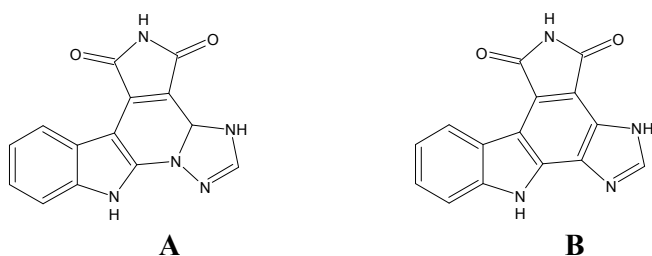


Figura 6 – Estrutura química da granulatinimida, em A, e isogranulatinimida, em B.

As tamandarinas A e B (figura 7) são novos depsipeptídeos isoladas de outra ascídia brasileira da família Didemnidae (Vervoort *et al.*, 2000). Os depsipeptídeos são muito comuns em ascídias e o metabólito mais frequentemente estudado nesses organismos, a didemnin B, pertence a essa classe química. As tamandarinas A e B mostraram forte toxicidade em linhagens de células cancerosas humanas e parecem ser um inibidor da síntese da proteína mais potente se comparados à didemnin B (Vervoort *et al.*, 2000). Não obstante a forte citotoxicidade das tamandarinas, não há qualquer dado relativo à toxicidade sistêmica desses elementos, sendo muito cedo para se ter alguma idéia sobre suas aplicações terapêuticas.

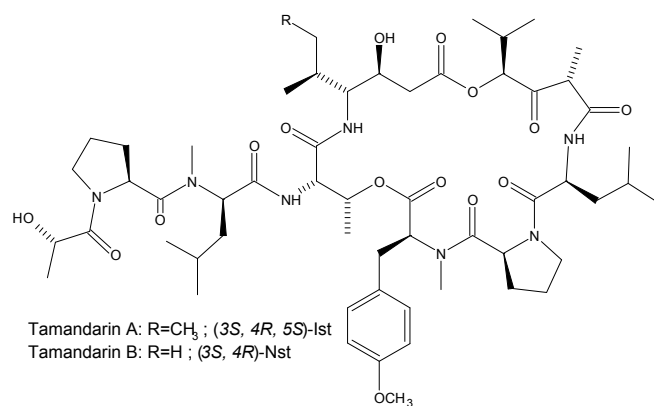


Figura 7 – Estrutura química das tamandarinas.

Mais recentemente, Torres *et al.* (2002) isolou dois alcalóides citotóxicos do grupo das piridoacridinas, as sebastianinas A e B (figura 8), da ascídia brasileira *Cystodytes dellechiaiei*. Esses alcalóides apresentaram citotoxicidade contra HCT-116 e tal atividade pareceu estar relacionada a um mecanismo dependente de p53.

Até o momento, não se têm relatos de estudos realizados com produtos naturais de invertebrados marinhos coletados no litoral cearense. De acordo com Lotufo (2002), existem cerca de 18 espécies de ascídias no Ceará, incluindo várias espécies novas, o que indica um alto grau de endemismo nessa região. Desta maneira, este trabalho se iniciou com um *screening* para atividade citotóxica com o extrato bruto das dez espécies mais abundantes dentre as quais a *Eudistoma vannamei* Millar, 1977 foi selecionada para prosseguir com o estudo químico e farmacológico. Esta é uma espécie endêmica do litoral nordestino brasileiro, tendo sido registrada na desde a Bahia até o Ceará. São encontradas, principalmente, na zona entre-marés vivendo em gretas ou em faces negativas de pedras, ao abrigo da luz (Lotufo, 2002).

Grande parte das espécies mencionadas como fontes de substâncias com atividades biológicas interessantes habitam as regiões tropicais. O litoral nordestino compreende a maior parte do litoral tropical brasileiro, que se estende por cerca de 3000 km. O estado do Ceará possui uma zona costeira com 573 km de extensão e esta permanece praticamente desconhecida pelos grupos que estudam produtos naturais. Tal lacuna representa, portanto, a maior parcela do potencial em bioprospecção de produtos naturais, constituindo-se em elemento importante na descoberta de novas drogas e estratégias terapêuticas.

OBJETIVOS

1. Geral

Realizar a prospecção de substâncias com potencial anticâncer a partir da identificação de substâncias citotóxicas em espécies de ascídias coletadas em diferentes localidades do litoral cearense, com ênfase na espécie mais ativa.

2. Específicos

- Verificar a ocorrência de atividade citotóxica no extrato hidroalcoólico das espécies de ascídias mais abundantes do litoral cearense utilizando os seguintes ensaios: toxicidade aguda em larvas de *Artemia salina*, desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço do mar, atividade hemolítica em eritrócitos de camundongo e inibição da proliferação de células tumorais *in vitro*;

- Realizar o fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto de *E. vannamei* utilizando diferentes técnicas de cromatografia, biomonitorando a atividade antiproliferativa das frações obtidas sobre células tumorais *in vitro*;

- Avaliar possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade citotóxica do extrato, frações e compostos isolados de *E. vannamei*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais Utilizados

1.1. Equipamentos

Agitador de placa MLW Modelo Thys 2

Aquário marinho

Centrífuga Centimicro FANEN Modelo 212

Centrífuga Excelsa Baby I FANEN Modelo 206

Centrífuga de placas Eppendorf Modelo Centrifuge 5403

Centrífuga de lâminas Shandon Southern Cytospin

Colunas analíticas para CLAE Shimadzu ODS

Colunas preparativas para CLAE Shimadzu ODS

Cromatógrafo líquido Shimadzu com Bomba Modelo LC6A, Detector Ultra-Violeta com Integrador Modelo C-R6A e Injetor Manual Rheodyne Modelo 7125

Deionizador de água Milli-Q

Espectrofotômetro de placas Packard Spectra Count

Evaporador rotativo Fisatom Modelo 802

Fluxo laminar VECO

Frascos para cultura de células Corning

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

Liofilizador E – C Micromodulye com Bomba Valupump Savant Modelo VLP 80

Lupa Askania–Variant Modelo M2M1

Microscópio de fluorescência Olympus Modelo BX41

Microscópio óptico Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab

Microscópio óptico de inversão Nikon Diaphot

RMN Bruker DPX-300

1.2. Soluções

Acridina laranja 100 µg/mL	1 mg de acridina laranja PBS q.s.p 10 mL de solução.	Sigma -
Água do mar filtrada	-	-
Anexina- iodeto de propídeo	10 µL de anexina-V 1 µL de iodeto de propídeo 500 µL de tampão de incubação	Boehringer Boehringer -
Anticorpo anti-BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU BSA 5% q.s.p. 500 µL de solução	Sigma Dako
Anticorpo biotinizado anti- imunoglobulina de camundongo	1 µL de anticorpo anti-imunoglobulina BSA 5% q.s.p. 100 µL de solução	Sigma Dako
Azul de tripan 10%	10 mg de Azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma -
BrdU 10mM	-	Sigma
Brometo de etídio 100 µg/mL	1 mg de Brometo de etideo PBS q.s.p 10 mL de solução	Sigma -

Diaminobenzidina (DAB)	5 µL de DAB	Immunotech
	1 mL de Tris-HCl (Tris 0,05M) pH= 7,6	Proquímios
	2 µL de H ₂ O ₂	Proquímios
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	10 µL de estreptavidina- fluoresceína	Boehringer
	500 µL do tampão de incubação	-
Estreptavidina - peroxidase	1 µL 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	-
Hematoxilina 0,1%	0,5 g de Hematoxilina	Doles
	10 mL de Glicerina	Labsynth
	25 g de Sulfato de alumínio	Labsynth
	0,1 g de Iodeto de potássio	Labsynth
	H ₂ O q.s.p. 500 mL de solução	-
KCl 0,5M	37,3 g de Cloreto de potássio	Labsynth
	H ₂ O q.s.p 1 L de solução.	-
Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e 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	Cultilab

MTT	20 mg de MTT PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma -
Penicilina - estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab Cultilab
Solução desnaturante (para análise de incorporação de BrdU)	Formamida 70 % 2x SSC (pH=6,5 – 7,5 a 70°C)	Vetec -
Solução salina (para hemólise)	8,5 g de Cloreto de sódio (0,85%) 1,11 g de Cloreto de cálcio (10 mM) H ₂ O q.s.p 1 L de solução	Labsynth Reagen -
Soro fetal bovino	-	Cultilab
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Citrato de sódio 0,15 M H ₂ O	Labsynth Grupo Química -
Tampão de incubação (para análise de anexina-V)	HEPES 10 mM Cloreto de sódio 140 mM Cloreto de cálcio 5 mM (pH= 7,4.) H ₂ O	Reagen Labsynth Reagen -
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio 2,14 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O 0,276 g de NaHPO ₄ .H ₂ O H ₂ O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	Labsynth Labsynth Labsynth -
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Tris 0,5 M (pH= 7,6) H ₂ O	Labsynth Proquímios -

Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5% 0,125 g de EDTA 450 mL de PBS	Cultilab Proquímios -
Triton X -100 1%	1 mL de Triton X-100 H ₂ O q.s.p. 100 mL de solução	Isofar -

1.3. Reagentes

Acetato de Etila Vetec	DMSO Vetec
Acetona Vetec	Álcool Etilico Vetec
Ácido Acético Vetec	Hexano Vetec
Ácido Clorídrico Vetec	Álcool Metílico Vetec
Ácido Sulfúrico Vetec	Sephadex LH-20 Pharmacia
Diclorometano Vetec	Sílica gel 60 GF ₂₅₄ Merck

1.4. Fármacos

Doxorrubicina Zodiac (fornecida pela farmácia do Instituto do Câncer do Ceará – ICC)

1.5. Modelos Biológicos Experimentais

Camundongos *Mus musculus* Swiss

Cistos de *Artemia salina*

Linhagens celulares tumorais cultivadas (detalhadas na tabela 8, p. 39)

Ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*

2. Metodologia Experimental

2.1. Coleta do Material

Os exemplares de cada espécie foram coletados no litoral do estado do Ceará nas praias de Flexeiras, pertencente ao município de Trairi, Taíba e Pecém, pertencentes ao município de São Gonçalo do Amarante, e Ponta Grossa, no município de Icapuí. O material foi lavado em água do mar para redução da contaminação e, em seguida, imerso em MetOH, sendo posteriormente armazenado à $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da preparação do extrato. Na figura 8 estão demonstrados os principais pontos de coleta do material.

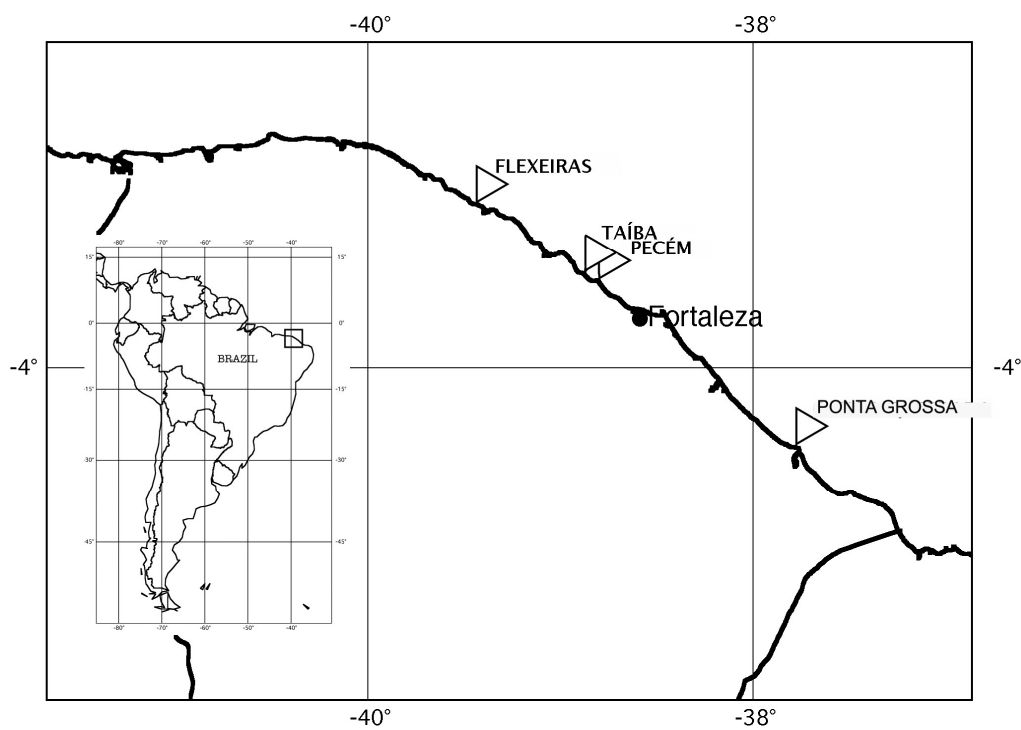


Figura 8 - Mapa identificando os pontos de coleta do material ao longo da costa do estado do Ceará.

2.2.1. Identificação das Espécies

Uma pequena amostra do material coletado de cada espécie foi separada e fixada em solução de EtOH a 70% para a identificação pelo Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo, da Universidade Federal do Ceará. A tabela 3 traz a lista das espécies utilizadas neste trabalho assim como a Família a que pertencem e o local de coleta. A figura 9 mostra fotografias dos exemplares estudados (a espécie *Didemnum* sp. não está representada).

Tabela 3: Relação das espécies de ascídias estudadas e respectivas Famílias e locais de coleta.

Espécie	Família	Foto	Local de Coleta
<i>Cystodytes dellechiajei</i> (Della Valle, 1877)	Polycitoridae	A	Praia de Flexeiras, Trairí - CE
<i>Didemnum ligulum</i> Monniot F., 1983	Didemnidae	B	Praia do Pecém, S. Gonçalo do Amarante - CE
<i>Didemnum psammatoedes</i> (Sluiter, 1895)	Didemnidae	C	Praia do Pecém, S. Gonçalo do Amarante - CE
<i>Didemnum</i> sp.	Didemnidae	-	Praia de Flexeiras, Trairí - CE
<i>Eudistoma vannamei</i> Millar, 1977	Polycitoridae	D	Praia do Pecém, S. Gonçalo do Amarante - CE Praia da Taíba, S. Gonçalo do Amarante - CE Praia de Flexeiras, Trairí - CE
<i>Eudistoma</i> sp.	Polycitoridae	E	Praia de Flexeiras, Trairí - CE
<i>Euherdmania</i> sp.	Euherdmaniidae	F	Praia de Ponta Grossa, Icapuí - CE
<i>Polysyncraton</i> sp.	Didemnidae	G	Praia de Flexeiras
<i>Trididemnum</i> sp.	Didemnidae	H	Praia do Pecém, S. Gonçalo do Amarante - CE
Gen. n.	Holozoidae	I	Praia de Flexeiras, Trairí - CE

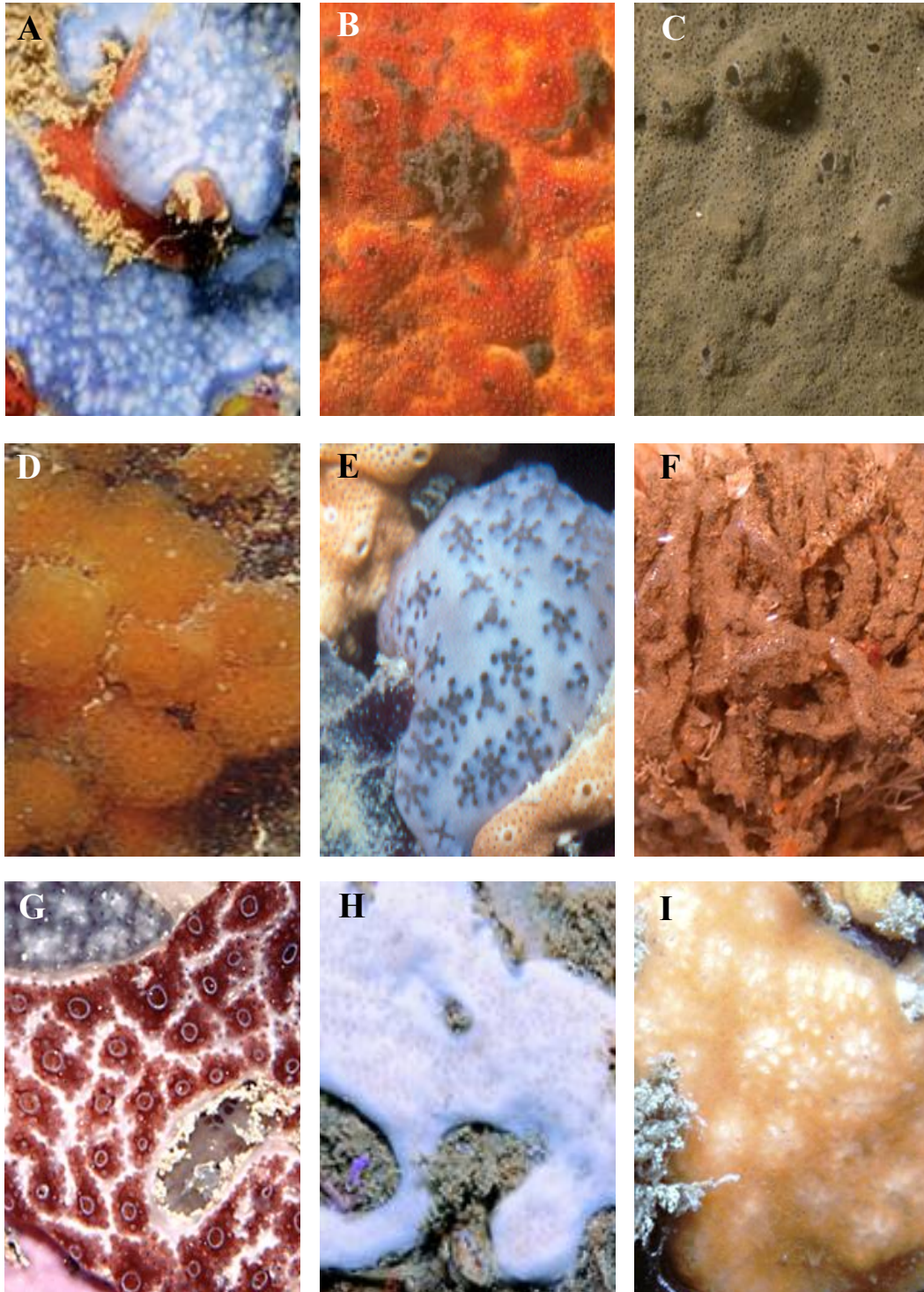


Figura 9 – Fotografia das espécies de ascídias utilizadas neste trabalho. Por Tito Lotufo.

2.2. Obtenção dos Extratos Brutos

A homogeneização dos indivíduos de cada espécie foi realizada em MetOH, numa proporção de 1:5 (m/v) do peso úmido do animal. Esta solução foi filtrada, concentrada a vácuo e, posteriormente, liofilizada para a obtenção do extrato bruto.

2.3. Fracionamento do Extrato Hidroalcoólico Bruto (EHA) de *Eudistoma vannamei*

O fracionamento do EHA bruto de *E. vannamei* foi realizado no Laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela equipe do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

2.3.1. Fracionamento do Primeiro Extrato

Inicialmente, o extrato bruto foi dissolvido em MetOH onde houve a formação de um precipitado (A), que foi separado. O sobrenadante foi particionado três vezes com diclorometano, originando, assim, a fase diclorometânica (ED) e a fase residual MetOH/água (EM). Durante as partições com diclorometano houve a formação de dois precipitados (B e C). Esses precipitados foram reunidos e fracionados em coluna *flash* utilizando sílica gel como adsorvente e diferentes gradientes de DCM/MeOH como eluente. Foram obtidas 34 frações que foram analisadas pela técnica de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) utilizando DCM/MeOH como fase móvel, sendo, posteriormente, reunidas por semelhança em 8 frações.

O resíduo MetOH/água foi particionado com butanol, originando um precipitado (D) e a fase butanólica (EB). Esta fase foi fracionada em coluna Sephadex LH-20 utilizando-se MeOH como fase móvel, de onde foram obtidas 56 frações. Estas frações foram cromatografadas por CCDC eluída com diferentes gradientes de DCM/MeOH e reunidas, por semelhança, em 12 frações. A figura 10 esquematiza o processamento do primeiro EHA de *Eudistoma vannamei* e as tabelas 4 e 5 resumem a reunião das frações obtidas de B+C e EB, respectivamente.

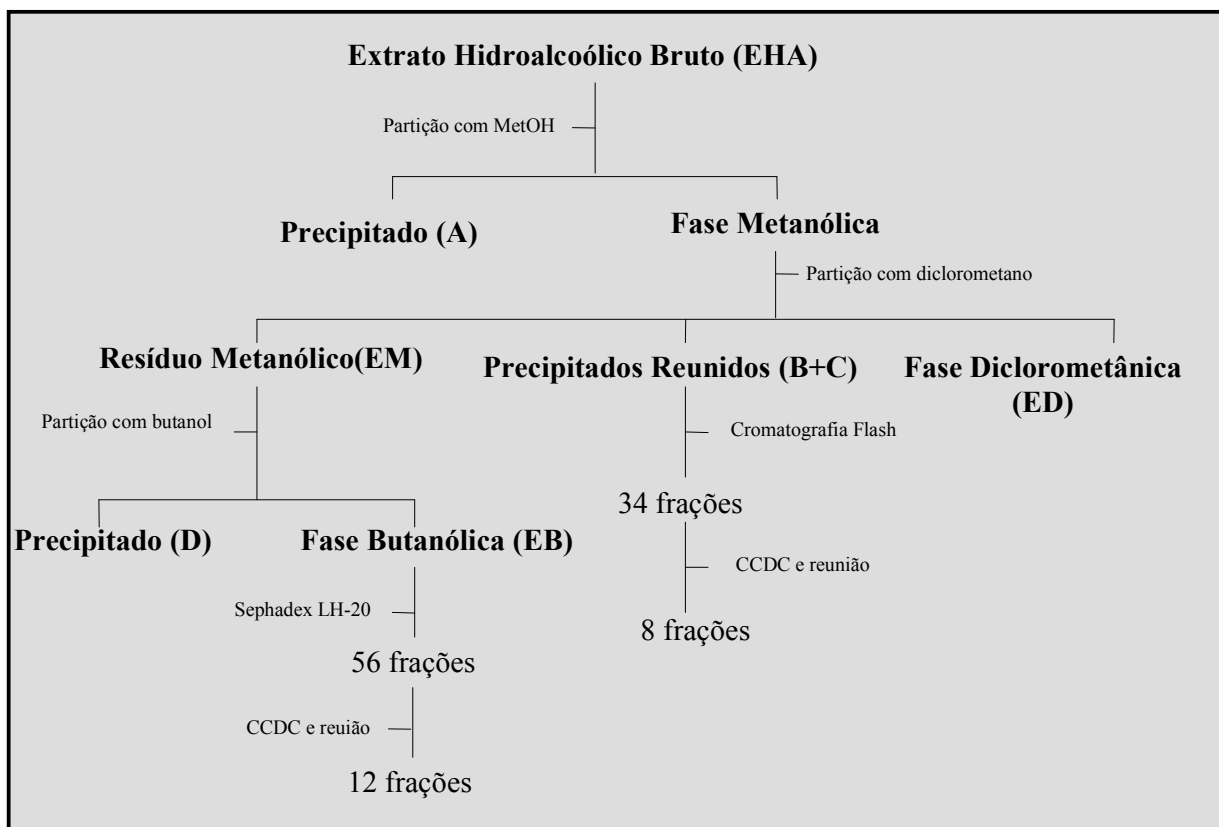


Figura 10: Processamento do primeiro extrato hidroalcoólico bruto (EHA) de *Eudistoma vannamei*.

Tabela 4: Reunião das frações obtidas de B+C

Frações Reunidas	Códigos	Frações Reunidas	Códigos
1-2	DM1	15-16	DM15
3-8	DM3	17-24	DM17
9	DM9	25-30	DM25
10-14	DM10	31-34	DM31

Tabela 5: Reunião das frações obtidas de EB

Frações Reunidas	Códigos	Frações Reunidas	Códigos
1-15	B1	35-36	B35
16-18	B16	37-40	B37
19-20	B19	41-48	B41
21-22	B21	49	B49
23-30	B23	50-52	B50
31-34	B31	53-56	B53

2.3.2. Fracionamento do Segundo Extrato

Para obter mais material para o fracionamento da fase diclorometânica, uma segunda coleta foi realizada e um novo extrato hidroalcoólico bruto foi preparado.

O extrato bruto liofilizado foi inicialmente ressuspense em água e particionado em n-hexano e acetato de etila. As fases obtidas, hexânica e acetato de etila, foram avaliadas por CCDC eluídas com diferentes gradientes de Hexano/AcOEt e DCM/Acetona. Após a análise dos cromatogramas optou-se por reunir ambas frações tendo em vista a semelhança aparente de seus constituintes majoritários. (Este procedimento foi realizado a fim de se obter maior quantidade de material para estudo). Desse modo, as frações reunidas foram ressuspensas em 100 mL de MeOH/H₂O (7:3). Esta solução foi filtrada em funil de Büchner e particionada com DCM (3 x 50 mL), obtendo-se as fases diclorometânica e hidroalcoólica residual.

O resíduo foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) preparativa e originou 15 frações, que foram, mais adiante, reunidas novamente devido à semelhança. A fase diclorometânica foi concentrada e submetida à cromatografia em coluna sílica “flash”, sob pressão, eluído com Hexano, AcOEt e MeOH em misturas de polaridade crescente. Foram coletadas 102 frações e a técnica de CCDC foi empregada a fim de analisar e posteriormente reunir as frações semelhantes. Ao final, foram obtidas 20 frações. A figura 11 esquematiza o processamento do segundo extrato bruto hidroalcoólico (EHA) de *Eudistoma vannamei* e a tabela 6 resume a reunião das frações.

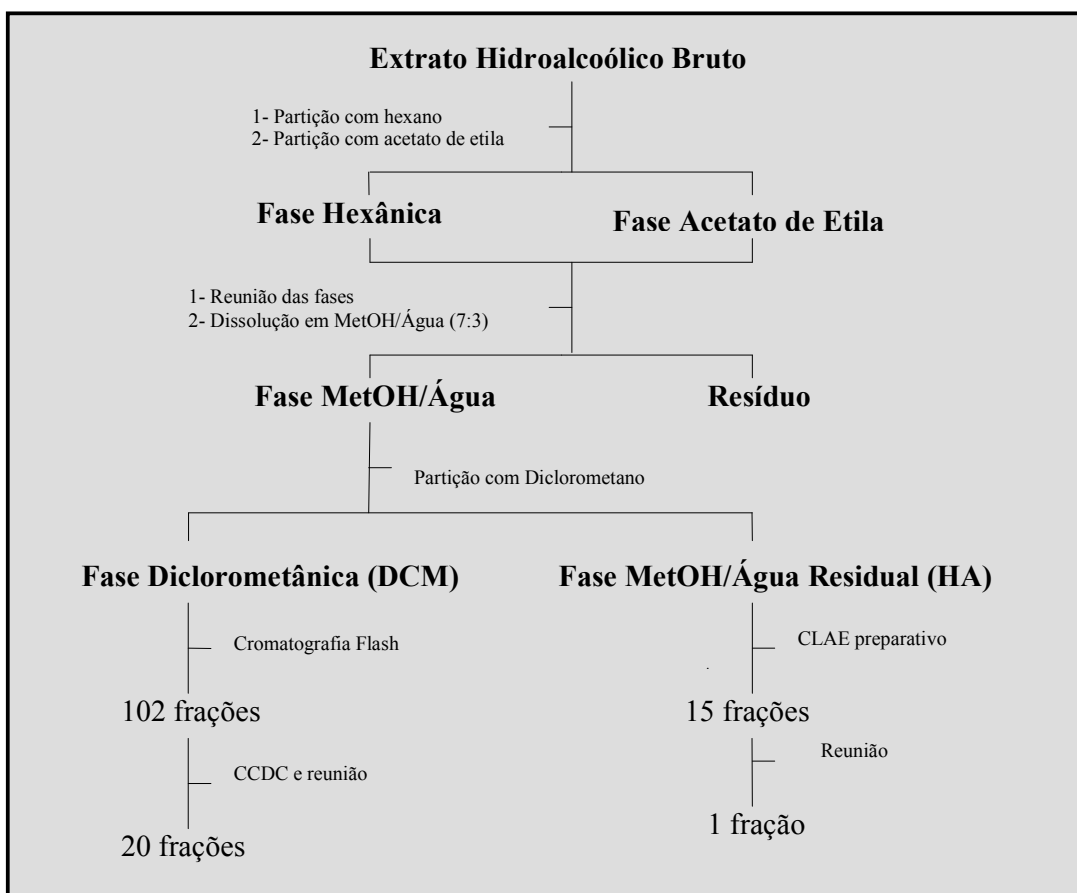


Figura 11: Processamento do segundo extrato hidroalcoólico (EHA) bruto de *Eudistoma vannamei*.

Tabela 6: Reunião das frações obtidas de DCM

Frações Reunidas	Códigos	Frações Reunidas	Códigos
1-2	DCM -1	41-44	DCM-11
3	DCM -2	45-48	DCM -12
4	DCM -3	49-54	DCM -13
5	DCM -4	55-61	DCM -14
6-7	DCM -5	62-64	DCM -15
8-13	DCM -6	65-76	DCM -16
14	DCM -7	78-81	DCM -17
15-16	DCM -8	82-84	DCM -18
17-35	DCM -9	85-94	DCM -19
36-37	DCM -10	95-102	DCM -20

2.3.3. Fracionamento do Terceiro Extrato

Para se obter mais material para o fracionamento da fase diclorometânica, uma terceira coleta de material foi realizada e um novo extrato hidroalcoólico bruto foi preparado. O extrato foi ressuspendido em 1 L de MeOH/H₂O (7:3) e filtrado em funil de Büchner. O filtrado foi fracionado por partição líquido-líquido com diclorometano (4x500 mL), obtendo-se a fase diclorometânica e uma fase hidroalcoólica residual.

A fase diclorometânica foi concentrada e submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 60, eluída com hexano, EtOH e MeOH em misturas de polaridade crescente (como na eluição do segundo extrato). Foram coletadas 725 frações e a técnica de CCDC foi empregada para analisar e, posteriormente, reunir as frações semelhantes. Ao final, foram obtidas 18 frações. A figura 12 esquematiza o processamento do terceiro extrato bruto hidroalcoólico de *Eudistoma vannamei* e a tabela 7 resume a reunião das frações.

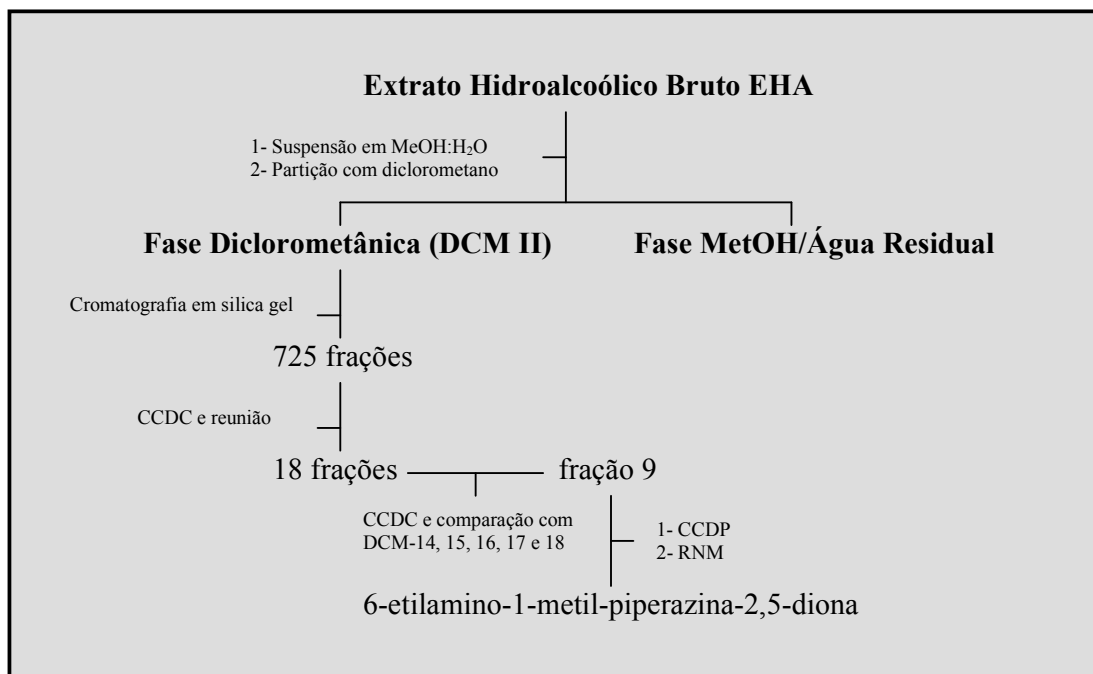


Figura 12 - Processamento do terceiro extrato hidroalcoólico (EHA) bruto de *Eudistoma vannamei*.

Tabela 7: Reunião das frações obtidas de DCM II.

Frações Reunidas	Códigos	Frações Reunidas	Códigos
320 – 348	Fr 03	84 – 123	Fr 23
349 – 384	Fr 06	124 – 199	Fr 26
385 – 507	Fr 09	508 – 590	Fr 27
200 – 263	Fr 14	591 – 627	Fr 31
264 – 286	Fr 15	628 – 649	Fr 32
287 – 319	Fr 16	650 – 665	Fr 33
1 – 5	Fr 18	666 – 692	Fr 34
6 – 24	Fr 19	693 – 725	Fr 35
25 - 83	Fr 21	Lavagem final	Fr 36

2.3.4. Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Esse procedimento foi adotado para a comparação e reunião das frações obtidas do fracionamento de cada extrato bruto. Foram utilizadas placas de vidro (20 x 20; 20 x 10 e 20 x 5 cm) recobertas com uma fina camada (0,25 mm) de sílica gel GF₂₅₄, ativadas em estufa por 30 min a 110°C. As amostras foram aplicadas e, após o desenvolvimento da corrida, as placas foram observadas sob luz ultravioleta em 254 e 366 nm e reveladas por nebulização com H₂SO₄ seguida de aquecimento em chapa quente a 110 °C por 2 min.

2.3.5. Cromatografia de Camada Delgada Preparativa (CCDP)

Essa técnica foi empregada para separar os componentes da fração Fr 09 derivada do terceiro extrato bruto. Essa fração foi escolhida por apresentar um perfil cromatográfico em CCDC semelhante às frações DCM-14 a DCM-18 obtidas do fracionamento do segundo extrato bruto. Uma placa de vidro (20 x 20; 20 x 10 e 20 x 5 cm) recoberta com uma grossa camada de sílica gel GF₂₅₄, ativada em estufa por 30 min a 110°C. A fração foi aplicada a aproximadamente 2,5 cm da base e eluída 3 vezes com AcOEt:DCM. As bandas separadas foram extraídas da sílica com DCM e o solvente foi evaporado.

A análise estrutural das frações foi realizada a partir dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de próton (RMN ^1H), obtidos na frequência de 300 MHz.

2.4. Avaliação da Toxicidade dos Extratos Brutos

2.4.1. Toxicidade aguda em larvas de *Artemia salina*

O gênero *Artemia* é classificado como pertencente ao Filo Artropoda, Subfilo Crustacea, Classe Branchiopoda (Rupert & Barnes, 1996). Possui o desenvolvimento indireto, com capacidade de encistamento. Os náupilos (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 náupilos começam a se alimentar de matéria orgânica em suspensão, através da ingestão contínua da água circundante. Sendo os náupilos mais sensíveis nesse estágio, os mesmos são utilizados nos testes de toxicidade. É uma metodologia simples que permite a avaliação da toxicidade de extratos brutos, frações ou substâncias puras provenientes de produtos naturais.

2.4.1.1. Procedimento Experimental

Para a obtenção dos organismos teste, cistos de *Artemia salina* foram mantidos por 24 h em um béquer com água do mar filtrada, sob aeração suave e iluminação intensa, até a eclosão do indivíduo, neste momento, em estágio de náupilo I. Essas larvas foram separadas em um segundo béquer e mantidas ali por mais 24 h para atingirem o estágio de náupilo II. Os náupilos II foram incubados em número de 10 por poço, em placas de 24 cavidades, tendo sido acrescentadas as substâncias testes em 6 diferentes diluições, variando de 31,5 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, tendo sido realizadas triplicatas para cada concentração. Como controle negativo, foi utilizada

água do mar filtrada duas vezes, tendo sido este, também, o veículo de diluição das amostras. As placas foram incubadas a temperatura ambiente, durante 24 h. Após esse tempo, foram contados os indivíduos vivos e mortos correspondentes a cada poço (como descrito em Jimenez *et al.*, 2003).

2.4.1.2. Análise dos Dados

O cálculo da dose que causou letalidade de 50% dos náuplios (DL₅₀) foi obtido pelo método dos probitos (Litchfield & Wilcoxon 1949).

2.4.2. Potencial antimitótico em ovos de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*

O ouriço-do-mar pertence ao Filo Echinodermata, Classe Echinoidea, Subclasse Euechinoidea, por (Rupert & Barnes, 1996). A espécie *Lytechinus variegatus* é facilmente mantida em laboratório e foi selecionada para a utilização em testes de toxicidade por apresentar-se fértil o ano todo e possuir ovos pouco pigmentados, viabilizando, assim, a execução de ensaios com seus gametas. Os óvulos apresentam uma coloração alaranjada enquanto que os espermatozoides apresentam-se esbranquiçados. A membrana de fecundação dos ovos é facilmente visualizada assim como as várias fases da embriogênese. O uso deste modelo permite avaliar o efeito inibitório em diferentes níveis do processo mitótico, instigando, inclusive, sobre o mecanismo de ação das substâncias.

2.4.2.1. Procedimento Experimental

A eliminação dos gametas foi induzida pela injeção de KCl 0,5M na cavidade celômica dos animais. Após a eliminação, os óvulos foram lavados em uma proveta com água do mar filtrada, por 3 vezes, para remoção da camada gelatinosa. Os espermatozoides concentrados foram mantidos em baixa temperatura até o momento do uso. Após a última lavagem, os óvulos foram ressuspensos em 50 mL de água do mar filtrada e fecundação realizada pela adição de 1 mL da suspensão de espermatozoides (0,05 mL da suspensão concentrada + 2,45 mL de água do mar filtrada) à 50 mL suspensão de óvulos. Após cerca de dois min, a fecundação foi

confirmada pela presença da membrana da fecundação, através da observação de uma amostra das células ao microscópio. 1 mL de ovos foram distribuídos numa multiplaca com 24 cavidades, contendo a substância teste e incubados num volume final de 2 mL, mantidos à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) sob agitação constante. Foram fixadas alíquotas de 0,2mL em formalina 10%, aproximadamente 1h e 3h30min após a fecundação, intervalos correspondentes às fases da primeira divisão e blástula, respectivamente. Cem ovos foram contadas em cada amostra para obtenção da percentagem de células normais (como descrito em Jimenez *et al.*, 2003).

2.4.2.2. Análise dos Dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n experimentos. O cálculo da CI_{50} (concentração inibitória que causa 50% do efeito máximo) e seu respectivo intervalo de confiança (IC) 95% foi realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software).

2.4.3. Avaliação do Potencial Hemolítico

Esta metodologia permite avaliar o potencial da substância teste em causar danos na membrana celular, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

2.4.3.1. Procedimento Experimental

O sangue foi coletado de camundongos (*Mus musculus*, Swiss) pela via orbital e diluído em solução salina para hemólise. Os eritrócitos foram lavados 2 vezes para a redução da contaminação plasmática (centrifugação a 5000 rpm/ 3 min) e resuspensos nessa mesma solução afim de se obter uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Este procedimento foi realizado em multiplaca de 96 poços. Cada poço da 1ª fila recebeu 100 μL de solução salina (controle negativo). Na 2ª, os poços receberam 50 μL da solução salina e 50 μL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, água destilada. Aos poços da 3ª fila foi adicionado 100 μL de solução salina e 100 μL da substância teste em solução. Da 4ª fila em diante os poços receberam 100 μL da

solução salina, excetuando-se os da última, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X-100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações fossem diluídas pela metade. Em seguida, 100 µL da SE 2% foi adicionada a cada poço. Após 1 h de incubação sob agitação constante e à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$), as placas foram centrifugadas (5000 rpm/ 3min) e o sobrenadante transferido para outra placa para leitura da absorbância a 540 nm. O efeito da substância foi determinado de maneira relativa aos controles positivo e negativo (como descrito em Jimenez *et al.*, 2003).

2.4.3.2. Análise dos Dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de *n* experimentos. O cálculo da CE_{50} e seu respectivo intervalo de confiança (IC) 95 % foi realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software).

2.5. Teste de Citotoxicidade *in vitro* - Ensaio do MTT

2.5.1. Linhagens Celulares Utilizadas

As linhagens celulares utilizadas para avaliação da atividade citotóxica foram obtidas pelo Children's Mercy Hospital de Kansas City – EUA e estão listadas quanto à origem e tipo histológico na tabela 8.

Tabela 8: Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Linhagem	Tipo Histológico	Origem
CEM	leucemia linfocítica	humano
HL-60	leucemia promielocítica	humano
HCT-8	carcinoma de cólon	humano
MCF-7	carcinoma de mama	humano
B16	Melanoma	murino

2.5.2. Manutenção das Células

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (75cm², volume de 250mL); foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 complementando com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, tendo sido observado o crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 h, quando necessário as células eram repicadas em meio de cultura novo, numa concentração de 0,5-1,0 x 10⁶ células/mL (Butler & Dawson, 1992).

2.5.3. Ensaio do MTT

Este ensaio pode ser utilizado para determinar citotoxicidade, proliferação e ativação celular. É uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromida (MTT), um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias ativas das células vivas (Mosmann, 1983). No presente trabalho, este ensaio foi utilizado para monitoramento da atividade das frações e seleção das mais ativas assim como para quantificar suas atividades em diferentes linhagens celulares.

2.5.3.1. Procedimento Experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram plaqueadas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de 0,3 x 10⁶ células/mL, para células suspensas e 1 x 10⁵ células/mL para células aderidas. As substâncias testes foram incubadas durante 24 (em alguns casos) e 72 h juntamente com a suspensão de células. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200µL da solução de MTT a 0,5 mg/mL, tendo sido reincubada por mais 3 h, em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10min), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi resuspendido em 150µL 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.

2.5.3.2. Análise dos Dados

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. No caso das frações ensaiadas em triplicatas de dose única (5µg/mL), o valor da absorbância encontrado foi transformado em porcentagem, relativo ao controle. No caso das frações testadas em diluições em série, foi plotado o gráfico absorbância x concentração e determinado as 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 no programa GraphPad Prism.

2.6. Análise dos Efeitos Celulares em HL-60 – Determinação do Mecanismo de Ação

Para os experimentos de determinação do mecanismo de ação das frações selecionadas foram utilizadas as células leucêmicas da linhagem HL-60 plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL e avaliadas quanto a diversos efeitos celulares. As células foram tratadas com duas concentrações diferentes de cada amostra, 0,1 µg/mL e 1,0 µg/mL, e incubadas por 24h. A doxorubicina na concentração de 0,3ug/mL foi usada como controle positivo em todos os experimentos.

2.6.1. Viabilidade Celular – Exclusão por Azul de Tripán

Este ensaio permite determinar a relação entre células viáveis e não-viáveis e a quantidade total de células. O corante azul de tripan possibilita a distinção individual das células viáveis das não-viáveis visto que o corante penetra apenas a membrana das células metabolicamente inviáveis.

2.6.1.1. Procedimento Experimental

A uma alíquota de 90 μL da suspensão celular foi adicionado 10 μL de azul de tripan. Após 10 min de espera, uma alíquota de aproximadamente 10 μl da solução foi transferida para uma câmara de Neubauer e as células de dois quadrante diagonalmente opostos foram contadas diferenciando-se as viáveis das não-viáveis (azuis) (como descrito em Veras *et al.*, 2004).

2.6.1.2. Análise dos Dados

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

2.6.2. 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, dessas culturas tratadas permite avaliar a ação citotóxica temporal da droga em estudo assim como o acompanhamento das alterações morfológicas das células a medida que vão acontecendo.

2.6.2.1. Procedimento Experimental

Inicialmente, as células foram plaqueadas e incubadas com as drogas teste. Nos intervalos programados de 0h, 6h, 12h, 18h, 24h, 30h, 36h, 42h, 48h, 54h, 60h, 66h e 72h após o plaqueamento, uma alíquota de cada amostra foi retirada e as células coradas com azul de tripan para contagem na câmara de Neubauer.

2.6.2.2. Análise dos Dados

O valor obtido para cada contagem foi plotado em um gráfico e construída uma curva com as variáveis: número de células x tempo, para a observação da cinética de crescimento das células controle e tratadas. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as curvas, as respectivas inclinações foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls, com nível de significância de 5%.

2.6.3. Inibição da Síntese de DNA – Incorporação de BrDU

A bromodeoxiuridina (BrDU) é uma base nitrogenada análoga à timidina que é incorporada ao DNA das células em proliferação. A detecção do BrDU é realizada por técnicas de imuno-histoquímica, onde se ligam anticorpos monoclonais e um cromógeno específico, a diaminobenzidina (DAB), que vai conferir uma coloração marrom ao núcleo das células que incorporaram a BrDU. Este ensaio permite avaliar o efeito da droga-teste sobre a síntese de DNA.

2.6.3.1. Procedimento Experimental

Três horas antes do término do período de incubação das células, 20 µL de uma solução contendo a BrDU na concentração de 0,1 µM foi adicionado à suspensão de células. Passadas as três horas, lâminas para cada amostra foram preparadas em citocentrífuga, deixadas secar por aproximadamente duas h e fixadas em solução de MetOH:ácido acético (7:1,5) por 5 min. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 min a 70 °C e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram circulares com caneta hidrofóbica e incubadas com o anticorpo primário *overnight* em câmara úmida. As células foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado por 20 min e, em seguida, com a solução de streptavidina-fluoresceína por mais 20 min, sempre em câmara úmida. Foi adicionado o cromógeno DAB por 1-5 min e, em seguida, removido com água destilada. A contra-coloração das células foi realizada com hematoxilina de Hanks a 0,1% (como descrito em Veras *et al.*, 2004).

2.6.3.2. Análise dos Dados

Duzentas células de cada amostra foram contadas, diferenciando as marcadas (núcleo marrom) das não-marcadas (núcleo lilás), para a quantificação percentual de cada evento. A proporção entre células marcadas e não-marcadas entre os diferentes grupos foi comparada pelo teste χ^2 com nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

2.6.4. Análise Morfológica – Coloração Diferencial por Hematoxilina/Eosina

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 das células tratadas permite identificar alterações que possam estar ocorrendo e fornecer subsídios para sugerir o mecanismo de ação da droga. A hematoxilina é um corante basofílico que tem afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo numa cor lilás. A eosina, ao contrário, liga-se ao citoplasma conferindo-lhe uma coloração rósea (como descrito em Veras *et al.*, 2004).

2.6.4.1. Procedimento Experimental

Lâminas das células controle e tratadas com cada uma das frações foram preparadas em citocentrífuga, deixadas secar por aproximadamente duas h e fixadas com EtOH 100% por cerca de 5 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS para remoção do fixador e coradas, inicialmente, com hematoxilina 0,1% por 1 min. Após a lavagem com água destilada, as lâminas foram imersas em eosina 0,5% por mais 1 min e visualizadas ao microscópio. Para garantir a preservação do material, as lâminas foram desidratadas com gradientes crescentes de EtOH:xilol, até xilol 100%. Uma gota de bálsamo do Canadá foi pingada em cada lâmina e virada sobre uma lamínula, deixando essa montagem secar por 24 h.

2.6.4.2. Análise dos Dados

As células tratadas foram levadas ao microscópio para a avaliação de suas características morfológicas e comparadas às células controle (não-tratadas). Mais adiante, as células foram fotografadas para o registro das alterações observadas.

2.6.5. Externalização da Fosfatidil-serina – Anexina V

Ao entrar em apoptose, mecanismo intrínseco da célula de induzir sua morte programada, a externalização do fosfolípido de membrana, fosfatidilserina, é um dos primeiros eventos celulares a ocorrer. Este ensaio permite diferenciar células apoptóticas das necróticas pela coloração diferencial por fluorescência. A detecção das células apoptóticas é feita pela ligação da anexina V conjugada a estreptavidina (emitem fluorescência cor verde) com a fosfatidilserina externalizada. Células necróticas são coradas pelo iodeto de propídeo (emitem fluorescência de cor vermelha) que penetra as membranas celulares desintegradas e aderem ao núcleo. Células positivas para os dois corantes deve ser considerada como necróticas.

2.6.5.1. Procedimento Experimental

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 lavadas duas vezes com tampão fosfato (50 mM) . Em seguida, 100 µL da solução diluída de anexina – PI foram adicionados à suspensão de células e incubados por 60 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas por duas vezes com tampão de incubação e incubadas com 100 µL da solução de estreptavidina – fluoresceína por 60 min a 4 °C. As células foram lavadas por mais duas vezes com tampão fosfato e levadas ao microscópio de fluorescência para visualização. As células sofrendo apoptose emitem fluorescência verde, enquanto que aquelas em processo necrótico emitem fluorescência vermelha (como descrito em Vermes *et al.*, 1995).

2.6.5.2. Análise dos Dados

Para cada amostra, foram atribuídos escores entre 0 e 4 para apoptose e para necrose baseado com os perfis observados para os controles positivo (não tratadas) e negativo (doxorubicina 0,3 µg/mL).

2.6.6. Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Acridina Laranja

Este ensaio permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose pela coloração diferencial por fluorescência. A detecção das células apoptóticas é feita pela incorporação do corante acridina laranja (AL) na célula e expulsão do brometo de etídeo (BE), conferindo à célula uma coloração verde. Células necróticas são coradas pelo brometo de etídeo (adquirem cor vermelha) que penetra as membranas celulares desintegradas e aderem ao núcleo. As células viáveis são coradas apenas pelo corante AL, emitindo, portanto, uma fluorescência verde, visto que suas membranas permanecem íntegras e não permitem a penetração de BE.

2.6.6.1. Procedimento Experimental

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 ressuspendidas em 20 µL de tampão fosfato. Em seguida, 1 µL da solução de BE/AL foi adicionado a cada tubo e as células foram levadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares (como descrito em Geng *et al.*, 2003).

2.6.6.2. Análise dos Dados

Foram contadas 100 células em 3 campos de cada amostra para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas) e montadas lâminas que foram fotografadas para o registro visual dos efeitos.

RESULTADOS

1. Ensaio com os Extratos Hidroalcoólicos Brutos das Ascídias – Seleção da Espécie

1.1. Toxicidade Aguda em *Artemia salina*

No teste de toxicidade aguda em larvas de *Artemia salina* os extratos de *Eudistoma vannamei* e *Euherdmania sp.* apresentaram os maiores valores para a dose letal média (DL₅₀) de 34,7 e 77,8 µg/mL, respectivamente. Os extratos do holozoídeo e de *Polysyncrator sp.* apresentaram moderada toxicidade com valores de DL₅₀ correspondentes a 430,5 e 562,3 µg/mL, respectivamente. Os demais extratos não apresentaram toxicidade significativa mesmo na maior concentração testada (1,0 mg/mL). Os resultados estão expressos na tabela 9.

Tabela 9: Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos de ascídias em larvas de *Artemia salina*.

Espécie	DL ₅₀ (µg/mL)	Espécie	DL ₅₀ (µg/mL)
<i>Didemnum ligulum</i>	> 1000	<i>Cystodytes dellechiajei</i>	> 1000
<i>Didemnum psammatodes</i>	> 1000	<i>Eudistoma vannamei</i>	34.7 (8.7)
<i>Didemnum sp.</i>	> 1000	<i>Eudistoma sp.</i>	> 1000
<i>Polysyncrator sp.</i>	562.3 (219.2)	<i>Euherdmania sp.</i>	77.8 (10.7)
<i>Trididemnum sp.</i>	> 1000	Gen. n. (Holozoidae)	430.5 (81.5)

1.2. Potencial Antimitótico em Ovos de Ouriço do Mar

Esse ensaio avaliou o potencial antimitótico dos EHA das ascídias (tabela 10). Para este ensaio, foram considerados ativos aqueles extratos que apresentaram CI_{50} menor que 500 $\mu\text{g/mL}$. O extrato de *D. psammotodes* apresentou elevado potencial antimitótico com o CI_{50} de 120,1 e 140,9 $\mu\text{g/mL}$ para os estágios de 1ª divisão e blástula, respectivamente, sendo o extrato mais ativo nesta preparação. O extrato de *Polysyncraton sp.* apresentou uma CI_{50} de 231,8 e 198,7 $\mu\text{g/mL}$ para os estágios de 1ª divisão e blástula, respectivamente. Já o extrato de *E. vancouverensis* apresentou uma alta inibição dos ovos em blástula ($CI_{50} = 74,8 \mu\text{g/mL}$) sendo apenas moderada a inibição da 1ª. divisão ($CI_{50} = 349,9 \mu\text{g/mL}$). O extrato de *Euherdmania sp.* comportou-se de modo semelhante, inibindo moderadamente a fase de blástula ($CI_{50} = 283,5 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 10: Atividade antimitótica dos extratos hidroalcoólicos brutos das ascídias em ovos do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.

Espécie	Estágio Embrionário	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Espécie	Estágio Embrionário	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Didemnum ligulum</i>	1ª Divisão	> 500	<i>Cystodytes dellechiajei</i>	1ª Divisão	> 500
	Blástula	> 500		Blástula	> 500
<i>Didemnum psammotodes</i>	1ª Divisão	120.1 120.0–120.1	<i>Eudistoma vancouverensis</i>	1ª Divisão	349.9 312.3–392.0
	Blástula	140.9 140.9–141.2		Blástula	74.8 66.5–84.1
<i>Didemnum sp.</i>	1ª Divisão	> 500	<i>Eudistoma sp.</i>	1ª Divisão	> 500.0
	Blástula	> 500		Blástula	> 500.0
<i>Polysyncraton sp.</i>	1ª Divisão	231.8 111.0–484.2	<i>Euherdmania sp.</i>	1ª Divisão	> 500.0
	Blástula	198.7 181.0–218.3		Blástula	283.5 177.7–352.1
<i>Trididemnum sp.</i>	1ª Divisão	> 500	Gen. n. (Holozoidae)	1ª Divisão	> 500.0
	Blástula	> 500		Blástula	> 500.0

1.3. Atividade Hemolítica

O efeito hemolítico dos EHA das ascídias foi avaliado em hemácias de camundongo *Mus musculus* (tabela 11). O holozoídeo foi o mais ativo neste ensaio, (CI_{50} = 175,2 $\mu\text{g/mL}$). *Polysyncraton sp.* e *C. dellechiajei* apresentaram uma menor atividade, sendo as respectivas CI_{50} iguais a 625,9 e 891,9 $\mu\text{g/mL}$. Para este ensaio, foram considerados ativos aqueles extratos que apresentaram $CI_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 11: Atividade hemolítica dos extratos hidroalcoólicos brutos das ascídias em hemácias de camundongo *Mus musculus*

Espécie	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Espécie	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Didemnum ligulum</i>	> 1000	<i>Cystodytes dellechiajei</i>	891,9 (572,7 – 1388,0)
<i>Didemnum psammotodes</i>	> 1000	<i>Eudistoma vannamei</i>	> 1000
<i>Didemnum sp.</i>	> 1000	<i>Eudistoma sp.</i>	> 1000
<i>Polysyncraton sp.</i>	625,9 (463,4 – 845,4)	<i>Euherdmania sp.</i>	> 1000
<i>Trididemnum sp.</i>	> 1000	Gen. n. (Holozoidae)	175,2 (87,6 – 350,1)

1.4. Inibição da Proliferação de Células Tumorais *in vitro* – Ensaio do MTT

O potencial citotóxico dos EHA brutos das ascídias foi avaliado em células de linhagens tumorais humanas pelo método do MTT. O extrato de *E. vannamei* apresentou alta citotoxicidade em todas as linhagens testadas, sendo a $CI_{50} > 2,0$ em células CEM e igual a 11,7, 14,3 e 23,8 $\mu\text{g/mL}$ nas linhagens HL-60, HCT-8 e B16, respectivamente. O extrato de *Euherdmania sp.* apresentou moderada citotoxicidade, com os valores de CI_{50} variando entre 25 e 53 $\mu\text{g/mL}$. Os extratos de *C. dellechiajei* e *Trididemnum sp.* apresentaram-se tóxicos apenas para as células da linhagem CEM (CI_{50} = 24 e 16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Já o extrato de *D. ligulum* mostrou

toxicidade seletiva para a linhagem HCT-8 ($CI_{50} = 35,3 \mu\text{g/mL}$). Para este ensaio, foram considerados ativos aqueles extratos que apresentaram $CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 12: Atividade antiproliferativa em células tumorais *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos brutos das ascídias avaliado pelo método do MTT.

Espécie	Linhagem Celular	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Espécie	Linhagem Celular	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Didemnum ligulum</i>	CEM	> 100	<i>Cystodytes dellechiajei</i>	CEM	23.9 14.5 – 39.4
	HL-60	> 100		HL-60	> 100
	B-16	> 100		B-16	> 100
	HCT-8	35.3 18.1 – 68.9		HCT-8	> 100
<i>Didemnum psammatoles</i>	CEM	> 100	<i>Eudistoma vancouveri</i>	CEM	< 2.0
	HL-60	> 100		HL-60	11.2 8.9-14.0
	B-16	> 100		B-16	23.8 15.4 – 24.3
	HCT-8	> 100		HCT-8	14.2 8.4 – 24.3
<i>Didemnum</i> sp.	CEM	> 100	<i>Eudistoma</i> sp.	CEM	> 100.0
	HL-60	> 100		HL-60	> 100.0
	B-16	> 100		B-16	> 100.0
	HCT-8	> 100		HCT-8	> 100.0
<i>Polysyncrator</i> sp.	CEM	> 100	<i>Euherdmania</i> sp.	CEM	24.3 20.0 – 29.6
	HL-60	> 100		HL-60	53.0 48.6 – 57.8
	B-16	> 100		B-16	33.8 22.0 – 52.0
	HCT-8	> 100		HCT-8	48.9 41.3 – 58.0
<i>Trididemnum</i> sp.	CEM	> 100	Gen. N. (Holozoidae)	CEM	> 100.0
	HL-60	> 100		HL-60	> 100.0
	B-16	> 100		B-16	> 100.0
	HCT-8	> 100		HCT-8	> 100.0

A tabela 13 mostra um resumo das atividades encontradas nos extratos hidroalcoólico bruto das ascídias.

Tabela 13: Quadro-resumo das atividades tóxicas apresentadas pelo extrato bruto de cada espécie de ascídia estudada nos ensaios de toxicidade iniciais*.

Espécie	Toxicidade Aguda em <i>Artemia salina</i>	Atividade Antimitótica em Ovos de Ouriço do Mar	Potencial Hemolítico	Atividade Antiproliferativa em Células Tumorais
<i>Didemnum ligulum</i>	-	-	-	-
<i>Didemnum psammatoedes</i>	-	+++	-	-
<i>Didemnum</i> sp.	-	-	-	-
<i>Polysyncratoron</i> sp.	+	++	+	-
<i>Trididemnum</i> sp.	-	-	-	-
<i>Cystodytes dellechiajei</i>	-	-	-	-
<i>Eudistoma vannamei</i>	+++	+++	-	+++
<i>Eudistoma</i> sp.	-	-	-	-
<i>Euherdmania</i> sp.	+++	+	-	+++
Gen. n. (Holozooidae)	+	-	++	-

* o símbolo + indica a intensidade da atividade observada e – a não observação da atividade avaliada.

2. Fracionamento Bioguiado do Extrato Hidroalcoólico de *E. vannamei*

As amostras obtidas do fracionamento do primeiro extrato hidroalcoólico bruto de *E. vannamei* foram avaliadas quanto à sua citotoxicidade pelo teste do MTT, em concentração única - 100 µg/mL para os particionados e precipitados e 50 µg/mL para as frações - nas células HL-60 e HCT-8, sendo selecionadas para prosseguir em estudo aquelas que inibiram a proliferação das células em no mínimo 50%. Os particionados ED e EB, junto com as frações DM1 e DM3 e B21, inibiram completamente a proliferação das células (tabela 14). Em seguida, foram obtidas as

CI₅₀ para essas amostras em cinco linhagens de células tumorais (tabela 15). Essa análise demonstrou que a fase diclorometânica (ED) foi a mais ativa. Desta maneira, optou-se pela preparação de um segundo extrato para obtenção de mais material e dar prosseguimento aos estudos químicos. As frações obtidas do segundo extrato foram inicialmente testadas em concentração única - 10 µg/mL para os particionados e 5 µg/mL para as frações. Esta análise demonstrou que a fase diclorometânica (DCM) junto com as frações DCM-14 a DCM-18 foram as mais ativas e o cálculo das CI₅₀ nas diferentes linhagens tumorais confirmou este resultado (tabela 15, em destaque).

Tabela 14: Amostras ativas, em destaque, avaliadas, em concentração única, pelo ensaio do MTT.

ED	DM1	DM31	B35	DCM	DCM -7	DCM -14
A	DM3	B1	B37	DCM -1	DCM -8	DCM -15
EM	DM9	B16	B41	DCM -2	DCM -9	DCM -16
B	DM10	B19	B49	DCM -3	DCM -10	DCM -17
C	DM15	B21	B50	DCM -4	DCM-11	DCM -18
EB	DM17	B23	B53	DCM -5	DCM -12	DCM -19
D	DM25	B31	HA	DCM -6	DCM -13	DCM -20

Tabela 15: Atividade antiproliferativa em células tumorais *in vitro* das amostras obtidas do fracionamento do EHA de *Eudistoma vannamei* avaliado pelo método do MTT. Em destaque, amostras selecionadas para prosseguir em estudo.

Amostra	CEM	HL-60	HCT-8	MCF-7	B-16
ED	0,757 (0,397 – 1,443)	0,855 (0,753 – 0,970)	0,929 (0,626 – 1,380)	1,003 (0,419 – 2,397)	1,635 (-----)
A	59,777 (-----)	19,40 (-----)	5,404 (1,49 – 19,59)	9,499 (4,25 – 21,23)	24,56 (-----)
B	83,57 (-----)	50,60 (-----)	27,150 (21,60 -34,13)	37,330 (29,98 – 51,65)	53,100 (46,54 – 60,60)
EB	23,780 (20,59 – 27,46)	17,120 (15,08 – 19,43)	8,338 (6,42 – 10,96)	14,850 (13,40 – 16,47)	20,17 (10,46 – 38,89)
DM-1	4,624 (3,714 – 5,757)	5,178 (4,520 – 5,933)	7,227 (6,724 – 7.747)	7,805 (7,064 – 8,625)	18,980 (15,81 – 22,78)
DM-3	3,426 (2,771 – 4,235)	2,624 (2,151 – 3,200)	5,529 (5,166 – 5,915)	3,975 (3,243 – 4,873)	15,010 (11,00 – 20,49)
DM-10	5,663 (2,01 – 15,97)	11,380 (6,33 – 20,45)	5,720 (2,985 – 10,96)	12,770 (6,637 – 24,57)	-
B-21	15,250 (5,920 – 39,26)	14,54 (5,036 – 41,98)	19,730 (10,70 – 36,40)	10,080 (5,626 – 18,05)	8,474 (-----)
B-23	10,840 (3,87 – 30,41)	26,380 (-----)	38,720 (-----)	24,570 (-----)	39,100 (-----)
DCM	0,882 (0,716 – 1,087)	0,810 (0,559 – 1,173)	1,122 (0,829 – 1,517)	0,758 (0,650 – 0,885)	2,548 (-----)
DCM-14	0,293 (0,248 - 0,346)	0,341 (0,293 – 0,397)	0,218 (0,829 – 1,517)	0,116 (0,063 – 0,212)	0,783 (0,549 – 0,900)
DCM-15	0,324 (0,256 - 0,346)	0,268 (0,144 – 0,499)	0,352 (0,257 – 0,482)	0,339 (0,253 – 0,455)	0,736 (0,528 – 1,026)
DCM-16	< 0,078	0,104 (0,084 – 0,128)	0,103 (0,077 – 0,137)	0,113 (0,047 – 0,274)	> 5,00
DCM-17	0,179 (0,137 – 0,234)	< 0,078	0,169 (0,138 – 0,209)	0,268 (0,184 – 0,392)	0,754 (0,417 – 1,336)
DCM-18	1,522 (1,081 – 2,144)	2,482 (1,947 – 3,165)	4,445 (3,105 – 6,364)	3,970 (2,605 – 5,533)	> 5,00
Doxorrubicina	0,036 (0,028 – 0,045)	0,027 (0,022-0,033)	0,024 (0,019 – 0,030)	0,183 (0,167 – 0,201)	0,056 (0,041 – 0,076)

A análise por CCDC destas frações revelou um perfil cromatográfico semelhante entre elas, que correspondia a uma mistura de compostos, sendo que a DCM-16 apresentava-se mais purificada. Para análise da composição desta fração, foi obtido seu espectro de RMN ^1H , entretanto a quantidade de material foi insuficiente para análise. Desta maneira, um novo (terceiro) extrato foi preparado, particionado e fracionado. As frações obtidas foram analisadas por CCDC e comparadas às frações DCM-14; DCM-15; DCM-16; DCM-17 e DCM-18 obtidas do segundo extrato. A fração 9, por semelhança de perfil cromatográfico, foi selecionada para os procedimentos subseqüentes de purificação que resultaram no isolamento da base nitrogenada tímídina e de uma mistura de derivados de aminoácidos do tipo dicetopiperazina, com predomínio da 6-etilamino-1-metil-piperazina-2,5-diona [6-ethylamino-1-methyl-piperazine-2,5-dione, de acordo com as normas de nomenclatura estabelecida pela IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)] (figura 13).

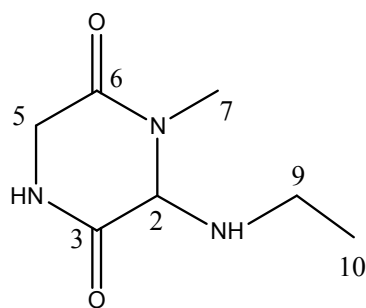


Figura 13 – Estrutura molecular da 6-etilamino-1-metil-piperazina-2,5-diona isolada de *Eudistoma vannamei*.

Tanto esta substância pura quanto a mesma conjugada à timidina foram submetidas ao ensaio do MTT nas 5 linhagens tumorais, entretanto não demonstraram atividade. Desta maneira, as 5 frações em destaque na tabela 15 acima foram selecionadas para seguir nos estudos de mecanismo de ação.

3. Análise dos Efeitos Celulares em HL-60

3.1. MTT – 24 h de incubação

A tabela 16 mostra os resultados do ensaio do MTT em células da linhagem HL-60 após 24 h de incubação com as frações ativas obtidas do extrato de *E. vannamei*. As frações DCM-16 e DCM-17 foram as mais ativas. Esses resultados mostram uma redução de atividade quando comparados aos resultados após 72 h de incubação, o que pode ser comprovada pelo aumento dos valores de CI_{50} .

Tabela 16: CI_{50} das frações avaliadas pelo método do MTT com 24h de incubação de incubação com as células HL-60. Relação CI_{50} 24h/ CI_{50} 72h.

Fração	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC 95%	CI_{50} 24h/ CI_{50} 72h
DCM-14	0,631	0,569 - 0,701	1,85
DCM-15	0,633	0,470 - 0,852	2,36
DCM-16	0,335	0,119 - 0,947	3,22
DCM-17	0,364	0,186 - 0,703	> 4,67
DCM-18	> 5,0	-	-
Doxorrubicina	0,3	0,167 – 0,532	11.11

4.1. Viabilidade Celular - Exclusão por Azul de Tripan

O ensaio de viabilidade celular de exclusão por azul de tripan permitiu a comparação do padrão de crescimento das células tratadas e não-tratadas pela contagem diferencial de células viáveis e não-viáveis para cada tratamento. As frações DCM-16 e DCM-17 reduziram de forma significativa o número de células viáveis nas duas doses testadas. As frações DCM-14 e DCM-15 foram ativas apenas na maior concentração. Apenas a fração DCM-14 (1 $\mu\text{g/mL}$) alterou significativamente a quantidade de células não-viáveis. A figura 14 mostra a contagem total de células viáveis e não-viáveis. Foram considerados significativos os valores com $p < 0,05$.

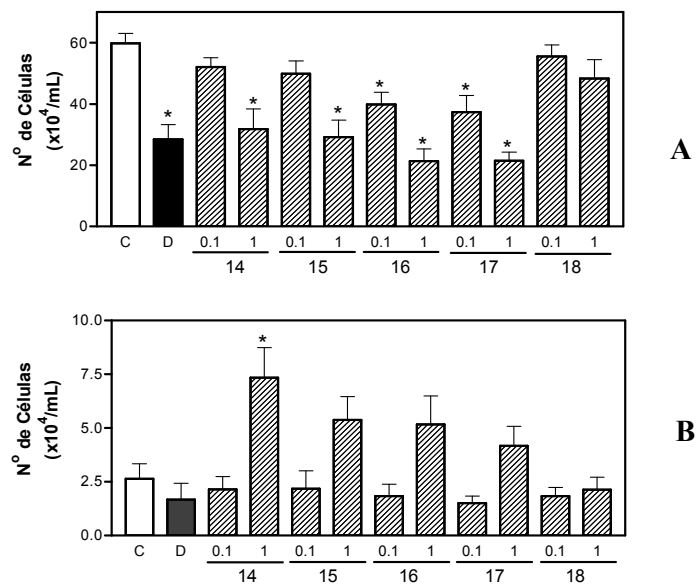


Figura 14 – Avaliação da viabilidade das células HL-60 tratadas e não tratadas pelo método de exclusão por azul de tripan: em A, contagem de células viáveis e, em B, contagem de células não-viáveis. 24h de incubação. * $p < 0,05$. C, controle negativo, sem droga e D, doxorubicina 0,3 $\mu\text{g/mL}$.

4.2. Curva de Crescimento Celular

Este ensaio avaliou a cinética de crescimento das células tratadas e não-tratadas por um período de 72 h. As frações DCM-16 e DCM-17 diminuíram a contagem de células nas duas concentrações testadas, alterando significativamente a cinética da curva, com relação à curva calculada para as células controle. As demais frações reduziram a proliferação celular apenas na maior concentração testada. A figura 16 ilustra com gráficos os resultados aqui descritos.

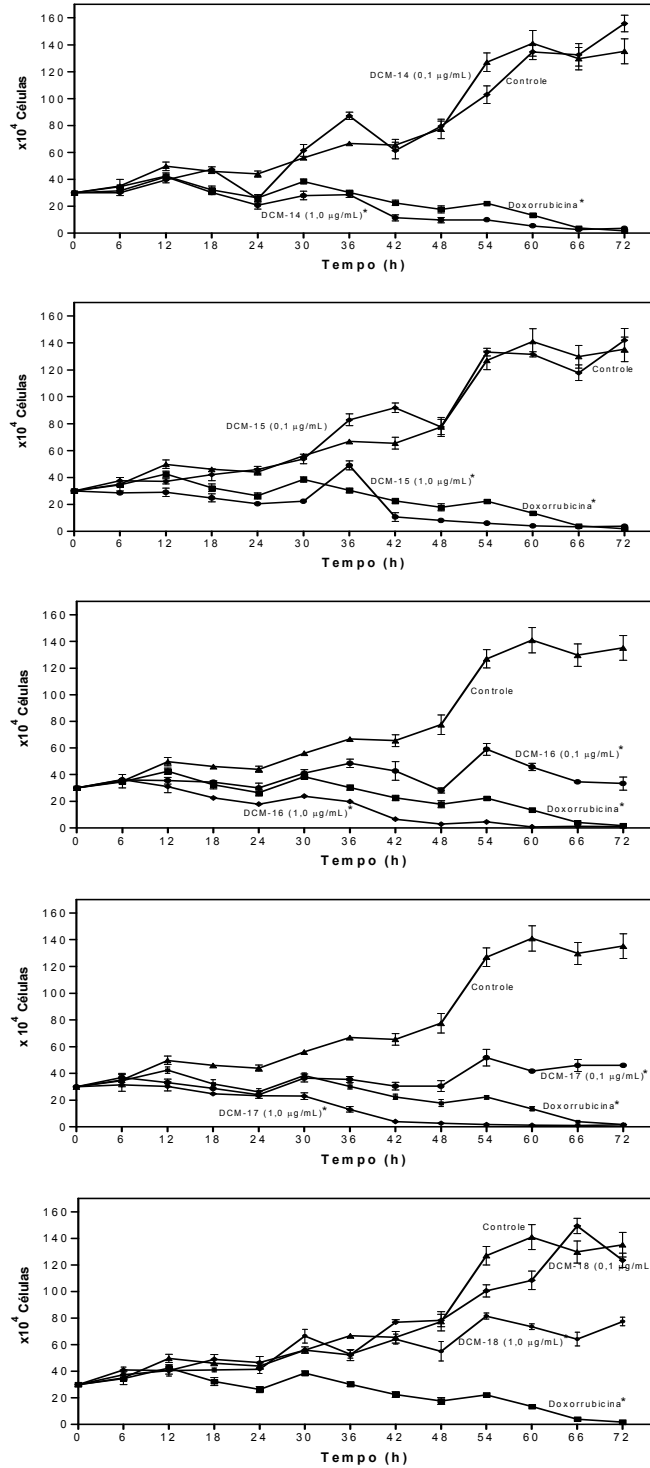


Figura 15 – Curva de crescimento das células HL-60 tratadas com cada uma das frações (0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) por 72 h. A doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo. * $p < 0,05$.

4.3. Inibição da Síntese de DNA – Incorporação de BrDU

Neste ensaio, foi avaliada a capacidade proliferativa das células tratadas em comparação às não-tratadas pela incorporação de BrdU no DNA (tabela 17). Enquanto 60% das células não-tratadas incorporaram BrdU, ou seja, duplicaram o seu DNA, apenas 4% delas incorporaram BrdU após o tratamento com doxorrubicina na concentração de 0,3 µg/mL. A fração DCM-16 foi a mais ativa neste ensaio, inibindo a incorporação de BrdU em 26% das células na concentração de 0,1 µg/mL e 100% na concentração de 1 µg/mL. As frações DCM-14 e DCM-17 apresentaram atividade antiproliferativa apenas na maior concentração testada, tendo inibido a incorporação da BrdU em 24 e 50% das células, respectivamente. As frações DCM-15 e DCM-18, nas concentrações testadas, foram inativas.

Tabela 17: Inibição da incorporação de BrdU pelas células HL-60 tratadas e não tratadas. 24h de incubação. * p < 0,05; ** p < 0,001

Amostra	Concentração	Incorporação de BrDU (%)	Tratado/Controle
Controle	-	60	1
Doxorrubicina	0,3 µg/mL	4	0,07 **
DCM-14	0,1 µg/mL	60	1
	1 µg/mL	46	0,76 *
DCM-15	0,1 µg/mL	65	~1
	1 µg/mL	66	~1
DCM-16	0,1 µg/mL	43	0,72 **
	1 µg/mL	0	0 **
DCM-17	0,1 µg/mL	65	~1
	1 µg/mL	30	0,50 **
DCM-18	0,1 µg/mL	68	~1
	1 µg/mL	68	~1

4.4 Análise Morfológica – Coloração Diferencial por H/E

As características observadas para as células tratadas com cada uma das frações estão relacionadas na tabela 18. A coloração das células não-tratadas permitiu observar que estas se apresentavam normais, com núcleos volumosos, citoplasma homogêneo e ocasionais figuras mitóticas. Já as células tratadas com doxorrubicina a 0,3 µg/mL apresentavam um volume reduzido e o núcleo fragmentado, além de fragmentação celular. A figura 17 ilustra com fotomicrografias das lâminas avaliadas.

Tabela 18: Características morfológicas das células HL-60 tratadas e não-tratadas. Coloração por H/E. 24h de incubação.

Característica Observada	Fração	
	0,1 µg/mL	1 µg/mL
Desestabilização da Membrana Plasmática	DCM-15 DCM-17 DCM-18	DCM-15 DCM-17 DCM-18
Fragmentação Nuclear	DCM-14 DCM-16	DCM-14 DCM-15 DCM-16 DCM-17
Picnoses		DCM-15
Atipias Nucleares	DCM-15 DCM-16 DCM-18	
Reduzido Volume Celular		DCM-14 DCM-16 DCM-17
Fragmentação Celular		DCM-14 DCM-15 DCM-16 DCM-17

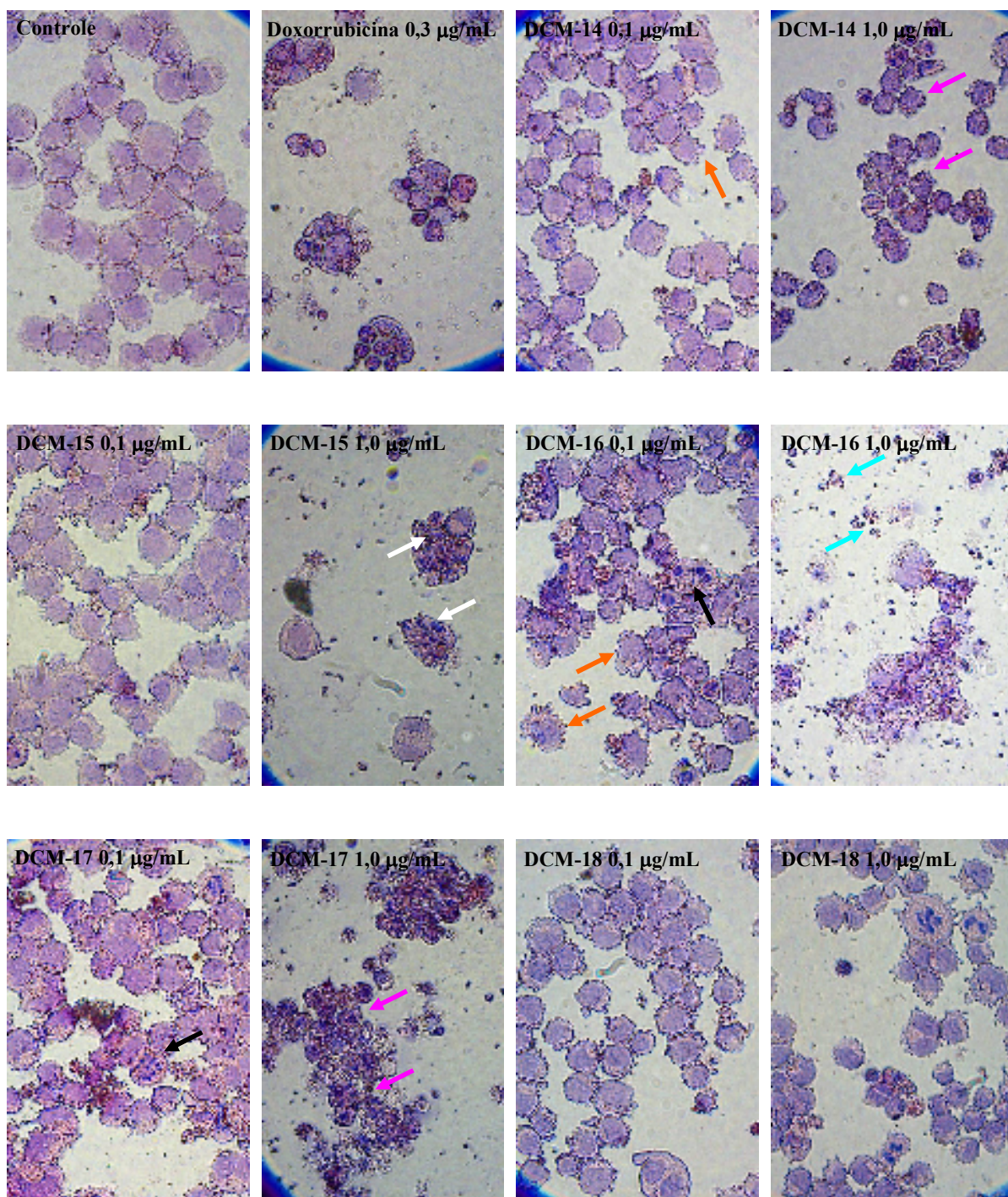


Figura 16 – Microfotografias das células HL-60 controle e tratadas com doxorubicina e cada uma das frações por 24h. Coloração por H/E –setas pretas indicam fragmentação nuclear e condensação de cromatina, as laranjas indicam desestabilização da membrana plasmática, as róseas apontam as células de volume reduzido, as brancas, as picnóticas e as setas azuis evidenciam fragmentos celulares. Aumento 400X.

4.5. Externalização da Fosfatidil-Serina – Anexina V

Neste ensaio, foram levadas em consideração as células que estavam sendo levadas à morte, seja por apoptose ou por necrose. O controle experimental apresentava ocasionais células apoptóticas e raras necróticas, enquanto que, dentre as células tratadas com doxorrubicina a 0,3 µg/mL, em comparação ao padrão observado para o controle, um maior número delas eram apoptóticas e mais acentuada era a diferença entre as células necróticas (tabela 19). As frações DCM-14, DCM-15 e DCM-16 apresentaram aproximadamente o mesmo padrão para apoptose, no entanto, a fração DCM-15 apresentou um maior número de células necróticas que as demais. Já a fração DCM-17, na concentração de 1 µg/mL, apresentou o maior número de células em apoptose e um padrão de necrose comparável à DCM-15.

Tabela 19: Avaliação de apoptose/necrose pelo método da externalização da fosfatidil-serina – anexina-V - em células HL-60 tratadas e não tratadas. 24h de incubação

Amostra	Concentração	Apoptose	Necrose
Controle	-	1	0
Doxorrubicina	0,3 µg/mL	2	3
DCM-14	0,1 µg/mL	2	0
	1 µg/mL	3	2
DCM-15	0,1 µg/mL	2	1
	1 µg/mL	3	3
DCM-16	0,1 µg/mL	2	0
	1 µg/mL	3	2
DCM-17	0,1 µg/mL	2	0
	1 µg/mL	4	3
DCM-18	0,1 µg/mL	1	0
	1 µg/mL	2	0

4.6. Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Acridina Laranja

Neste ensaio também foi avaliado o processo de indução de morte celular (tabela 20). DCM-17 foi a mais ativa para indução de apoptose, diferindo significativamente do controle em ambas as concentrações testadas. Além disso, foi a única fração que apresentou uma quantidade de necroses significativamente superior ao controle, na concentração de 1 µg/mL. As frações DCM-14, DCM-15, DCM-16 e DCM-18, apenas na maior concentração apresentaram um aumento significativo no número de células apoptóticas ao comparar-se às células não-tratadas, sendo o efeito da fração DCM-18 o menos pronunciado. A figura 18 ilustra com fotomicrografias.

Tabela 20: Avaliação da viabilidade, apoptose e necrose celular em células HL-60 tratadas e não tratadas. Coloração BE/AL. 24h de incubação. * p < 0,05; ** p < 0,001

Amostra	Concentração (µg/mL)	Células Viáveis (%)	Células Apoptóticas (%)	Células Necróticas (%)
Controle	-	92,17 (3,516)	7,33 (3,283)	0,5 (0,342)
Doxorrubicina	0,3 µg/mL	66,00 ** (6,066)	31,33 ** (6,766)	3,33 (0,954)
DCM-14	0,1 µg/mL	86,33 (2,603)	10,67 (2,011)	3,00 (0,816)
	1 µg/mL	41,67 ** (3,648)	55,17 ** (3,995)	3,17 (1,447)
DCM-15	0,1 µg/mL	82,00 (3,120)	16,00 (2,324)	2,00 (1,033)
	1 µg/mL	51,00 ** (1,342)	44,50 ** (2,012)	4,50 (1,384)
DCM-16	0,1 µg/mL	79,17 (1,138)	18,67 (0,882)	2,17 (0,703)
	1 µg/mL	49,67 ** (1,585)	45,33 ** (1,430)	5,50 (1,500)
DCM-17	0,1 µg/mL	72,83 * (1,138)	24,67 * (1,626)	2,50 (0,563)
	1 µg/mL	36,67 ** (3,499)	57,50 ** (2,446)	5,83 * (1,537)
DCM-18	0,1 µg/mL	87,83 (2,072)	10,83 (1,621)	1,33 (0,615)
	1 µg/mL	78,17 * (1,956)	20,33 * (1,783)	1,33 (0,558)

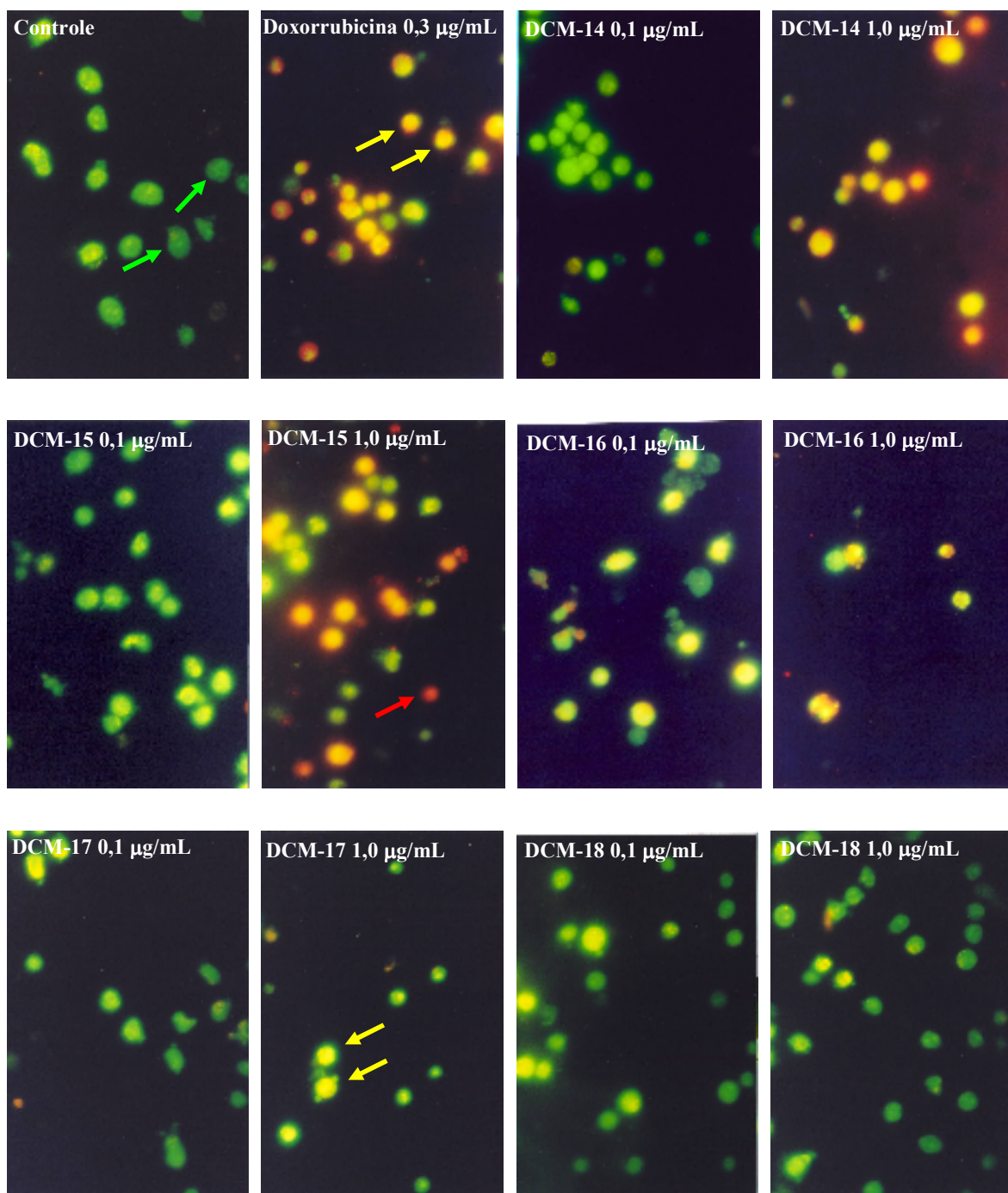


Figura 17 - Microfotografias das células HL-60 controle e tratadas com doxorubicina e cada uma das frações por 24h. Coloração por BE/AL – setas verdes indicam células viáveis, as amarelas indicam apoptose e as vermelhas, necrose. Aumento 400X.

A tabela 21, a seguir, apresenta um resumo daquelas atividades observadas sobre as células HL-60 durante o estudo do mecanismo de ação de cada fração estudada - DCM-14, DCM-15, DCM-16, DCM-17 e DCM-18.

Tabela 21: Quadro-resumo das atividades apresentadas pelas frações selecionadas incubadas por 24h com as células HL-60.

Fração	MTT (24h)	Tripan		Curva de Crescimento (72h)	BrdU	Análise Morfológica		Anexina		BE/AO	
		Células Viáveis	Células Não-viáveis			Apoptose	Necrose	Apoptose	Necrose	Apoptose	Necrose
DCM-14	++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	-
DCM-15	++	++	-	++	-	++	++	++	++	++	-
DCM-16	+++	+++	-	+++	+++	+++	+	++	+	++	-
DCM-17	+++	+++	-	+++	++	+++	++	+++	+	+++	+
DCM-18	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-

+++ muito forte; ++ regular; + baixa; - inativa

DISCUSSÃO

O estudo de produtos naturais marinhos revelou nas últimas décadas várias substâncias com potencial biomédico, despertando o crescente interesse dos pesquisadores por este ecossistema com uma fonte promissora de novas drogas (Munro, *et al.*, 1999). Dentre os grupos estudados, as esponjas, os briozoários e as ascídias destacam-se como os macro-invertebrados mais promissores. Vale ressaltar que os compostos com atividade citotóxica e antitumoral são os mais frequentemente encontrados nesses organismos (Faulkner, 2000).

O presente trabalho avaliou, inicialmente, a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico bruto de 10 espécies de ascídias encontradas na costa do estado do Ceará em quatro bioensaios. O litoral cearense apresenta uma fauna de Ascidiacea bastante peculiar, sendo que neste estudo foram utilizadas cinco espécies ainda não descritas pertencentes a gêneros já conhecidos das famílias Didemnidae e Polycitoridae, além de uma espécie pertencente a um gênero ainda não descrito da família Holozoidae.

A determinação da citotoxicidade *in vitro* tem se mostrado eficaz na descoberta de novos agentes antitumorais (Cragg & Newman, 2000; Cragg *et al.*, 2003). O interesse em desenvolver novos modelos celulares para o acesso à toxicidade vem aumentando sempre com o passar dos anos por serem mais econômicos e rápidos e por fornecerem resultados mais facilmente quantificáveis e com maior reprodutibilidade (Fornelli *et al.*, 2004). A maneira mais rápida, fácil e sensível é o *screen* com modelos *in vitro*, e a busca por inovações neste campo se faz cada vez mais útil e necessária. O US-NCI desenvolve um programa de *screening* efetivo para a

detecção de substâncias citotóxicas utilizando 60 linhagens de células tumorais. Inicialmente, um *pré-screen* em três linhagens celulares seleciona, dali, os compostos que devem ser testados nas linhagens restantes. Daí seguem para a fase de ensaios *in vivo*. Foi constatado que as três linhagens são capazes de detectar mais de 95% dos compostos ativos nas 60 linhagens (Cragg & Newman, 2000; Cragg *et al.*, 2003). No entanto, a estrutura do NCI nem sempre é possível de ser encontrada em outros locais, o que abre caminho para a prática de bioensaios alternativos para a detecção de atividade citotóxica de substâncias a serem testadas.

O ensaio com os ovos de ouriço-do-mar, de metodologia bastante simplificada, é um exemplo disso. Os ovos de ouriço são um modelo alternativo de um sistema celular que dispensa qualquer tipo de meio de cultura especial ou aparelhagem sofisticada. Este modelo é amplamente utilizado no estudo de drogas com efeitos citotóxicos, teratogênicos e antineoplásicos (Jacobs *et al.*, 1986). Assim como células tumorais, os ovos dividem-se rapidamente e apresentam uma sensibilidade seletiva a certos tipos de drogas (Munro *et al.*, 1987) além de uma série de peculiaridades no seu ciclo de desenvolvimento que o torna bastante elucidativo no estudo de drogas com potencial antitumoral. De acordo com Munro *et al.* (1987), compostos que inibem a mitose em ovos de ouriços devem ser, a seguir, estudados em testes *in vivo*, pois os resultados com esse bioensaio são bastante confiáveis. A inibição da divisão celular pode estar relacionada a vários eventos envolvidos nesse processo, como síntese de ácidos nucléicos (DNA e RNA), síntese protéica e polimerização de microtúbulos. No bioensaio dos ovos de ouriço do mar, esses processos podem, muitas vezes, ser analisados individualmente (Fusetani, 1987).

A medida da toxicidade aguda em larvas de *Artemia salina* é outro parâmetro que pode ser considerado. Este ensaio, apesar de não selecionar apenas 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 *screenings* com essa finalidade (Solis *et al.*, 1993; Munro *et al.*, 1987). Pode-se listar vários outros bioensaios alternativos e suas principais aplicações, no entanto, estes dois são os mais relevantes para essa discussão.

Dentre os extratos testados, o obtido de *Eudistoma vannamei* apresentou a maior atividade nos ensaios do MTT, artemia e ouriço-do-mar, indicando a presença de substâncias citotóxicas nessa ascídia. A avaliação da toxicidade aguda em larvas de *Artemia salina* serviu como um método inicial para a detecção da atividade citotóxica deste extrato, sendo o baixo valor encontrado para a DL₅₀ confirmado pelos resultados encontrados no teste do MTT. O extrato de *E. vannamei* também causou a inibição do desenvolvimento dos ovos de ouriço-do-mar, sendo mais eficaz no estágio de blástula quando comparado com seu efeito sobre a 1ª divisão. A observação das células tratadas ao microscópio revelou que o aumento do tempo de contato do extrato com os embriões induziu o aparecimento de anomalias celulares, sugerindo uma que o efeito anti-mitótico deste extrato pode estar relacionado à presença de compostos que comprometem a estabilidade do DNA das células embrionários do ouriço.

Para verificar se o EHA de *E. vannamei* exercia seus efeitos citotóxicos por causar danos às membranas celulares, este foi testado quanto ao seu potencial de lisar hemácias de camundongos. No entanto, não demonstrou qualquer capacidade lítica, sugerindo que seu mecanismo de ação citotóxico não está relacionado a danos em membranas celulares.

Assim, pelos resultados apanhados nos ensaios iniciais de citotoxicidade com os extratos brutos das 10 ascídias, a espécie *Eudistoma vannamei* foi, dentre elas, a que mais se destacou devido a sua intensa atividade nos modelos biológicos testados. Vale ressaltar que esta é uma espécie endêmica do litoral nordestino brasileiro, ocorrendo apenas na costa da Bahia ao Ceará (Lotufo, 2002). Por esses motivos, essa espécie foi escolhida para uma melhor caracterização química e biológica de seus componentes ativos.

O monitoramento da atividade citotóxica durante o fracionamento do extrato hidroalcoólico de *E. vannamei* revelou que as substâncias citotóxicas foram extraídas principalmente na fase diclorometânica. O prosseguimento dos estudos com esta fase resultou em 5 frações (DCM-14 a DCM-18) quimicamente muito semelhantes como evidenciado por CCDC. Na tentativa de purificação dos compostos ativos, um novo extrato foi preparado, particionado e fracionado. A fração com perfil cromatográfico

semelhante às anteriores foi selecionada para purificação, que resultou no isolamento da base nitrogenada timidina e da dicetopiperazina 6-etilamino-1-metil-piperazina-2,5-diona, como componentes majoritários. Como componentes minoritários haviam uma série de derivados desta dicetopiperazina que não foram identificados dada a pequena quantidade de material obtido.

Vale a pena ressaltar que sinais compatíveis com a timidina não foram observados no espectro de RMN ^1H das frações DCM-14 a DCM-18, indicando um perfil químico diferente do último extrato. Entretanto, a presença de dicetopiperazinas foi detectada em ambos os extratos. Essa sazonalidade com relação à composição química é frequentemente observada em invertebrados marinhos. De acordo com Sennett (2001), existe uma variação quantitativa e qualitativa com relação a metabólitos secundários em invertebrados marinhos. Esta variação pode estar relacionada a diferentes aspectos: nível de predação, habitat, ontogenia, localização geográfica e profundidade. Existem fortes evidências que microrganismos simbiotes sejam os verdadeiros produtores das substâncias bioativas previamente isoladas de invertebrados marinhos, o que também justificaria as diferenças intraespecíficas observadas na composição química (Kobayashi & Ishibashi, 1993; Unson & Faulkner, 1993; Jayatilake *et al.*, 1996; Jesen & Fenical, 2000; Fdhila *et al.*, 2003).

Com relação às dicetopiperazinas, estes são compostos nitrogenados derivados de aminoácidos isolados preferencialmente de microorganismos como fungos e bactérias de origem terrestre e marinha como atividades biológicas variadas (Laws & Mantle, 1985; Larsen *et al.*, 1992; Shigemori *et al.*, 1998; Fdhila *et al.*, 2003). Vale a pena ressaltar que alguns microorganismos produtores de dicetopiperazinas foram isolados de organismos marinhos, incluindo algas, moluscos e esponjas (Takahashi *et al.*, 1995; Jayatilake *et al.*, 1996; Fdhila *et al.*, 2003).

De acordo com Davidson (1993), as ascídias possuem um metabolismo secundário especializado na produção de compostos derivados de aminoácidos, sendo que 80% dos compostos isolados desses animais possuem átomos de nitrogênio em sua molécula. As dicetopiperazinas, por sua vez, encontram-se entre esses compostos (Hirsch *et al.*, 1989; Davidson, 1993).

Com relação à atividade citotóxica e antitumoral, algumas dicetopiperazinas isoladas de animais marinhos mostram-se bastante potentes (Takahashi *et al.*, 1995; Jensen & Fenical, 2000;). As leptosinas A-H produzidas pelo fungo *Leptosphaeria* sp isoladas da alga *Sargassum tortile* inibiram a proliferação da linhagem tumoral P-388 com CI_{50} variando entre 1,75 e 8,6 ng/mL, além de exibir uma potente atividade antitumoral contr sarcoma 180 ascítico (Takahashi *et al.*, 1994; 1995).

A dicetopiperazina isolada neste trabalho não apresentou atividade citotóxica. Entretanto, como dito anteriormente, as frações ativas são uma mistura de derivados dessa substância, os quais, provavelmente são os componentes ativos. Desta maneira, optamos por estudar, as frações ativas que continham essa mistura de dicetopiperazinas.

O passo seguinte foi determinar a concentração inibitória média (CI_{50}) destas 15 amostras consideradas ativas. Dessa vez, o ensaio do MTT foi novamente utilizado para este fim, sendo que foram utilizadas várias diluições de cada amostra e outras três linhagens celulares – CEM, MCF-7 e B-16. O método do MTT avalia a inibição do crescimento celular, seja pela ação citostática ou citotóxica da substância testada (Twentyman *et al.*, 1989). O princípio do teste consiste na redução do sal de MTT, um composto amarelo, ao formazan, um precipitado roxo, pela atividade mitocondrial das células viáveis (Mosman, 1983). A atividade metabólica das células, avaliada pela reação enzimática sob o MTT, correlaciona diretamente com o número de células e permite a quantificação espectrofotométrica da taxa de proliferação células da cultura. De acordo com o US – NCI, um extrato é considerado ativo quando possui uma CI_{50} menor que 20 μ g/mL. Para substâncias puras, esse valor cai para 4 μ g/mL (Suffness & Pezzuto, 1991).

Os resultados encontrados neste ensaio sugerem a presença de compostos com alta atividade citotóxica no extrato de *E. vannamei*. As frações DM-1 e 3 apresentaram uma CI_{50} entre 3 e 5 μ g/mL na maioria das linhagens celulares humanas nas quais foram testadas; uma atividade bastante razoável, principalmente se considerado que ainda não se tratam de substâncias puras. No entanto, as frações derivadas do fracionamento do segundo extrato bruto, DCM-14 a 17, apresentaram

suas CI_{50} em 1 ordem de magnitude abaixo daqueles valores, variando de 0,1 a 0,7 $\mu\text{g/mL}$ nas linhagens testadas, uma atividade potente até se comparada a compostos puros. Ainda que igualmente não se tratassem de substâncias puras, a intensa atividade demonstrada por essas frações despertou o interesse pela caracterização farmacológica de seus mecanismos de ação. Para tanto, foram avaliados os efeitos de cada uma das frações selecionadas sobre células da linhagem HL-60 em cultura, principalmente no que diz respeito à duplicação das células e mecanismos de indução de morte celular.

Modelos celulares são ferramentas úteis e necessárias para acessar a potencial toxicidade de um composto, traduzida, inicialmente, pela sua capacidade de induzir a morte celular, e a linhagem HL-60 está entre os modelos celulares de origem mielóide mais amplamente utilizados (Collins *et al.*, 1977; Gallagher *et al.*, 1979; Collins, 1987). As células da linhagem HL-60 são derivadas do sangue periférico de um paciente com leucemia promielocítica aguda, tendo sido caracterizada e sua cultura primeiramente estabelecida por Collins *et al.* (1977). Neutrófilos promielocíticos com proeminente assincronia na relação núcleo/citoplasma são predominantes nessa cultura, sendo que cerca de 10% das células cultivadas diferenciam-se espontaneamente para o estágio monocítico. Exibem atividade fagocitária e quimiotática, além de serem capazes de formar colônias em meio de cultura semi-sólido.

Neste estudo, o modelo proposto para avaliar os efeitos tóxicos das frações DCM-14, DCM-15, DCM-16, DCM-17 e DCM-18 nas células HL-60 foi o seguinte: 1º) ensaio colorimétrico do MTT e exclusão por azul de tripan, o primeiro para obtenção da CI_{50} e constatação do estado metabólico das células e o segundo para avaliação da viabilidade celular; 2º) incorporação de BrdU e curva de crescimento celular, para verificação da duplicação e da cinética de crescimento das células; 3º) análise morfológica das células (por coloração diferencial com hematoxilina e eosina) para detecção de alterações estruturais ou atípicas; 4º) distinção dos processos de morte celular, avaliados nos ensaios da anexina e coloração diferencial com brometo de etídio e acridina laranja.

Os efeitos das frações sobre as células foram avaliados sempre após 24h de incubação, utilizando-se duas concentrações de cada fração – 0,1 µg/mL e 1,0 µg/mL – intervalo este que abrangia as IC₅₀ determinadas após 24 h de incubação com as células HL-60 para a maioria das frações. A doxorrubicina, um agente anti-câncer de amplo espectro, vastamente utilizado na clínica tanto para o tratamento de tumores sólidos quanto para leucemias, foi usada como controle positivo dos experimentos na concentração de 0,3 µg/mL.

A contagem e a determinação da viabilidade celular é um passo essencial para estudar os efeitos tóxicos de um dado composto. Desse modo, ensaios baseados na integridade da membrana, estado metabólico ou taxa de proliferação celular foram desenvolvidos a fim de avaliar esses parâmetros. A exclusão por azul de tripan é um ensaio de viabilidade celular que quantifica as células capazes de drenar o corante ácido azul de tripan para o meio externo em contraposição àquelas que não possuem essa capacidade. A absorção deste corante é um indicativo de dano na membrana plasmática, provavelmente precedendo a morte celular. É um ensaio normalmente utilizado para avaliar a redução de células viáveis no meio e verificar o efeito citotóxico de um dado composto (Charoenpornsook *et al.* 1998; Minervini *et al.* 2004). Este ensaio foi selecionado para este trabalho por ser amplamente utilizado para fins toxicológicos e por dar uma resposta complementar ao teste do MTT, já que este ensaio igualmente fornece um dado quantitativo das células viáveis existentes, mas pela avaliação do seu estado metabólico (Fornelli *et al.*, 2004).

Os resultados verificados no teste de exclusão por azul de tripan corroboram satisfatoriamente com aqueles encontrados no ensaio do MTT. As IC₅₀ encontradas quando da incubação de diferentes diluições das frações DCM-16 e 17 por 24 h com as células foram, respectivamente as menores dentre as frações testadas. No teste de exclusão por azul de tripan, essas duas frações foram igualmente apontadas como as mais ativas, tendo diminuído significativamente a contagem de células viáveis nas duas concentrações em que foram avaliadas. As frações DCM-14 e 15 diminuíram a quantidade de células apenas na concentração de 1 µg/mL, sendo suas IC₅₀ iguais aproximadamente 2 vezes maiores que aquelas verificadas para DCM-16 e DCM-17. A IC₅₀ para DCM-18, com 24 h de incubação com as células, não pode ser calculada

pois ficaria acima da maior concentração testada, de 5 µg/mL e na exclusão por tripan, essa fração não alterou significativamente a contagem de células em nenhuma das concentrações testadas.

As IC₅₀ determinadas para cada uma das frações incubadas com as células HL-60 por 72 h, pelo teste do MTT foram de 2 a 4 vezes menores que aquelas obtidas com a incubação por 24 h. Isso demonstra que o aumento do tempo de contato com as frações intensifica o efeito tóxico.

A determinação da cinética de crescimento celular ilustra bem esses achados. A contagem das células tratadas com DCM 16 e 17 (1,0 µg/mL) cai para 50% do controle entre a 12^a e a 18^a h. Ao diminuir a concentração teste, para 0,1 µg/mL, o efeito começa a surgir mais tarde, a partir da 48^a h para DCM-16 e 36^a h para DCM-17. As frações DCM-14 e 15 não mostraram efeitos tóxicos na menor concentração testada, sendo que na maior concentração a redução de 50% das células ocorre entre a 18^a e 24^a h. As células tratadas com DCM-18 também só demonstraram uma cinética significativamente diferente das células não-tratadas na maior concentração, sendo que o efeito tóxico só é detectado após a 54^a h, o que pode justificar o fato de sua IC₅₀ para as células HL-60 não poder ser calculada com apenas com 24 h de incubação. Estes resultados, diferentemente daqueles dos demais ensaios com HL-60, foram obtidos a partir de contagens das células em intervalos de 6 h por um período de 72 h de incubação com as frações.

Indução de apoptose e verificação dos níveis de proliferação celular são importantes indicadores da biologia tumoral, principalmente das leucemias. A importância dessas ocorrências é percebida, principalmente, na busca de novas abordagens terapêuticas que minam especificamente esse dois eventos celulares (Lin *et al.*, 2002).

Uma abordagem para se acessar a proliferação das células é pela análise do ciclo celular utilizando-se da detecção da incorporação de um análogo da timidina, a bromodeoxiuridina (BrdU), em DNA recém sintetizado. Na cinética celular clássica, o

ciclo é dividido nas fases G1 – S – G2 – M para as células em divisão, enquanto a fase G0 refere-se às células quiescentes ou não-proliferantes (Raza *et al.*, 1991). As células na fase S, de síntese, estão fabricando novo material genético e, portanto, utilizando-se dos nucleotídeos do meio (Holm *et al.*, 1998). Estas células estão fadadas a incorporar a BrdU em seu DNA que, por sua vez, pode ser detectada com o uso de anticorpos conjugados anti-BrdU e técnicas de imuno-histoquímica para sua marcação.

Este ensaio revelou que as células tratadas com as frações DCM-16 e 17 incorporaram BrdU em menor quantidade. Enquanto que no controle observou-se uma incorporação de BrdU em 60% das células, após o tratamento com DCM-17 (1,0 µg/mL) esse valor caiu para 30%, o que diferiu significativamente do controle. O tratamento das células com DCM-16, na menor concentração, induziu a incorporação de BrdU em apenas 43% delas, e este valor cai para a maior concentração, quando nenhuma das células haviam incorporado BrdU. Esse resultado ainda difere significativamente daquele obtido com as células tratadas com doxorrubicina, um forte inibidor do ciclo celular, onde 4% das células incorporaram BrdU. Isso pode indicar de que as frações DCM-16 e 17 trazem um constituinte citostático na sua composição que estaria inibindo a síntese de DNA, e este pode existir em maior quantidade na fração DCM-16, já que esta apresenta maior grau de pureza, ou ser uma substância mais potente que aquela presente na fração DCM-17.

A curva de crescimento para as células não-tratadas e tratadas com as 5 frações corrobora com os achados no ensaio da incorporação da BrdU, tendo igualmente indicado as frações DCM-16 e 17 como as mais fortes inibidoras da proliferação celular. Essas duas frações diminuíram o número de células na cultura, modificando significativamente a cinética de crescimento celular com relação ao controle, em ambas as concentrações testadas. As curvas obtidas para as células tratadas com as outras frações, DCM-14, 15 e 18, diferiram do controle apenas na maior concentração.

A redução do número de células em um determinado meio pode estar ocorrendo não só devido a um efeito citostático, como a inibição da duplicação

celular, por exemplo, mas também por um efeito citotóxico, ou seja, por indução de morte. O próximo passo no delineamento deste trabalho consistiu em avaliar se e por que mecanismos as células tratadas eram levadas à morte – se por apoptose ou necrose.

Apoptose é um evento fisiológico de importante valor durante o desenvolvimento embrionário, metamorfose, atrofia dependente de hormônio e crescimento tumoral, seja regulando o número de células ou eliminando células danificadas. Também chamada de suicídio celular ou morte programada, é mediada por uma via bastante conservada durante a evolução das espécies. O processo de apoptose, diferentemente da necrose, onde a morte celular ocorre inicialmente com uma perturbação metabólica ou desestabilização da membrana plasmática, induz a morte celular de forma altamente regulada que elimina células ou tecidos indesejados protegendo o organismo contra a formação de neoplasmas. O mecanismo defeituoso de apoptose pode ocasionar diversas patologias, inclusive câncer (Fisher, 1994; Majno & Joris, 1995; Opalka *et al.*, 2002).

Por muitos anos, acreditou-se que os efeitos citotóxicos de quimioterápicos antineoplásicos eram atribuídos unicamente à capacidade de indução de genotoxicidade. Durante as últimas décadas, foi observado que muitas dessas drogas induzem apoptose e esse reconhecimento desvendou mais uma estratégia para a busca de novas drogas anti-câncer (Kamesaki, 1998; Panchal, 1998).

Células normais ou neoplásicas sofrendo apoptose apresentam as seguintes características morfológicas: volume reduzido, perda de contato com células vizinhas, condensação da cromatina nuclear, fragmentação de DNA e formação de corpos apoptóticos contendo organelas celulares intactas. Nos estágios iniciais, as células perdem a simetria da membrana e o fosfolípido fosfatidilserina é translocado da parte interna à parte externa (revisado por Ling *et al.* 1993, Gruber *et al.* 2001).

O mecanismo de morte celular induzido pelas diferentes frações foi primeiramente visualizado através de análises morfológicas das células tratadas e não

tratadas, acessado pela coloração diferencial núcleo/citoplasma proporcionada pelos corantes hematoxilina e eosina. Além deste, dois outros ensaios permitiram avaliar, por coloração diferencial, observada sob luz fluorescente, as células viáveis daquelas sofrendo algum processo de morte, seja apoptose ou necrose – anexina e coloração por BE/AL.

Acredita-se que a doxorrubicina exerça seus efeitos citostáticos ou citotóxicos pela ligação ao DNA ocasionando quebras de fita simples ou fita dupla com conseqüente inibição dos processos de replicação e transcrição. No entanto, outros mecanismos de ação já foram atribuídos a esta droga, como inibição da enzima topoisomerase II, perturbação da estrutura e função da membrana plasmática e formação de radicais livres (revisado por Myers & Chabner, 1990). Finalmente, foi demonstrado que a doxorrubicina é capaz de induzir a morte celular por apoptose (Ling *et al.*, 1993; Gerwitz, 1999).

Pela observação ao microscópio das características morfológicas das células coradas com hematoxilina e eosina, pode-se constatar que as frações DCM-14, 15, 16 e 17 apresentavam características compatíveis com aquelas descritas para células apoptóticas, sendo que as frações DCM-16 e 17 reuniam um maior número delas, como reduzido volume celular e fragmentação nuclear, características comparáveis àquelas observadas nas células tratadas com doxorrubicina. A fração DCM-15, na concentração de 1,0 µg/mL, também apresentava células com núcleos picnóticos e membrana plasmática instável, alterações tipicamente observadas nas células em processo necrótico. Além dessas, tanto as quatro frações citadas na maior concentração testada, como a doxorrubicina, também apresentavam fragmentos celulares permeando a lâmina.

Esses resultados corroboram satisfatoriamente com o que foi visto nos ensaios para a detecção da externalização da fosfatidilserina e na coloração com brometo de etídio e acridina laranja (BE/AL). De acordo com o primeiro ensaio, as frações DCM-15 e 17 são as mais fortes indutoras de necrose celular, apresentando um padrão semelhante àquele observado para a doxorrubicina. Pela quantificação das células necróticas, no segundo ensaio, apenas a fração DCM-17 (1,0 µg/mL) foi capaz de

aumentar significativamente o número de necroses com relação ao controle. No entanto, em ambos os ensaios, foi constatado que a fração DCM-17 induziu mais apoptoses que qualquer outra fração testada, tendo, inclusive, pela quantificação possibilitada pelo método de coloração com BE/AL, alterado de forma significativa a contagem de células apoptóticas até mesmo na menor concentração testada (0,1 µg/mL). Isso pode ser um indicativo de que essa fração possui substâncias fortemente citotóxicas, ou seja, indutoras de morte celular, principalmente pelo processo de apoptose. As frações DCM-14, 15 e 16 apresentaram um padrão semelhante para apoptose em ambos os ensaios, diferindo significativamente do controle apenas na concentração de 1,0 µg/mL, sem, contudo, variar entre si.

Este trabalho é parte integrante de um projeto mais ambicioso que tem como meta o estudo do potencial citotóxico de determinados grupos zoológicos ocorridos na costa do estado de Ceará. Etapas posteriores deste estudo em particular devem incluir a purificação das frações ativas, o isolamento dos princípios responsáveis pelas atividades apresentadas e a caracterização química dos mesmos. O esclarecimento dos mecanismos de ação citotóxica, bem como a elucidação do processo de produção dos metabólitos ativos também são aspirações futuras. Entretanto, esta dissertação vem para selar a implantação da pesquisa com produtos naturais provenientes da costa cearense, que já abrange estudos de *screening* farmacológico e fracionamento químico de representantes dos grupos dos enopliários e cnidários, além das ascídias, e efetiva colaborações multidisciplinares realizadas entre o Laboratório de Oncologia Experimental e outros laboratórios brasileiros de química orgânica, farmacologia e zoologia, visando avanços concretos neste campo.

Além de *E. vannahae*, outras espécies estudadas neste trabalho também apresentaram atividades citotóxicas significativas e merecem estudos químicos e farmacológicos mais aprofundados. Pesquisas com as espécies *Didemnum psammatoides*, *Euherdmania* sp. e *Polysyncraton* sp. já estão em andamento. Vale ressaltar que as duas últimas espécies citadas ainda não foram descritas, o que ratifica o alto grau de endemismos dentre as ascídias na costa do Ceará.

O desenvolvimento das pesquisas com produtos naturais marinhos, ainda que recente, já revelou vários compostos com futuros promissores na clínica. Estudos que visam a busca de novos compostos com atividade citotóxica e potencial antitumoral fazem-se necessários na medida que, em se tratando das neoplasias malignas, ainda não se chegou ao composto ideal. Como visto, as ascídias despontam como uma fonte notável de substâncias com essas características. Finalmente, os resultados aqui apresentados reforçam o potencial de bioprospecção da costa do estado do Ceará, ainda pouco estudada e praticamente desconhecida dos grupos que pesquisam os produtos naturais.

CONCLUSÕES

- As ascídias do litoral cearense são uma rica fonte de compostos com propriedades citotóxicas. O *screening* inicial com o extrato bruto das dez ascídias mais abundantes da costa, avaliadas para citotoxicidade nos ensaios iniciais de toxicidade aguda em larvas de *Artemia salina*, atividade antimetabólica sobre o desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço do mar, potencial hemolítico em eritrócitos de camundongo e inibição da proliferação de células tumorais *in vitro*, revelou que a metade delas apresentou atividade em algum dos ensaios.

- A espécie *Eudistoma vannamei*, foi a mais ativa em três dos quatro ensaios realizados e foi selecionada para prosseguir com os estudos químicos e farmacológicos.

- O fracionamento bioquímico dos extratos brutos obtidos de *Eudistoma vannamei* sugerem a presença de compostos com alta atividade citotóxica, sendo que as frações DCM-14, DCM-15, DCM-16, DCM-17 e DCM-18, obtidas do fracionamento da fase diclorometânica, foram as mais potentes. A análise química sugeriu que as frações ativas são misturas de compostos nitrogenados derivados de aminoácidos do tipo dicetopiperazina. Do fracionamento das frações ativas foi isolada a dicetopiperazina 6-etilamino-1-metil-piperazina-2,5-diona como componente majoritário, mas esta substância não demonstrou toxicidade contra a proliferação celular de linhagens tumorais em cultura. A atividade deve estar relacionada a derivados desta substância encontrados em pequena quantidade.

- O estudo dos mecanismos envolvidos na atividade das frações ativas demonstrou que a redução da proliferação de linhagens de células tumorais induzida por seus componentes ativos deve estar relacionada à inibição da síntese de DNA e à indução de apoptose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesanya SA, Chbany M, Pais M, Debitus C (1992) Brominated beta-carbolines from the marine tunicate *Eudistoma album*. *Journal of Natural Products* 55: 525-527.
- Albella B, Faircloth G, Lopez-Lazarco L, Guzman C, Jimeno J, Buerena JA (2002) In vitro toxicity of ET-743 and aplidine, two marine-derived antineoplastics, on human bone marrow haematopoietic progenitors: comparison with the clinical results. *European Journal of Cancer* 38: 1395–1404.
- Balandrin MF, Kinghorn AD, Farnsworth NR (1993) Plant-derived natural products in drug discovery and development: an overview. In: Kinghorn AD, Balandrin MF (Editors) *Human Medicinal Agents from Plants*. Edited by North Carolina, USA: Oxford University Press USA; 2-12. American Chemical Society Symposium Series.
- Battershill CN, Page MJ, Duckworth AR, Miller KA, Berquist, PR, Blunt JW, Munro MHG, Northcote PT, Newman D J, Pomponi SA (1998) Discovery and sustainable supply of marine natural products as drugs, industrial compounds and agrochemicals: chemical ecology, genetics, aquaculture and cell culture. Abstracts, 5th. International Sponge Symposium, Brisbane, p.16.
- Bergman W & Feeney RJ (1951) Nucleosides of sponges. *Journal of Organic Chemistry* 16: 981-987.

- Berlinck RGS, Britton R, Piers E, Lim L, Roberge M, Rocha RM, Andersen RJ (1998) Granulatimide and isogranulatimide, aromatic alkaloids with G2 checkpoint inhibition activity isolated from the Brazilian ascidian *Didemnum granulatum*: structure elucidation and synthesis. *Journal of Organic Chemistry* 63: 9850-9856.
- Berlinck RGS, Hajdu E, Rocha RM, Oliveira JHHL, Hernández ILC, Selegim MHR, Granato AC, Almeida EVR, Nuñez CV, Muricy G, Peixinho S, Pessoa C, Moraes MO, Cavalcanti BC, Nascimento GGF, Thiemann O, Silva M, Souza AO, Silva CL, Minarini PRR (2004) Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. *Journal of Natural Products* 67: 510-522.
- Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR (2003) Marine natural products. *Natural Products Report* 20: 1-48.
- Britton R, Oliveira JHHL, Andersen RJ, Berlinck RGS (2001) Granulatimide and 6-Bromogranulatimide, minor alkaloids from the Brazilian ascidian *Didemnum granulatum*. *Journal of Natural Products* 64: 254-255.
- Broggini M, Marchini S, D'Incalci M, Faircloth GT, Jimeno J (1999) Changes in gene expression in tumor cells exposed to the two marine compounds, ET-743 and Aplidine, by using cDNA microarrays. *Proc AACR-NCI-EORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics: Discovery, Development and Clinical Validation*, 10: 310a.
- Butler M & Dawson M (1992) *Cell culture*. Blackwell, Scientific Publications.
- Carté BK (1996) Biomedical potential of marine natural products. *Bioscience* 46: 271-286.
- Charoenpornsook K, Fitzpatrick JL, Smith JE (1998) The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Mycopathologia* 143: 105-111.

- Collins SJ (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 70: 1233-1244.
- Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270 (5635): 347-349.
- Cragg GM & Newman DJ (1999) Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Investigation* 17: 153-163.
- Cragg GM & Newman DJ (2000) Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 9 (12): 1-15.
- Cragg GM, Newman, DJ & Snader KM (2003) Natural products as source of new drugs over the period of 1981 - 2002. *Journal of Natural Products*. 66: 1022 - 1037.
- Cragg GM, Newman DJ, Snader KM (1997) Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products* 60: 52-60.
- Davidson BS (1993) Ascidiaceae: producers of amino acid derived metabolites. *Chemical Review* 93: 1771-1791.
- Davis AR & Wright AE (1989) Interspecific differences in fouling of two congeneric ascidians (*Eudistoma olivaceum* and *E. capsulatum*): is surface acidity an effective defense? *Marine Biology* 102: 491-497.
- De Vries DJ & Beart PM (1995) Fishing for drugs from the sea: status and strategies *Trends in Pharmacological Science* 16:275-279.
- Dietzmann GR (1997) The marine environment as a discovery resource in High Throughput screening: the discovery of bioactive substances. Devlin JP & Marcel Dekker Inc (Eds.) New York 99-144.
- Donia M & Hamann MT (2003) Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infectology*. Dis. 3: 338-348.

- Erba E, Bassano L, Di Liberti G (1999) Is aplidine acting as an ornithine decarboxylase (ODC) inhibitor? Proceedings AACR-NCIEORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics: Discovery, Development and Clinical Validation 10: 312a.
- Erba E, Bergamaschi D, Bassano L, Damia G, Ronzoni S, Faircloth GT, D'Incalci M (2001) Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound with a unique mechanism of action. European Journal of Cancer 37: 97–105.
- Faircloth G, Hanauske A, Depenbrock H, Peter R, Crews C.M, Manzanares I, Meely K, Grant W, Jimeno JM (1997) Pre-clinical characterization of Aplidine, a new marine anticancer depsipeptide. Proceedings of the American Association for Cancer Research 38: 692a.
- Farnsworth NR (1985) Medicinal plants in therapy. Bulletin of the WHO 63 (6): 965–981.
- Faulkner DJ (2000) Marine Pharmacology. Antonie van Leeuwenhoek 77: 135-145.
- Fdhila F, Vázquez V, Sánchez JL, Riguera R (2003) DD-Diketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. Journal of Natural Products 66 (10): 1299-1301.
- Fenical W (1997) New pharmaceuticals from marine organism. Marine Biotechnology: 339–341.
- Fisher DE (1994) Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. Cell 78: 539–542.
- Fornelli, F; Minervini, F, Logrieco, A (2004) Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). Journal of Invertebrate Pathology 85: 74–79.
- Fusetani N (1987) Marine metabolites which inhibit development of echinoderm embryos. In: Scheur, PJ (Ed.), Bioorganic Marine Chemistry. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54(3):713-33.
- Garson MJ (1994) The biosynthesis of sponge secondary metabolites: Why is it important. In: Van Soest RWM, Van Kempen TMG, Braekman JC (Eds.) *Sponges in time and space*. Balkema, Rotterdam, 427-440.
- Geldof AA, Mastbergen SC, Henrar REC, Faircloth GT (1999) Cytotoxicity and neurocytotoxicity of new marine anticancer agents evaluated using *in vitro* assays. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 44:312-318.
- Geng C-X, Zeng Z-C, Wang J-Y (2003) Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. *World Journal of Gastroenterology* 9(4): 696-700.
- Gewirtz DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunomycin. *Biochemical Pharmacology* 57: 727–741.
- Gruber, N; Gloor, M; Fan, S-M; Sarmiento, JL (2001) Air-sea flux of oxygen estimated from bulk data: Implications for the marine and atmospheric oxygen cycle, *Global Biogeochemical Cycles* 15(4):783-803.
- Hirata Y & Uemura D (1986) Halichondrins – antitumor polyether macrolides from a marine sponge. *Pure and Applied Chemistry* 59: 701-710.
- Hirsch S, Miroz, A, McCarthy, P., Kashman, Y (1989) Etzionin, a new antifungal metabolite from a Red Sea tunicate. *Tetrahedron Letters* 30: 4291-4294.
- Holm M, Thomsen M, Hoyer M, Hokland P (1998) Optimization of a flow cytometric method for the simultaneous measurement of cell surface antigen, DNA content, and *in vitro* BrdU incorporation into normal and malignant hematopoietic cells. *Cytometry* 32: 28–36.

- Ireland C, Copp B, Foster M, McDonald L, Radisky D, Swersey J (1993) Biomedical potential of marine natural products, 1-43. In: Attaway D & Zaborsky O (Eds) Marine Biotechnology. Vol. 1. Pharmaceutical and bioactive products. New York: Plenum Press.
- Ireland CM, Roll DM, Molinski TF, Mckee TC, Zabriske TM, Swersey JC (1988) Uniqueness of the marine environment: categories of the marine natural products from invertebrates. 41-57. In: Fautin, DG (Ed.) Biomedical importance of marine organisms. San Francisco (CA): California Academy of Sciences.
- Jacobs RS & Wilson L (1986) Fertilized sea urchin egg as a model for detecting cell division inhibitors. In: Modern analysis of antibiotics. Ed. by A. Aszalor and Marcel Dekker, Inc., 481-493.
- Jayatilake GS, Thornton MP, Leonard AC, Grimwade JE, Baker BJ (1996) Metabolites from an antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Natural Products 59: 293-296.
- Jensen P & Fenical W (2000) Marine Microorganisms and drug discovery: Current status and future potential. In: Fusetani (ed): Drugs from the Sea. Basel, Karger, pp 6-29.
- Jimenez PC, Fortier SC, Lotufo TMC, Pessoa C, Moraes MEA, Moraes MO, Costa-Lotufo LV (2003) Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 287: 93-101.
- Jimeno JM, Faircloth GT, Cameron L, Meely K, Vega E, Gomez A, Sousa-Faro JMF, Rinehart K (1996) Progress in the acquisition of new marine-derived anticancer compounds: Development of Ecteinascidin-743 (ET-743). Drugs of the Future 21: 1155-1165.
- Kamesaki H (1998) Mechanism involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. International Journal of Hematology 68: 29-43.

- Kikuchi Y, Ishibashi M, Sasaki T, Kobayashi J (1991) Iejimalides C and D, new antineoplastic 24-membered macrolide sulfates from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma cf rigida*. Tetrahedron Letters 32 (6): 797-798.
- Kinnel RB & Scheuer PJ (1992) 11-hydroxystaurosporines a highly cytotoxic powerful protein kinase C inhibitor from a tunicate. Journal of Organic Chemistry 57: 6327-6329.
- Kinzer KF & Cardelina JH II (1987) Three beta-carbolines from the Bermudan tunicate *Eudistoma olivaceum*. Tetrahedron Letters 28: 925-926.
- Kobayashi J & Ishibashi N (1993) Bioactive metabolites of simbyotic marine microorganisms. Chemical Reviews 93: 1753-1769.
- Kobayashi J, Cheng JF, Kikushi Y, Ishibashi M, Yamamura S, Ohizumi Y *et al.* (1990). Rigidin, a novel alkaloid with calmodulin antagonistic activity from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma cf rigida*. Tetrahedron Letters 31: 4617-4620.
- Kobayashi J, Cheng JF, Ohta T, Nakamura H, Nozoe S, Hirata Y, Ohizumi Y, Sasaki T (1988) Iejimalides A and B, novel 24-membered macrolides with a potent antileukemic activity from the Okinawan tunicate *Eudistoma cf. rigida*. Journal of Organic Chemistry 53: 6147-6150.
- König GM & Wright AD (1996) Marine natural products research: current directions and future potential. Planta Medica 62: 193–211.
- Larsen TO, Frisvad JC, Jensen SR (1992) Aurantiamine, a diketopiperazine from two varieties of *Penicillium aurantiogriseum*. Phytochemistry 31: 1613-1615.
- Laws I & Mantle PG (1985) Nigrifortine, a diketopiperazine metabolite of *Penicillium nigricans*. Phytochemistry 24: 1395-2937.
- Li WR & Joullie MM (1992) The didemnins: biological properties, chemistry and total synthesis. Studies in Natural Products Chemistry 10: 241-302.

- Lin CW, Manshouri T, Jilani I, Neuberg D, Patel K, Kantarjian H et al. (2002) Proliferation and apoptosis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research* 26: 551–559
- Lindquist N, Fenical W, Van Duyne GD, Clardy J (1991) Isolation and structure determination of diazonamides A and B, unusual cytotoxic metabolites from the marine ascidian *Diazona chinensis*. *Journal of the Chemical Society* 113: 2303-2304.
- Ling Y, Priebe W, Perez-Soler R (1993) Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells. *Cancer Research* 53: 1845–1852.
- Litaudon M, Hart JB, Blunt JW, Lake RJ, Munro MHG (1994) Isohomohalichondrin B, a new antitumor polyether macrolide from the New Zealand deep-water sponge *Lissodendoryx* sp. *Tetrahedron Letters* 35: 9435-9438.
- Litchfield JT & Wilcoxon F (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 95: 99-113.
- Lotufo TMC (2002) Ascidiacea (Chordata:Tunicata) do litoral tropical brasileiro. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo. 183 pp.
- Majno G & Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *American Journal of Pathology* 146: 3–15.
- Makarieva TN, Ilyin SG, Stonik VA, Lyssenko KA, Denisenko VA (1999) Pibocin, the first ergoline marine alkaloid from the far-eastern ascidian *Eudistoma* sp. *Tetrahedron Letters* 40: 1591-1594.
- Mayer AMS (1999) Marine Pharmacology in 1998: antitumor and cytotoxic compounds *The Pharmacologist* 4: 159-163.
- Millar RH (1977) Ascidiacea (Tunicata:Ascidiacea) from the northeastern Brazilian shelf. *Journal of Natural History* 11: 169-223.

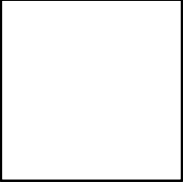
- Minervini, F, Fornelli F, Flynn KM (2004) Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, depxynivalenol, and fumonisin B1 in a human erythro leukemia cell line. *Toxicology In Vitro* 18: 21–28.
- Ministério da Saúde (2004). <http://www.inca.gov.br>. Capturado em 25 de abril de 2004.
- Minuzzo M, Marchini S, Broggin M, Faircloth G, D’Incalci M, Mantovani R (2000) Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. *Proceedings of the National Academy of Science* 27: 6780–6784.
- Molinski TF (1993) Marine pyridoacridine alkaloids: structure, synthesis, and biological chemistry. *Chemistry Reviews* 93: 1825-1838.
- Monniot C, Monniot F, Laboute P (1991). Coral reefs ascidians of New Caledonia. Collection faune tropicale no XXX, ORSTOM Editions, Paris, 247 pp.
- Moore BM, Seaman FC, Wheelhouse RT, Hurley LH (1998) Mechanism for the catalytic activation of ecteinascidin 743 and its subsequent alkylation of guanine N2. *Journal of the American Chemical Society* 120 (38): 9975-9975.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Munro MHG, Blunt JH, Dumdei EJ, Hickford SJH, Lill RE, Li S, Battershill CN, Duckworth AR (1999) The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology*, 70: 15–25.
- Munro MHG, Luibrand RT, Blunt JW (1987) The search for antiviral and anticancer compounds in marine organisms. In: Scheuer, PJ (Ed) *Bioorganic Marine Chemistry*. Ed. by Spring-Verlag Berlin Heidelberg.
- Murata O, Shigemori H, Ishibashi M, Sugama K, Hayashi K & Kobayashi J (1991) Eudistomidins E and F, new beta-carboline alkaloids from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma glaucus*. *Tetrahedron Letters* 32: 3539-3542.

- Myers CE & Chabner BA (1990) Anthracyclines. In: Chabner BA & Collins JM (Eds) Cancer Chemotherapy: Principles and Practice pp. 356-381. Lippincott, Philadelphia.
- Opalka B, Dickopp A, Kirch HC (2002) Apoptotic genes in cancer therapy. Cells Tissues Organs 172: 126–132.
- Panchal RG (1998) Novel therapeutic strategies to selectively kill cancer cells. Biochemical Pharmacology 55: 247–252.
- Parry DL (1984) Cyanophytes with R-phycoerythrins in association with seven species of ascidians from the Great Barrier Reef. Phycologia 23: 503-513.
- Pawlik JR (1993) Marine Invertebrate: chemical defenses. Chemical Reviews 93: 1911-1922.
- Perry NB, Blunt JW, Munro MHG, Pannel LK (1988) Mycalamide A, an antiviral compound from a New Zealand sponge of genus *Mycale*. Journal of the American Chemistry Society 110: 4850-4851.
- Pettit GR (1991) The bryostatins. Fortschr Chem Org Naturst 57:153-159
- Poncet J (1999) The dolastatins, a family of promising antineoplastic agents. Current Pharmaceutical Design 5:139-162.
- Rashid MA, Gustafson KR, Boyd MR (2001) New cytotoxic N-methylated beta-carboline alkaloids from the marine ascidian *Eudistoma gilboverde*. Journal of Natural Products 64: 1454-1456.
- Raza A, Bokhari J, Yousuf N, Medhi A, Mazewski C, Khan S, Baker V, Lampkin, B (1991) Cell cycle kinetic studies in human cancers. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 115: 873-879.
- Rinehart KL (2000) Antitumor compounds from tunicates. Medical Research Reviews, 20 (1): 1- 27.

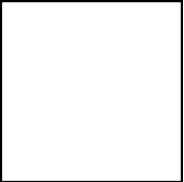
- Rinehart KL Jr, Kobayashi J, Harbour GC, Gilmore J, Mascali M, Holt TG, Rinehart KL Jr, Kobayashi J, Harbour GC, Shield LS, Lafargue F (1987) Eudistomins A-Q beta-carbolines from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. *Journal of the American Chemistry Society* 109: 3378-3387.
- Rinehart KL Jr, Kobayashi J, Harbour GC, Hughes RG Jr, Mizesak SA, Scahill TA (1984) Eudistomins C, E, K and L potent antiviral compounds containing a novel oxathiazepine ring from the Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. *Journal of the American Chemistry Society* 106: 1524-1526.
- Rinehart KL, Holt TG, Fregean NL, Stroh JG, Keifer PA, Sun F, Li LH, Martin DG (1990) Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B and 770: potent antitumor agents from the caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Journal of Organic Chemistry* 55: 4512 – 4515.
- Rinehart KL, Kishore V, Bible KC, Sakai R, Sullins DW, Li KM (1988) Didemins and tunicholorin: novel natural products from the marine tunicate *Trididemnum solidum*. *Journal of Natural Products* 51: 1-21.
- Rinehart LK Jr, Gloer JB, Hughes RG Jr, Renis, HE, McGouren JP, Swynenberg EB, Stringfellow DA, Kwentzel SL, Li LH (1981) Didemnins: antiviral and antitumor depsipeptides from a caribbean tunicate. *Science* 212: 933-935.
- Roberge M, Berlinck RGS, Xu L, Anderson HJ, Lim LY, Curman D, Stringer CM, Friend SH, Davies P, Vincent I, Haggarty SJ, Kelly MT, Britton R, Piers E, Andersen RJ (1998) High-throughput assay for G2 checkpoint inhibitors and identification of the structurally novel compound isogranulatimide. *Cancer Research* 58: 5701-5706.
- Rocha AB, Lopes RM, Schwartzmann G (2001) Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology* 1: 364-369.
- Rocha RM (2002) Série Zoologia : Ascidiacea. Universidade Federal do Paraná. Departamento de Zoologia. Curitiba, PR. Em CD.

- Rodrigues SA, Rocha RM, Lotufo TMC (1998) Guia ilustrado para a identificação das ascídias do Estado de São Paulo. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 190p.
- Rossof AH, Rowland K, Kandekar J, Kilton L, Benson AB III, Blough R, Howe H. (1989) Phase II trial of didemnin B in previously untreated patients with measurable metastatic colorectal carcinoma. Proceedings of the American Society of Clinical Oncology: 439a.
- Rudi A & Kashman Y (1989) Six new alkaloids from the purple Red Sea tunicate *Eudistoma sp.* Journal of Organic Chemistry 54: 5331-5337.
- Ruppert EE & Barnes RB (1996) Zoologia dos Invertebrados. Ed. Rocca Ltda. 6ª edição. São Paulo.
- Sakai R, Rinehart KL, Guan Y, Wang AH-J (1992) Additional antitumor ecteinascidins from a Caribbean tunicate: crystal structures and activities in vivo. Proceedings of the National Academy of Science 89: 11456 – 11460.
- Sakai R, Rinehart KL, Kishore V, Kundu B, Faircloth G, Gloer JB *et al.* (1996) Structure-activity relationships of the didemnins. Journal of Medicinal Chemistry 39: 2819-2934.
- Schmitz FJ, Bowden BF, Toth SI (1998) Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms. In: Attaway DH & Zaborsky OR (Editors) Marine Biotechnology: 197-308. Plenum press, New York.
- Schwartzmann G (2000) Marine organisms and other novel natural sources of new anticancer drugs. Annals of Oncology 11:235-243.
- Schwartzmann G, Rocha AB, Berlinck RGS, Jimeno J (2001) Marine organisms as a source of new anticancer agents. Lancet Oncology 2: 221-225.
- Sennet SH (2001) Marine Chemical Ecology: Applications in Marine Biomedical Prospecting. In: McClintock JB and Baker BJ (Editors) Marine Chemical Ecology, CRC Press LLC, 523-566.

- Shigemori H, Tenma M, Shimazaki K, Kobayashi J (1998) Three new metabolites from the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Natural Products* 61: 696-698.
- Sigel MM, Welham LL, Lichter W, Dudeck LE, Gargus J, Lucas AH (1969) Anticellular and antitumoral activity of extracts from tropical marine invertebrates. In: Youngen HW Jr (Ed), *Food-Drugs from the Sea Proceedings*, pp. 281-294. Marine Technology Society, Washington, DC.
- Stoecker D (1980) Chemical defenses of ascidians against predators. *Ecology*, 61, 1327 - 1334.
- Suffness M & Pezzuto JM (1991) Assays related to Cancer Drug Discovery, in: *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 6. Biological Techniques, Academic Press, London, pp. 71-131.
- Takahashi C, Takai Y, Kimura Y, Numata A, Shigematsu N, Tanaka H (1995) Cytotoxic metabolites from a fungal adherent of a marine alga. *Phytochemistry* 38(1): 155-158.
- Torres YR, Bugni TS, Berlinck RGS, Ireland CM, Magalhaes A, Ferreira AG, Rocha RM (2002). Sebastianines A and B, novel biologically active pyridoacridine alkaloids from the Brazilian ascidian *Cystodytes dellechiaiei*. *Journal of Organic Chemistry* 26: 5429-5432.
- Unson MD & Faulkner DJ (1993) Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera). *Experientia* 49: 349.
- Van Wagoner RM, Jompa J, Tahir A, Ireland CM (2001) A novel modified pterin from a *Eudistoma* species ascidian. *Journal of Natural Products* 64: 1100-1101.
- Vera MD & Joullié MM (2002) Natural products probes of cell biology: 20 years of Didemnin research. *Medicinal Research Reviews* 22: 102-145.
- Veras ML, Bezerra MZB, Braz-Filho R, Pessoa ODL, Montenegro RC, Pessoa CO, Moraes MO, Costa-Lotufo LV (2004) Cytotoxic epimeric withaphysalins from leaves of *Acnistus arborescens*. *Planta Medica* 70: 551-555.



Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995) A novel assay for apoptosis - flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184: 39-51.



Vervoort H, Fenical W, Epifanio RA (2000) Tamandarins A and B: new cytotoxic depsipeptides from a Brazilian ascidian of the family Didemnidae. *Journal of Organic Chemistry* 65: 782-792.

Viracaoundin I, Faure R, Gaydou EM, Aknin M (2001) A new alkaloid from the purple Indian Ocean tunicate *Eudistoma bituminis*. *Tetrahedron Letters* 42: 2669-2671.

Watters DJ & van den Brenk AL (1993) Toxins from ascidians. *Toxicon* 31: 1349-1372.