



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

## **ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMETASTÁTICO DA BIFLORINA.**

ADRIANA ANDRADE CARVALHO

*Fortaleza - CE*

*2011*

Universidade Federal do Ceará  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMETASTÁTICO DA BIFLORINA.**

**Adriana Andrade Carvalho**

*Tese submetida à Coordenação do programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.*

**Orientador:**

**Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes**

**Fortaleza - CE**

**2011**

# **ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMETASTÁTICO DA BIFLORINA.**

**Adriana Andrade Carvalho**

Tese submetida à coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor 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.

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes**  
Universidade Federal do Ceará  
- Orientador –

---

**Prof. Dr. Giuliano di Pietro**  
Universidade Federal de Sergipe

---

**Prof. Dr. Márcio Viana Ramos**  
Universidade Federal do Ceará

---

**Profa. Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão**  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti**  
Universidade Federal do Ceará

*À minha mãe.*

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

---

C321e Carvalho, Adriana Andrade.

Estudo do potencial antimetastático da biflorina / Adriana Andrade Carvalho. – 2011.

119 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.

Área de Concentração: Ciências Biológicas.

Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes.

1. Metástase Neoplásica. 2. Adesão Celular. 3. Movimento Celular. 4. Melanoma. I. Título.

---

CDD 616.994

## Agradecimentos

Quando estava terminando de escrever essa tese senti como se um filme passasse na minha mente. Lembrei do primeiro dia em que cheguei, sozinha, em Fortaleza, e dos dias que se seguiram depois da minha chegada. Lembrei dos problemas que enfrentei, dos medos que venci, das descobertas que tive, dos amigos que fiz, das festas que freqüentei, dos experimentos, das cadeiras, dos professores, da vida de dona de casa, da distância, da saudade, dos problemas de saúde... Tantas coisas eu vivenciei em tão pouco espaço de tempo. E isso tudo construindo minha carreira acadêmica, meu futuro profissional, escrevendo, primeiro, uma dissertação, em seguida uma tese... E como diz minha mãe: no final da tudo certo.

E deu.

Por isso não posso deixar de agradecer a pessoas que ajudaram a construir esse meu caminho:

Em primeiro lugar meus pais, porque sem eles nada seria possível: **Leda Maria de Andrade Carvalho**, mamãe, que, com sua maneira singular, me amou e acreditou em mim da forma mais verdadeira que um ser humano é capaz; e ao meu pai **José Rocha de Carvalho**, por sempre estar disposto a fazer de tudo para o crescimento de todos os seus filhos;

Aos meus irmãos **Andrea Andrade Carvalho de Menezes**, pela força e por ter dado a essa família presente tão lindo: **Lívia Maria**; e ao meu irmão, **Adriano Andrade Carvalho**, pelas risadas, conversas no MSN, por compartilhar nosso amor pelos animais e informática e pela enorme ajuda na direção (hehe, coitado);

À minha filhinha **Lila**, por deixar meus dias mais coloridos e amorosos;

**Aos meus tios, tias, primos e primas** pela força!

**Em especial**, ao meu orientador, **Dr. Manoel Odorico de Moraes**, por, mais uma vez, me aceitar como orientanda, acreditar no meu potencial e me apoiar em todos os momentos, muito obrigada mesmo!

À **profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa**, uma pessoa maravilhosa que sempre acreditou no meu potencial e esteve ao meu lado em diversos momentos, profissionais e pessoais;

À **profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo** por ser essa pessoa justa, firme e representar um exemplo a ser seguido;

À **profa. Dra. Gardênia Carmem Gadella Militão** pela convivência aqui em Fortaleza, bate-papo e por aceitar participar na minha banca, sei que suas dicas serão valiosas;

Ao **prof. Dr. Giuliano di Pietro (UFS)** pela força, torcida e por aceitar participar da minha banca;

Ao **Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti** pela convivência, conversas científicas construtivas e por ter aceitado participar da minha banca;

Ao **prof. Dr. Márcio Viana Ramos** pelas dicas valiosas e por aceitar participar da minha banca;

À mestranda **Luciana Gregório de Souza Silva** pela extração da biflorina;

À **profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos** por ter me dado oportunidade em trabalhar com a biflorina;

Ao amigo **Ms. Elthon Goes Ferreira** pelas idas à praia em momentos de estresses e por sempre ser aquele amigo de verdade, que lhe ajuda sem pestanejar;

À amiga **Aline Sbardello** pela alegria, sinceridade, paz e por ter me ajudado no processo de defesa... "Tá" pra existir coração tão bom quanto o dela;

Ao amigo **prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra (UFS)**, por ser essa pessoa chata, insuportável, mas que sempre esteve presente, ajudando no que for preciso;

A todos do **Laboratório de Oncologia Experimental - LOE** pela ajuda, convivência, risadas, discussões (hehehe) e, sobretudo por formar essa família: **Patrícia Marçal, Gabriella Vieira, Assuero Silva e Aline Martins**, galera dos *bons drinks*; **Bruno Soares (Buh), Bruno Coelho (Nunin), Igor Cabral (Boy do LOE) e Sérgio Barros (Sombra)**, galera da genotoxicidade e dos *happy hours* de segunda-feira; **Washington Araújo, Arinice Costa, Kézia Lacerda e Evelyne** pela calma e paciência; **Danilo Rocha** do confocal e "citometria no Pirão"; **Delano Marinho, Jérsia (Sra. Marinho), Daniel, Deyse (eternamente dalith), Cecília Oliveira, Kézia Lacerda, Marcília, Hidemburgo e Michel Ferreira (homem-limão)**, por serem pessoas maravilhosas!

Ao baiano **Igor Ferreira** por ser essa pessoa da paz... Uma pena que não esteja aqui devido ao acidente do bondinho de Santa Tereza, mas sei que sua recuperação será rápida e eficaz!

À técnica **Silvana França** cujo trabalho é essencial ao laboratório. Sei que vai sentir saudades minhas, viu Sil?

Às secretárias **Adelânia Roque, Sheyla Prado e Aura Rhanes** por facilitarem nossas vidas! Obrigada **Adelânia** por tudo, sua ajuda foi, e continua sendo, essencial!

À **Rogéria e Erivanda** pelo apoio técnico;

Aos **funcionários** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia;

À bateria **Camaleões do Vila** por ser uma família para mim! Ser ritmista apenas aumentou minha disposição, força de vontade e convivência em Fortaleza;

À “showcalhete” **Lígia Rocha** pela sua amizade, por ser minha psicóloga particular e pela convivência... Sentirei muito a sua falta!

Ao “pré-sal”: **Danielly Ferreira, Liginha de novo rrsr, Caroline Brito, Neillinha Albuquerque, Samila Andrade, Michele Matheus, Mila Pereira** e todas que compõe esse grupo maravilhoso pelas saídas, alegria, descontração e, principalmente, amor ao samba! Obrigada meninas! Ta-ka-ti-ka-ta-tum-ta!

Ao pessoal da família Bob Fight: **Bob cabeça, Rosa, Camila vira-lata, Belinha, Lúcia, Valquíria, Rosinha, Edna, Aurélio, Júnior, Michele (camundongo Black), Paulinho, Gomes, Welder** e todos que fazem parte desta família, por tornar minha busca pela saúde mais agradável e pela descontração.

Às poucas, mas persistentes amigas de Aracaju-SE que, mesmo distante, não perderam contato: **Tchutchuca, Taci Chocolate e Denise;**

A **CAPES** pelo financiamento dessa pesquisa, o qual sem este não seria possível o desenvolvimento deste trabalho;

**Em especial**, aos poucos, mas existentes “**não-amigos**” por me tornar cada dia mais forte e conseguir enxergar com mais calor as pessoas boas que existem ao meu redor. Muito obrigada mesmo;

A **todos** que contribuíram diretamente e indiretamente com meu trabalho;

Meu mais sincero,

**OBRIGADA!**

*“Não viva para que a sua presença seja notada,  
mas para que a sua falta seja sentida.”*

*(Bob Marley)*

# Sumário

*Lista de Figuras*

*Lista de Tabelas*

*Lista de Símbolos e Abreviaturas*

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução .....	22
1.1 Metástase .....	23
1.1.1 Transição epitélio-mesenquimal (TEM) .....	24
1.2. Via do AKT e Metástase.....	29
1.2.1 Fatores que estimulam a fosforilação do Akt.....	36
1.2.2 Fosforilação e desfosforilação do Akt.....	37
1.3 Produtos Naturais .....	38
1.3.1. Planta de estudo – <i>Capraria biflora</i> .....	43
1.2.1. Substância de estudo: Biflorina .....	44
2. Objetivos .....	52
2.1. Geral.....	52
2.2. Específicos.....	52
3. Materiais e Métodos .....	54
3.1. Materiais utilizados.....	54
3.1.1. Equipamentos.....	54
3.1.2. Reagentes e Substâncias.....	55
3.1.3. Anticorpos Primários.....	56
3.1.4. Anticorpos Secundários.....	56
3.2. Manutenção das células .....	57
3.3. Obtenção da biflorina das raízes da <i>Capraria biflora</i> .....	57
3.4. Ensaio de citotoxicidade in vitro .....	58
3.4.1. Princípio do teste.....	58
3.4.2. Procedimento experimental .....	58
3.4.3. Análise dos dados .....	59
3.5. Densidade Celular – Coloração por Cristal Violeta.....	59
3.5.1. Princípio do Teste.....	59
3.5.2. Procedimento experimental .....	59

3.5.3. Análise dos Dados.....	60
3.6. Ensaio de Proliferação Celular utilizando Azul de Tripan .....	60
3.6.1. Princípio do Teste.....	60
3.6.2. Procedimento Experimental.....	60
3.6.3. Análise dos Dados.....	61
3.7. Ensaio de Migração Celular por Cicatrização ( <i>Wound Healing</i> ) .....	61
3.7.1. Princípio do Teste.....	61
3.8.2. Procedimento Experimental.....	61
3.7.3. Análise dos Dados.....	62
3.8. Ensaio de invasão celular .....	62
3.8.1. Princípio do teste.....	62
3.8.2. Protocolo Experimental.....	62
3.8.3. Análise estatística.....	63
3.9. Análise morfológica – coloração por May-Grünwald-Giemsa .....	64
3.9.1. Princípio do teste.....	64
3.9.2. Protocolo Experimental.....	64
3.9.3. Análise estatística.....	64
3.10. Coloração da F-actina – Microscopia Confocal .....	65
3.10.1. Princípio do teste.....	65
3.10.2. Protocolo Experimental.....	65
3.10.3. Análise estatística.....	66
3.11. Ensaio de Western Blot – expressão de moléculas de adesão do tipo caderina. ....	66
3.11.1. Princípio do teste.....	66
3.11.2. Protocolo Experimental.....	66
3.11.3. Análise estatística.....	69
3.12. Ensaio de Western Blot – via do Akt .....	69
3.12.1. Princípio do teste.....	69
3.12.2. Protocolo Experimental.....	69
3.12.3. Análise estatística.....	69
4. Resultados .....	71
4.1 Citotoxicidade .....	71
4.2. Coloração por Cristal Violeta.....	72
4.3 Azul de tripan .....	72
4.4 Ensaio de Migração Celular por cicatrização.....	75

4.5 Ensaio de Invasão Celular utilizando a câmara de Boyden modificada.....	75
4.6 Análise Morfológica – coloração por May-Grünwald-Giemsa .....	75
4.7 Estrutura e distribuição dos Filamentos de actina – Microscopia Confocal.....	80
4.8 Western Blot – Moléculas de adesão celular.....	80
4.9 Western Blot – via do Akt.....	80
5. Discussão.....	84
6. Conclusão .....	102
7. Referências bibliográficas.....	105

## Lista de Figuras

Figura 1. Adesão mediada pela E-caderina (CARVALHO, 2009).....	26
Figura 2. Invasão celular. (CARVALHO, 2009). .....	28
Figura 3. Migração da célula sobre substrato (CARVALHO, 2009).....	31
Figura 4. Cascata Metastática.....	32
Figura 5. Via de Sinalização PI3k/Akt (adaptado de DATTA <i>et al.</i> , 1999). .....	33
Figura 6. Via de Sinalização PI3k/Akt e metástase (adaptado de QIAO <i>et al.</i> , 2007). .....	35
Figura 7. Estrutura química do Gefitinib (1) e Erlotinib (2).....	36
Figura 8. Estrutura química de algumas substâncias com potencial antimetastático.....	41
Figura 9. Estrutura química de algumas substâncias com potencial antimetastático.....	42
Figura 10. Foto da espécie <i>Capraria biflora</i> (Foto de: T.L.G. LEMOS).....	45
Figura 11. Estrutura química da biflorina (11) .....	46
Figura 12. Ensaio de Invasão Celular utilizando insertos revestidos com Matrigel (BD).....	63
Figura 13. Ensaio de Citotoxicidade por Alamar blue.....	71
Figura 14. Ensaio de Citotoxicidade por Cristal Violeta.....	73
Figura 15. Ensaio de Exclusão por Azul de Tripán. ....	74
Figura 16. Ensaio de Migração Celular. ....	76
Figura 17. Ensaio de Invasão Celular. ....	77
Figura 18. Microfotografias das células que invadiram o Matrigel. ....	77
Figura 19: Ensaio de coloração por May-Grunwald-Giemsa. . ....	78
Figura 20. Microscopia Confocal.....	79
Figura 21. Ensaio de Western blot para Moléculas de Adesão. ....	81
Figura 22. Ensaio de Western blot para Via de Sinalização PI3k/Akt. ....	82
Figura 23: Reação Enzimática – Alamar blue .....	86
Figura 24. Via do PI3K/Akt .....	95
Figura 25 Mecanismo de ação da biflorina.....	100

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1. Concentrações mínimas inibitórias (CMI) da biflorina e de seus produtos de degradação pela luz natural (GONÇALVES DE LIMA et al., 1961).....</b>	<b>49</b>
---	-----------

## Lista de Símbolos e Abreviaturas

ANOVA	<i>Analisis of Variance</i> (Análise de variância)
AKT	Proteína quinase B
BSA	Soro Albumina Bovina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, Brasil
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
CMI	Concentrações mínimas inibitórias
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P.M.	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GSK-3b	Quinase glicogênio sintase – 3 beta
H/E	Hematoxilina/Eosina
HGF	Fator de crescimento hepático

IC	Intervalo de Confiança
IGF-I	Fator de crescimento insulina-símile
MB	Membrana basal
MDAMB-435	Linhagem celular de melanoma humano
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEKK	Quinase ativadora da MAP quinase
LEF/Tcf	<i>Lymphoid Enhancer Binding Factor/ T Cell-Specific Factor</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase
m-TOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
MT-MMP	Metaloproteinase ligada a membrana
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NHERF	Fator regulatório do trocador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)

PH	Domínio contendo pleckstrina
PI3K	Fosfoinosítido-3-quinase
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PDK-1	Proteína quinase dependente de fosfatidilinositol-1
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PTEN	Homólogo da Fosfatase e Tensina
O-	Orto
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPM	Rotação por minuto
RTQ	Receptores de Tirosina Quinase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser-	Serina
SFK	Quinases da família Src

STAT3 Transdutor de Sinal e *Ativador* da Transcrição 3

TIMP Inibidor tecidual das metaloproteinases

Thr- Treonina

VEGF Fator de crescimento do endotélio vascular

Wnt *Wingless*

## RESUMO

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMETASTÁTICO DA BIFLORINA. Tese de doutorado. Autora: Adriana Andrade Carvalho. Orientador: Manoel Odorico de Moraes. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, UFC, 2011.**

A presença de metástase permanece como a principal causa de morte pelo câncer. Diante da ausência de terapia farmacológica para o tratamento de tumores secundários, a pesquisa de novas drogas com potencial antimetastático é de suma importância para o desenvolvimento de novos fármacos anticâncer. Neste quadro, decidimos avaliar o potencial antimetastático da biflorina, uma o-naftoquinona isolada das raízes da *Capraria biflora*. Em ensaio de proliferação celular por Alamar blue, observamos que esta quinona possui atividade citotóxica contra melanoma humano (MDAMB-435) a partir da concentração 5  $\mu\text{M}$  em 24h de exposição. Porém, nessa mesma dose, não houve efeito citotóxico em 12h de exposição. Ensaios de azul de tripan e cristal violeta mostraram que nas concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  durante 12h de exposição a biflorina não possui efeito citotóxico. Utilizando as concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  (12h exposição) foram realizados ensaio de migração e invasão celular. Nestes ensaios observamos que a biflorina diminui a motilidade e a invasividade da célula MDAMB-435. Em análise morfológica das células, utilizando coloração de May-Grunwald-Giemsa e coloração de actina por faloidina, observamos que a biflorina altera a organização do citoesqueleto de actina, com a presença de células menores, retraídas e células maiores com expansões filamentosas semelhantes à filopódios. Em ensaio de Western blot observou-se a diminuição na expressão da molécula de adesão N-caderina e inibição da via de sinalização PI3K/Akt. Estes resultados conferem à biflorina um potencial antimetastático bastante promissor.

**Palavras-chave:** Metástase, Biflorina, Adesão celular, Migração Celular, Melanoma.

## **ABSTRACT**

**STUDY OF ANTI-METASTATIC POTENTIAL OF BIFLORIN.** Adriana Andrade Carvalho. Advisor: Manoel Odorico de Moraes. Master's dissertation. Postgraduate Program of Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, UFC, 2011.

Metastasis remains the leading cause of death from cancer. Due to the absence of pharmacological therapy for the treatment of secondary tumors, the search for new drugs with antimetastatic potential is important to the development of new anticancer drugs. In this context we decided to evaluate the antimetastatic potential of biflorin, an o-naphthoquinone isolated from roots of *Capraria biflora*. In cell proliferation assay using Alamar blue, we found that this quinone has cytotoxic activity against human melanoma cells line (MDAMB-435) at 5  $\mu\text{M}$  concentration during 24 hours of exposure. However, with this same dose, there was no cytotoxic effect within 12 hours of exposure. Trypan blue and crystal violet assay showed that biflorina has no cytotoxic effect at 1.0, 2.5 and 5.0  $\mu\text{M}$  during 12 hours of exposure. Migration assay and cell invasion assay were performed using concentrations of 1.0, 2.5 and 5.0  $\mu\text{M}$  (12h exposure). In these trials we found that biflorin decreases cell motility and invasiveness. In morphological analysis of cells stained using May-Grunwald-Giemsa and actin stain by phalloidin, we observed that biflorin alters the organization of the actin cytoskeleton, with the presence of smaller, retracted and larger cells. In Western blot assay we observed a decrease in the expression of the adhesion molecule N-cadherin and inhibition of PI3K/AKT signaling pathway. These results give biflorin as an agent with promising antimetastatic potential.

**Keywords:** Metastasis, Biflorin, Cell adhesion, Cell migration, Melanoma.

# ***Introdução***

## 1. Introdução

O melanoma cutâneo é uma neoplasia oriunda de melanócitos epidérmicos (MADDODI & SETALURI, 2008). É um câncer altamente invasivo e agressivo, com elevada taxa de mortalidade que resulta de interações de fatores genéticos e ambientais (WINSEY *et al.*, 2000; SLOMINSKI *et al.*, 2001). A incidência e mortalidade do melanoma estão em ascensão em todo o mundo (DADRAS *et al.*, 2005; RIGEL *et al.*, 2008) e é previsto que continue a crescer como resultado de uma redução contínua da concentração do ozônio estratosférico (WEI *et al.*, 2003). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), foi estimado, para 2010, 2.960 casos novos em homens e 2.970 casos novos em mulheres de melanoma. A sobrevida média estimada em cinco anos foi de 73% nos países desenvolvidos, enquanto que nos países em desenvolvimento foi de 56%. A média mundial estimada foi de 69% (INCA, 2009).

O prognóstico dos pacientes com melanoma depende do estágio do tumor à época do diagnóstico e é normalmente baseado nos parâmetros histopatológicos e na avaliação clínico-radiológica de possíveis metástases. Dentre os parâmetros prognósticos, a espessura tumoral é o mais sensível em prever o risco de metástases. Entretanto, ainda é difícil de determinar o prognóstico individual para os pacientes, uma vez que melanomas de espessura mais fina também podem resultar em metástases letais (DADRAS *et al.*, 2005).

Entretanto, os melanomas quando são detectados precocemente, podem resultar em cura clínica pela remoção cirúrgica, sendo que 80% dos casos são tratados dessa maneira. No entanto, na fase metastática não há um tratamento efetivo, pois os indivíduos são frequentemente resistentes à terapia (RASS & HASSEL, 2009). Os mecanismos subjacentes a esta resistência varia de acordo com diferentes drogas, podendo ser intrínseca ou adquirida. No melanoma a resistência parece estar intimamente relacionada com a regulação de vias de reparo de DNA nas células do

melanoma. Múltiplos caminhos são ativados em resposta ao dano genotóxico induzido pela quimioterapia, começando com o reconhecimento de danos no DNA e culminando em morte celular programada. Falha em qualquer ponto ao longo desta cascata de eventos pode resultar em resistência (TAWBI & BUCH, 2010).

## 1.1 Metástase

O termo metástase pode ser definido como o processo pelo qual as células tumorais invadem o tecido adjacente e percorrem o organismo até se alojarem em um outro tecido, diferente daquele de origem, promovendo, então, o desenvolvimento de tumores secundários (CARVALHO, 2009; RIETHDORF *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2008). O termo foi inicialmente utilizado pelo cirurgião francês Jean-Claude Recamier, em 1829, aplicando-o para designar uma lesão cerebral em uma paciente portadora de câncer de mama (RECAMIER, 1829).

Um grande número de fatores estão envolvidos no processo de metástase, como algumas citocinas, quimiocinas, hormônios, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular, metaloproteinases de matriz (MMP) e o próprio microambiente tumoral (MIYATA *et al.*, 2006; VESTEEGE *et al.*, 2004).

A formação dos tumores secundários tem sido descrito como uma série complexa de eventos o quais podemos citar: perda da adesão celular, invasão, migração e circulação no sangue e linfonodos (HAN *et al.*, 2006), seguida da sobrevivência destas células na circulação, chegada ao tecido distante, formação de novos vasos sanguíneos e, enfim, crescimento tumoral (CARVALHO, 2009; ZHAO *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2006).

Felizmente nem todas as células cancerosas possuem a capacidade de formar metástase. De uma forma geral, para os carcinomas, as transformações que ocorrem na célula tumoral para um caráter invasivo requerem que estas células passem por um processo denominado transição

epitélio-mesenquimal (TEM) (THIERY & SLEEMAN, 2006; THIERY *et al.*, 2002), isto é, perca algumas características epiteliais para adquirir atributos peculiares das células mesenquimais.

As células mesenquimais, ao contrário das epiteliais, são fracamente organizadas e despolarizadas, e possuem como característica primordial a expressão de uma proteína do citoesqueleto, a vimentina, a qual desempenha um papel preponderante na alteração da forma, adesão e motilidade celular (MENDEZ, 2010). Além disso, as células mesenquimais possuem uma alta capacidade migratória, o qual confere, às células tumorais que apresentam o fenótipo mesenquimal, a capacidade de migrar e invadir o tecido adjacente (SHI & WU, 2008).

### 1.1.1 Transição epitélio-mesenquimal (TEM)

O primeiro passo para a transição epitélio-mesenquimal é a perda da adesão célula-célula, que mantém a coesão entre as células do tumor. Estas junções podem ser do tipo: aderentes, junções firmes (ou *Tight junctions*) e desmossomos, os três principais tipos de adesão molecular entre as células epiteliais que são essenciais para manter a arquitetura tissular e sua polaridade. A perda da função de proteínas de adesão tem sido um dos marcadores mais bem caracterizado para indicar o processo de TEM (BEAVON *et al.*, 1999).

A adesão célula-célula é mediada principalmente por uma superfamília de moléculas de adesão chamadas caderinas (Figura 1), glicoproteínas transmembranares, homodiméricas, formadas por 700-750 aminoácidos (KOCH *et al.*, 1999).

As caderinas formam ligações homofílicas (ligação entre duas moléculas de adesão iguais: caderina-caderina) cálcio-dependente (KURCHAT & MAUCH, 2000). A maioria das caderinas está ligada à actina do citoesqueleto através da interposição de um complexo de proteínas de ancoramento intracelular denominada cateninas (Figura 1) (GUMBINER, 2000), o qual é essencial para a eficiência da adesão célula-célula (KOCH *et*

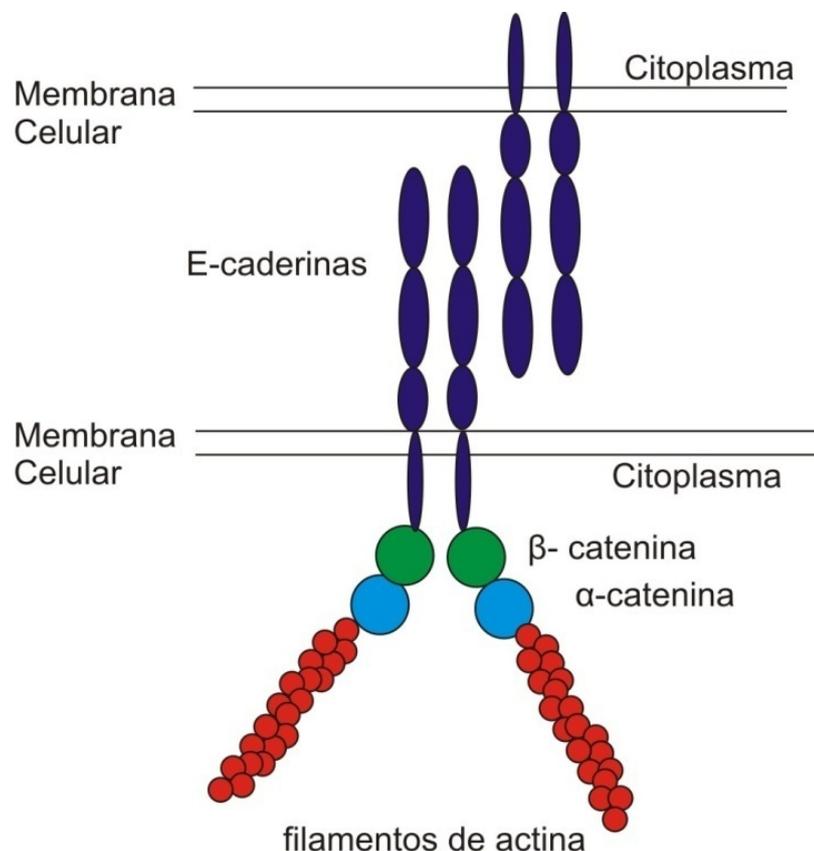
*al.*, 1999; ALBERTS, 2004). Na ausência de cálcio, as caderinas sofrem alterações conformacionais estando na sua forma “inativa” e são degradadas por enzimas proteolíticas (KOCH *et al.*, 1999) (Figura 1).

A molécula de E-caderina, que é expressa por células epiteliais, é a que se encontra mais frequentemente alterada em tumores. Diferentes estudos revelaram que a E-caderina é frequentemente inativada durante o desenvolvimento de carcinomas humanos, incluindo carcinomas de mama, colon, próstata, estômago, fígado, pele, rim e pulmão e está associada à invasão e a formação de metástases em linfonodos e à distância (NEAL & BERRY, 2006; GUMBINER, 2000).

A perda funcional de E-caderina também está associada ao desenvolvimento de melanomas. Melanócitos encontram-se frequentemente na camada basal da epiderme, onde interagem com queratinócitos, formando a chamada unidade de pigmentação da pele. A perda de expressão de E-caderina parece ser um passo crítico na progressão de melanomas, permitindo que as células tumorais sejam liberadas da epiderme e invadam a derme. Ao deixar de expressar E-caderina, as células de melanoma passam a expressar altos níveis de N-caderina, potencializando as interações com fibroblastos e células endoteliais que também expressam N-caderina (HSU *et al.*, 2000).

Após as células tumorais se soltarem do tumor primário (com a perda da expressão da E-caderina), estas devem ser capazes de migrar e invadir o estroma adjacente, processo chamado de invasão celular (Figura 2). Células tumorais com fenótipo mesenquimal são capazes de induzir a degradação da matriz extracelular (MEC) facilitando a migração celular. Este processo ocorre com a secreção de proteases, como as metaloproteinases de matriz (MMP), ou ativadores de protease, como o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA). As proteases não somente causam degradação dos componentes da MEC. A clivagem de proteínas da matriz também gera sítios de ligação para moléculas de adesão do tipo integrinas, as quais irão ligar-se aos substratos da MEC possibilitando a invasão celular. Além disso,

essas proteases também clivam e ativam fatores de crescimento ou quimiocinas que induzem a motilidade celular (KOBLINSKI *et al.*, 2000).



**Figura 1. Adesão mediada pela E-caderina (CARVALHO, 2009).**

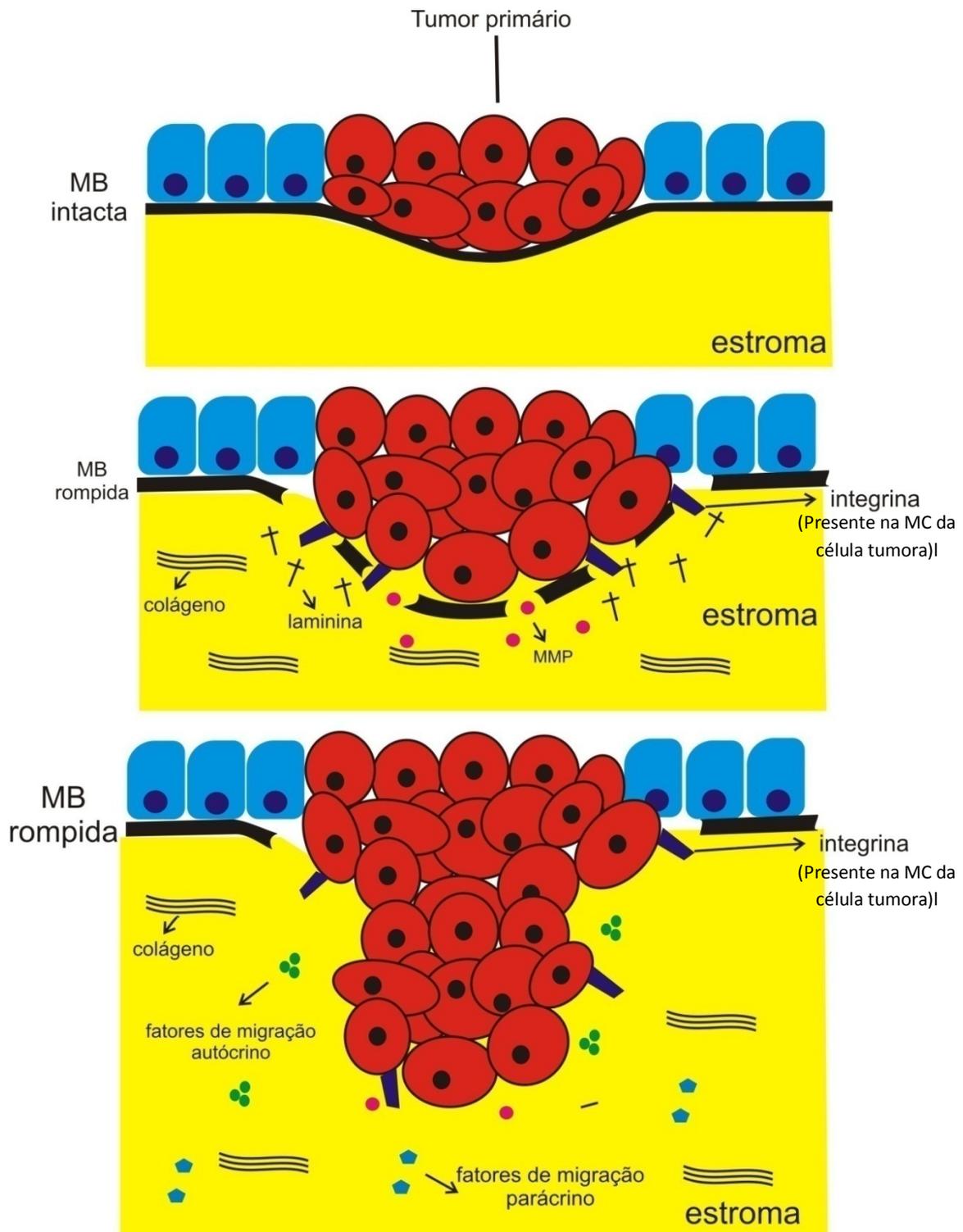
Após as células secretarem as proteases, estas devem ser capazes de migrar ao longo da MEC até alcançar a corrente sanguínea.

O processo de migração celular é extremamente complexo (HOSOOKA *et al.*, 2001), dependente do córtex rico em actina existente abaixo da membrana citoplasmática (ALBERTS, 2004). Três atividades distintas estão envolvidas nesse processo: a protrusão, na qual estruturas ricas em actinas são empurradas para fora da borda anterior da célula; ligação, em que o citoesqueleto de actina conecta-se através da membrana

citoplasmática com o substrato; e tração, na qual uma massa citoplasmática é arrastada e puxada pra frente (Figura 3) (ALBERTS, 2004).

De forma mais detalhada, a migração celular pode ser explicada da seguinte forma: o processo é iniciado com a formação de uma protrusão da borda anterior da membrana celular denominada lamelipódia. A lamelipódia é ancorada ao substrato da MEC através de moléculas de adesão do tipo integrina, formando o chamado complexos focais, o qual estabiliza a protrusão. De forma coordenada à formação da protrusão, contrações ao longo do corpo da célula promovem a perda de adesão ao substrato seguida de retração da membrana, o que leva a translocação do corpo celular para frente. Ocorre, então uma reorganização do citoesqueleto o qual altera a morfologia da célula. A força responsável para impulsionar a célula adiante resulta da polimerização da actina que forma a lamelipódia (POLLARD & BORISY, 2003) o qual gera uma pressão que empurra a membrana plasmática adiante e gera uma protrusão anterior mais longa.

Este processo faz com que os filamentos de actina, chamado de fibras de estresse (*stress fibers*), terminem em sítios de adesão maiores e mais afastados chamados adesão focal. Este processo resulta em forças contráteis geradas pela contração da miosina nas fibras de actina (*stress fiber*) a qual puxa a célula contra a adesão focal e induz a retração da porção posterior da célula (MITCHISON & CRAMER, 1996). Em consequência a essa ação, ocorre um movimento celular adiante ao longo de um substrato seguida de sucessivas adesão e desadesão celular em um substrato da MEC, funcionando como uma espécie de “pés” os quais permitem o deslocamento celular (Figura 3).



**Figura 2. Invasão celular.** As células tumorais aderem à membrana basal através de receptores de adesão do tipo integrina. Após a adesão, as células liberam proteases que irão degradar os componentes da MB e do estroma tumoral. Por fim, as células migram ao longo da matriz extracelular até alcançar a corrente sanguínea ou linfática. MB = Membrana Basal; MMP = Metaloproteinase; MC = Membrana Celular (CARVALHO, 2009).

Após migrar ao longo do estroma, as células tumorais terão acesso à circulação sanguínea atravessando a membrana basal vascular (ROBBINS, 2004). Ao entrar na corrente circulatória, a maior parte das células é destruída por linfócitos NK (*natural killer*) e fagócitos polimorfonucleares. Algumas células tumorais podem aderir às plaquetas circulantes, sendo esta interação mediada por integrinas. A interação das células metastáticas com plaquetas parece ser um fator importante na metastatização, principalmente no desenvolvimento de metástase pulmonares, já que esta interação funciona como uma espécie de camuflagem para células tumorais, que, assim, conseguem escapar dos leucócitos circulantes. Além disso, essa interação célula tumoral-plaquetas pode resultar em pequenos trombos que são aprisionados nos pequenos vasos sanguíneos dando origem a novos focos metastáticos.

Finalmente, este ciclo é repetido quando as células tumorais deixam a árvore vascular e se instalam na MEC do órgão distante, com a deposição de um nódulo metastático e a formação de novos vasos (angiogênese) que irão nutrir esse novo tumor (ROBBINS, 2004).

Toda a cascata metastática está exemplificada na Figura 4.

## **1.2. Via do AKT e Metástase**

É bem estabelecido na literatura que a formação de tumores secundários exige transformações celulares para um fenótipo mesenquimal. Esta transformação está relacionada com alterações bioquímicas e moleculares da célula tumoral o qual faz com que a célula tumoral expresse proteínas que a torne capaz de invadir o estroma adjacente, sobreviva na corrente sanguínea e se adapte a um novo microambiente.

Diversas proteínas já foram descritas e estudadas a respeito do seu papel sobre a malignidade tumoral, dentre elas podemos citar: a perda da

expressão da E-caderina, aumento da expressão da N-caderina, expressão de MMPs e, um pouco mais recente, o aumento da expressão do Akt.

A Akt é uma serina/treonina quinase envolvida em diversas vias de transdução de sinal, participando de muitos efeitos biológicos que induzem a sobrevivência celular. A Akt é ativada por vários estímulos, como fatores de crescimento, citocinas e hormônios (KIM & CHUNG, 2002; MANNING & CANTLEY, 2007).

O Akt é, por diversas vezes, designado como *Master Regulator* já que, quando ativado por fosforilação, modifica, ao menos, dez proteínas regulatórias. Isto é importante para a iniciação de algumas vias tanto em células normais quanto células cancerosas.

O Akt possui um papel central em uma variedade de processos oncogênicos incluindo o crescimento celular, proliferação, apoptose, motilidade, transição epitélio-mesenquimal (TEM), angiogênese e metástase (AGARWAL *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2007; CHENG *et al.*, 2008).

A atividade do Akt é um ponto crítico para a transdução de sinal de diversos fatores extracelulares incluindo a insulina, IGF-1 e EGF e sinais intracelulares (receptor de tirosina quinase mutado/ativado, PTEN, Ras e Src) que regulam a fosforilação de seus efetores, como NF- $\kappa$ B, mTOR, Forkhead, Bad, GSK- $\beta$  e MDM-2. Estas fosforilações medeiam o efeito do Akt sobre o crescimento celular, apoptose, migração celular entre outros (MITSIADIS *et al.*, 2004) (Figura 5). Para se ter uma idéia, foi demonstrado por Stiles e col. (2002) que a deleção homozigota ou mutação do gene que codifica o PTEN, inibidor do PDK1 (um dos ativadores do Akt), tanto em humanos quanto em modelos animais está relacionado com o aumento da tumorigenicidade e metástase (STILES *et al.*, 2002).

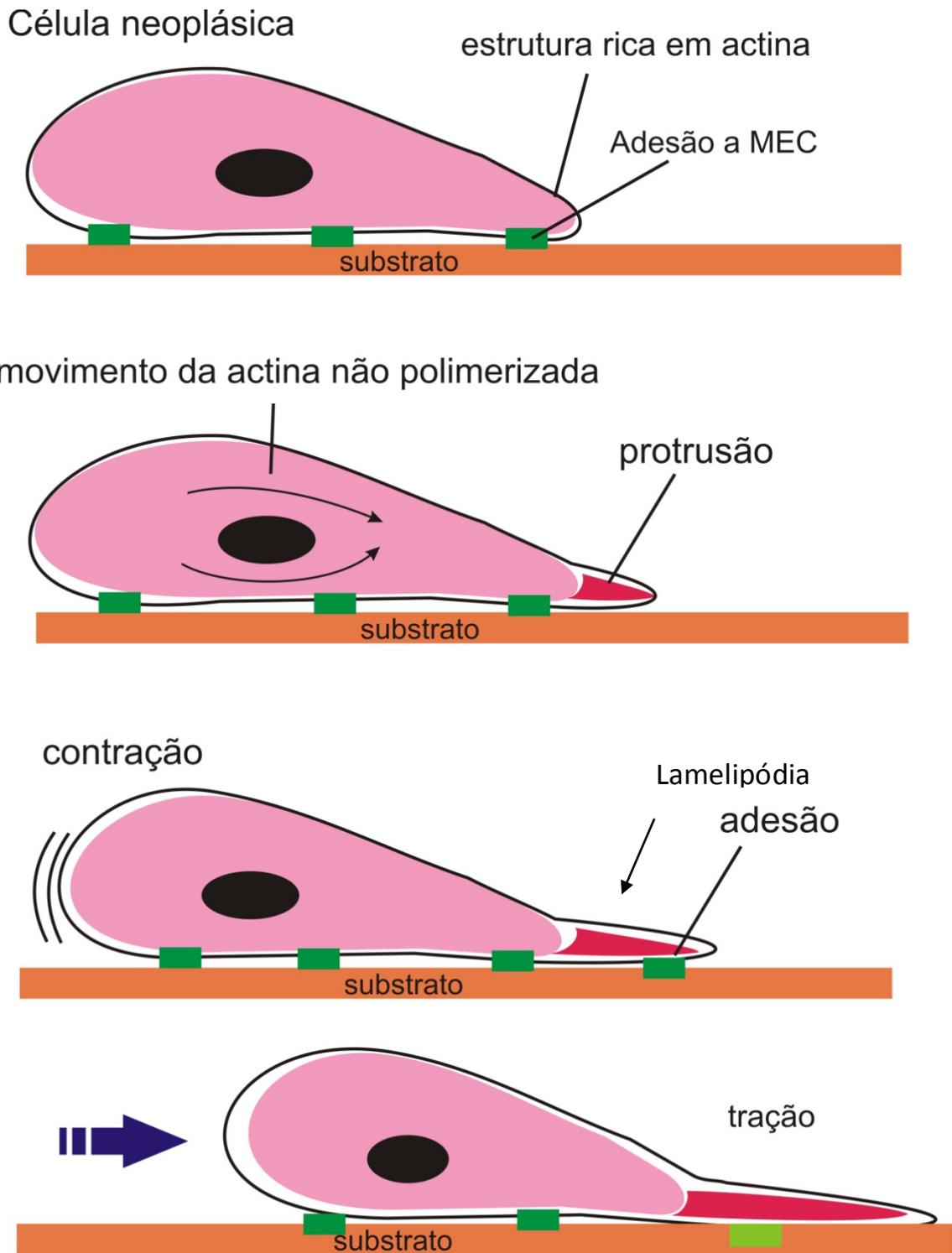


Figura 3. Migração da célula sobre substrato (CARVALHO, 2009)

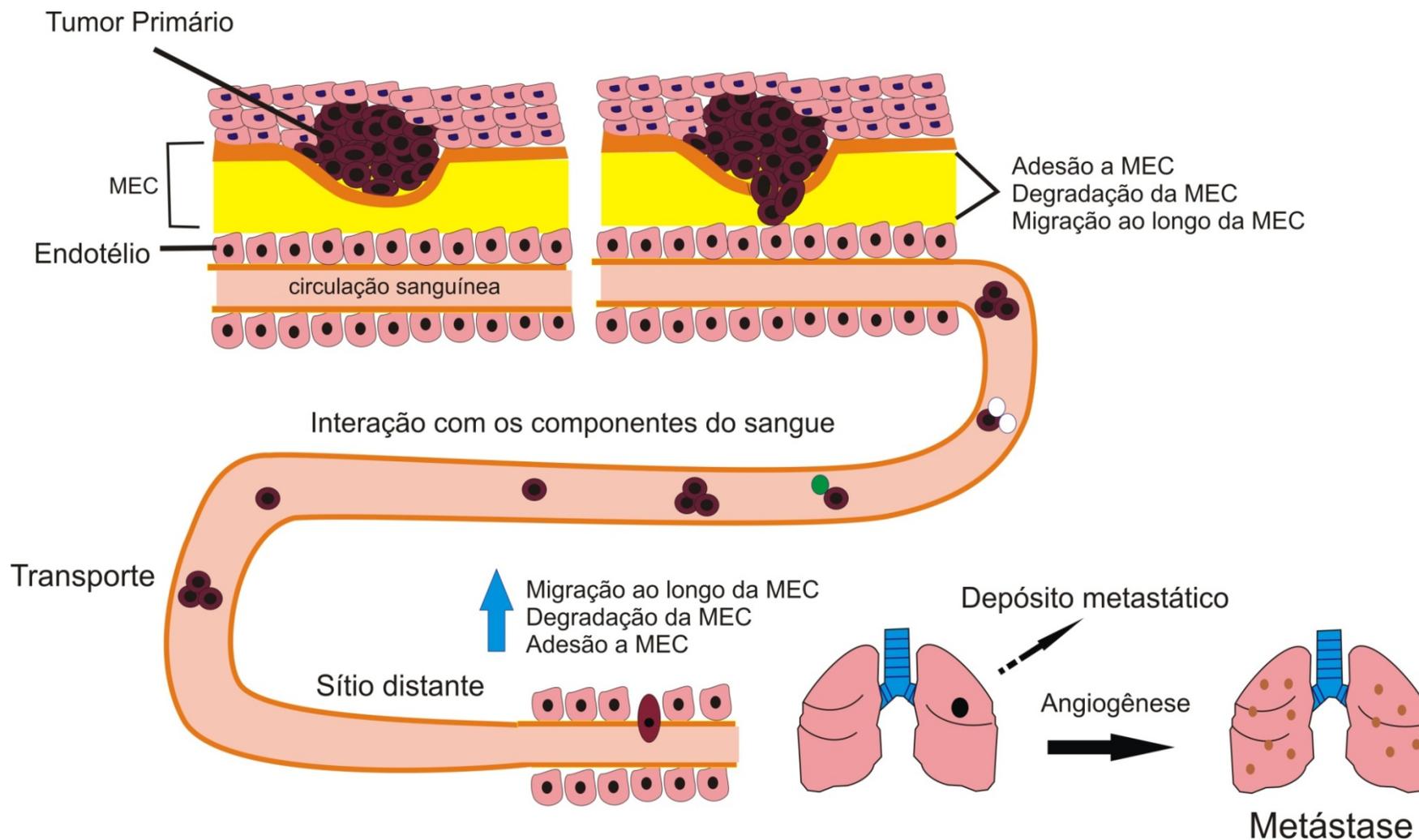
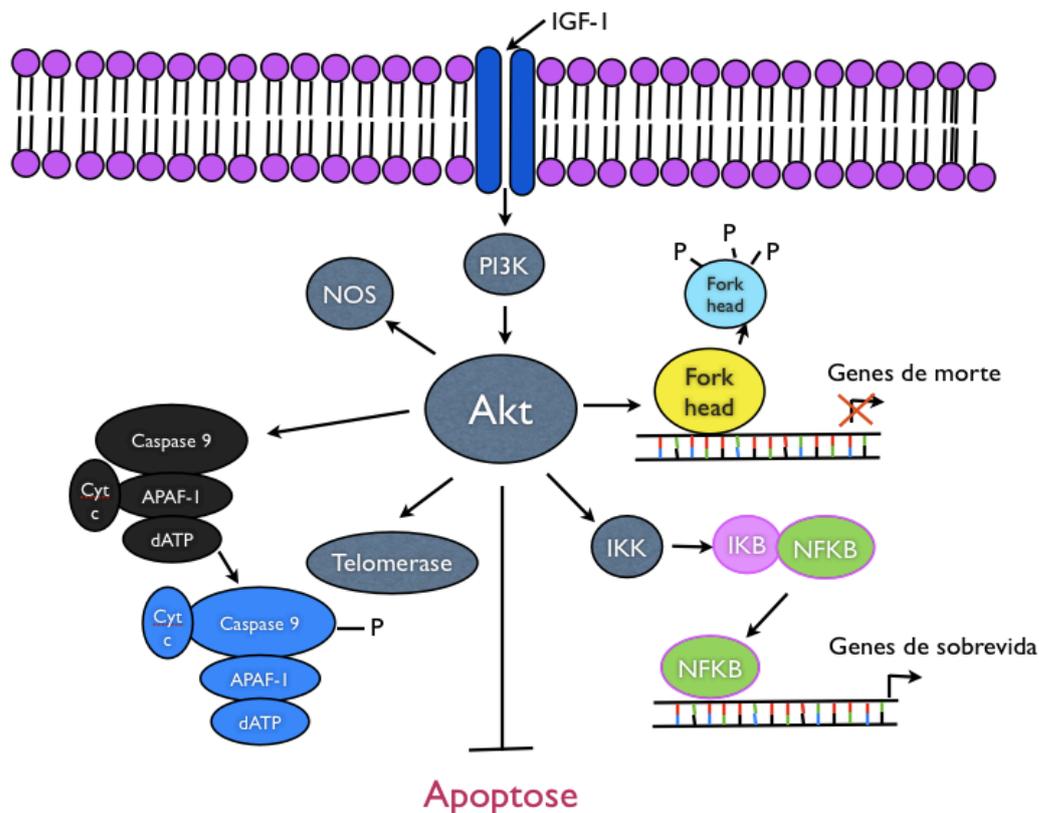


Figura 4. Cascata Metastática. MEC: Matriz extracelular; esferas brancas: plaquetas; esferas verdes: leucócito (CARVALHO, 2009)

Existem 3 isoformas do Akt (1, 2 e 3) e sabe-se que todos comportam-se como substrato para o PI3k o qual promove sobrevivência celular e resistência a apoptose. Entretanto, foi observado que a isoforma Akt-1 está relacionada com a invasão celular e metástase enquanto que Akt-2, apesar de também ter sido relacionada com a formação de metástase, está especificamente relacionado com a transição epitélio-mesenquimal (TEM) (QIAO *et al.*, 2007).



**Figura 5.** O papel da Akt na regulação da sobrevivência celular pela fosforilação de múltiplos substratos envolvidos na regulação da apoptose. A Akt regula a atividade transcricional dos membros da família *Forkhead* e NF- $\kappa$ B através da fosforilação e inativação da caspase-9 e Bad. Além disso, outros alvos da Akt, incluindo telomerase e NOS podem exercer importantes papéis na sobrevivência celular (adaptado de DATTA *et al.*, 1999).

A relação da formação de metástase e ativação do Akt está em intenso estudo. Sabe-se que a metástase tumoral pode ser tanto iniciada quanto sustentada através da ativação da via de Akt. Foi observado por Ju e col. (2007) que uma deleção no gene que codifica Akt-1 diminui a formação de metástase em camundongos transplantados com células de câncer de mama

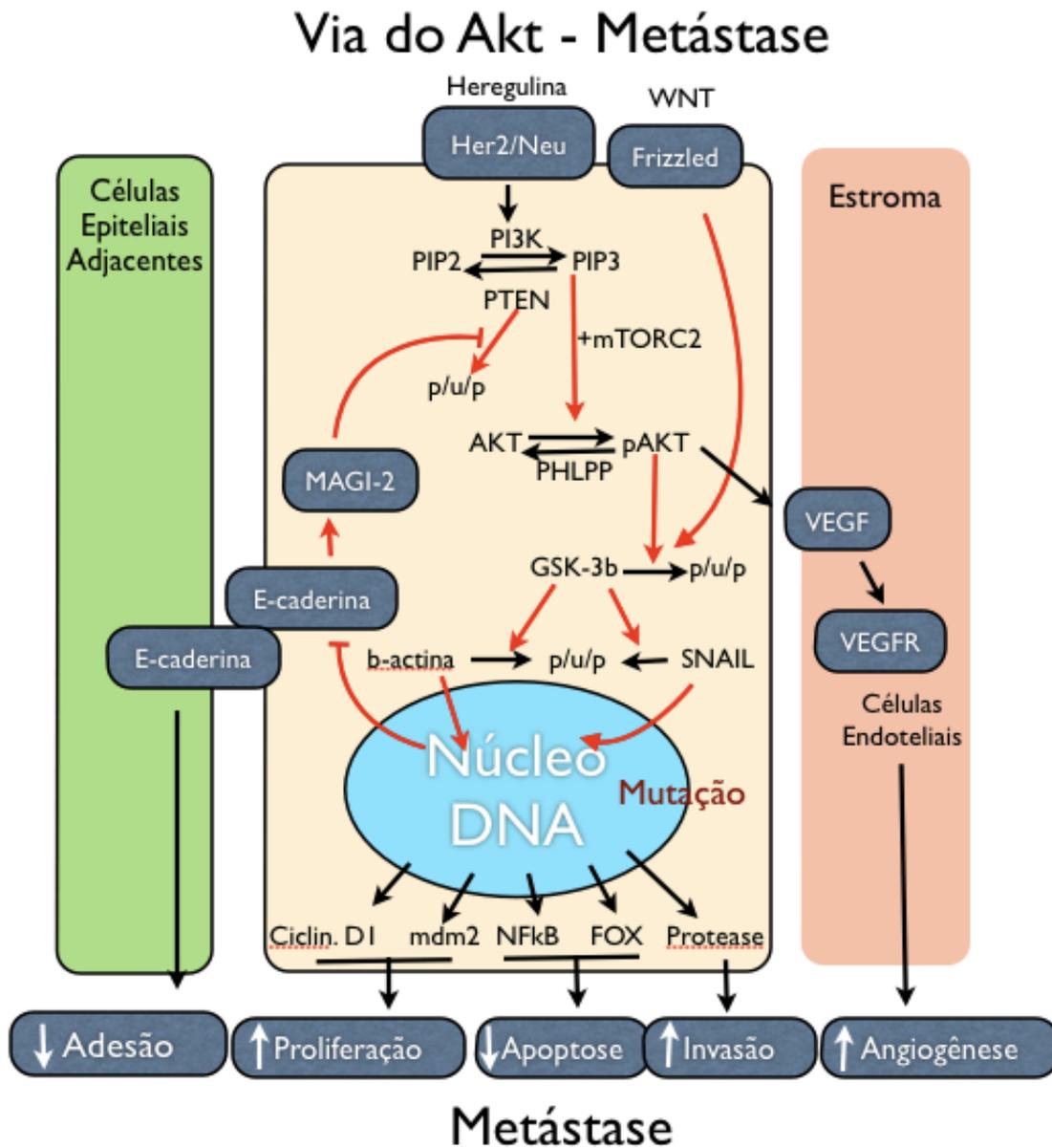
HER2. Foi observado também que níveis elevados de Akt estão presentes em células de câncer de próstata em relação ao tecido normal, e que RNAsi contra Akt-1 inibe a invasão e migração celular (QIAO *et al.*, 2007).

Além desses achados, foram observados níveis elevados de Akt fosforilado em células humanas de câncer de mama metastático quando comparado a células tumorais não-metastáticas adquiridos de forma mais prévia do mesmo paciente. Observou-se, também, que o RNAsi contra Akt bloqueia a migração celular, indicando que a ativação do Akt é necessário para a formação de metástase destas células (QIAO *et al.*, 2007).

A super-expressão de Akt1 está associado com o aumento da atividade das MMPs através da ativação da ligação de NF-kB ao promotor de metaloproteinase da matriz (PARK *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2001), e sua habilidade em modular a angiogênese, através do VEGF, o qual também contribue para a sobrevida tumoral (JIANG *et al.*, 2000).

A relação da ativação do Akt e formação de metástase está simplificada na figura 6.

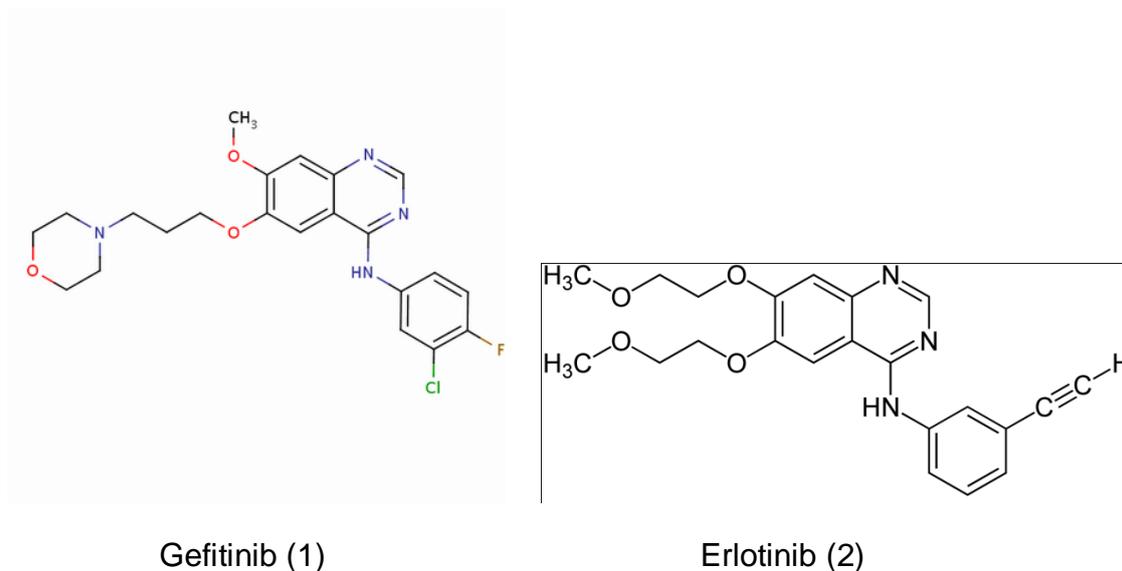
Apesar das pesquisas a cerca do papel da via do Akt e o fenótipo metastático de células tumorais, mais estudos são necessários para o entendimento completo do mecanismo de ativação do Akt e sua conexão molecular com a formação de células metastáticas. Entretanto sabe-se hoje que drogas que possam alterar a via do Akt tornam-se possíveis candidatas para o desenvolvimento de terapias farmacológicas para o tratamento do câncer metastático.



**Figura 6.** Via da ativação do Akt e sua relação com a formação de fenótipos metastáticos (adaptado de QIAO *et al.*, 2007).

Neste enfoque, podemos citar inibidores de EGFR, como gefitinib **(1)** e erlotinib **(2)** os quais bloqueiam o crescimento celular *in vitro* da linhagem celular NSCLC (Câncer de pulmão de células não pequenas) por inibir a fosforilação de proteínas chaves incluindo as MAP-quinases e o próprio Akt. Trastuzumab, um anticorpo monoclonal, direciona-se contra o HER2-receptor de tirosina quinase, inibindo a fosforilação do Akt o qual parece estar envolvido

com o bloqueio da formação de micro-metástase de câncer de ovário em camundongos (NAHTA *et al.*, 2006). Foi observado, também, que os níveis do Akt fosforilado encontra-se aumentado em células de SKBR3 (adenocarcinoma de mama) resistente a trastuzumab (QIAO *et al.*, 2007).



**Figura 7. Estrutura química do Gefitinib (1) e Erlotinib (2)**

### 1.2.1 Fatores que estimulam a fosforilação do Akt.

Múltiplos estudos clínicos têm relatado que existe uma associação positiva entre altos níveis de fator de crescimento insulina-símile (IGF-I) e risco em diferentes tipos de câncer. IGF-I liga-se ao receptor específico do tipo tirosina quinase o qual desencadeia um processo de transdução de sinal o qual ativa proteínas quinases mitogênicas (MAPK) e a via PI3K/Akt. IGF-I está envolvido em diferentes estágios na progressão tumoral: transformação maligna, crescimento tumoral, invasão local e metástase distante, além de resistência ao tratamento (GRIMBERG *et al.*, 2003).

A interação entre o fator de crescimento hepático (HGF), uma citocina derivada mesenquimal e seu receptor de tirosina quinase c-Met, também está

associado com a invasão celular. HGF aumenta a migração celular ao ativar a via PI3K/Akt atuando sobre a E-caderina (*downregulation*), molécula de adesão celular, em células de melanoma. HGF também induz resistência a morte celular por *anoikis* em células de câncer endometrial, possivelmente via PI3K/Akt resultando em aumento da expressão da COX-2 (KANAYAMA *et al.*, 2008). Receptor RON, uma tirosina quinase pertencente a família c-Met, é superexpressa e contribui para a invasividade de câncer colorretal por ativação constitutiva de PI3K e Akt (LIU *et al.*, 2007).

As quinases da família Src (SFK) são receptores quinases não tirosina que são superexpressas em muitos cânceres diferentes e estão associadas a TEM, o aumento da capacidade de invasão e transformação maligna. SFKs medeia fator de crescimento e migração estimulada por integrinas e regula progressão do ciclo celular e sobrevivida através da via de sinalização PI3K/Akt. Eles desempenham um papel importante na tumorigênese e quimio-resistência via ativação de STAT3, PDK1 e Akt (WARMURTH *et al.*, 2003).

Receptores acoplados a proteína G (GPCR) também estão envolvidos em muitos processos de receptor de tirosina quinase ativados, incluindo a transformação maligna. Os GPCR acoplam a uma proteína G específica ativando efetores que por sua vez iniciam uma cascata de sinalização celular. Estes receptores controlam a sobrevivida celular através de PI3K e Akt (McCUBREY *et al.*, 2007). Diversos outros fatores de crescimento e citocinas, incluindo, FGF, VEGF e interleucinas também ativam a via PI3K/Akt (QIOMA *et al.*, 2008).

### 1.2.1 Fosforilação do Akt.

Uma vez ativado e localizado na membrana plasmática, PI3K catalisa a conversão do fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), o qual atua recrutando proteínas que possuem domínios contendo pleckstrina (PH) como o AKT e PDK1 (quinase dependente de

fosfoinosítido 1) a membrana. AKT é recrutada para a membrana celular por PIP3, e então é fosforilada e ativada (QIOMA *et al.*, 2008).

A ligação do AKT a membrana pode ser ativada através de dois tipos de fosforilação: através da PDK1, na Thr-308, e pela PDK2 na Ser-473. Estas ativações são independentes, entretanto ambos são necessários para a ativação total do AKT. A quinase PDK1 também ativa a  $\beta$ -catenina e o c-myc. Foi observado que uma diminuição de PDK1 protege camundongos que não expressam PTEN de desenvolver neoplasias malignas do que aqueles que expressam PDK1 de forma normal (FENG *et al.*, 2004; GUERTIN *et al.*, 2006; JACINTO *et al.*, 2008).

### 1.3 Produtos Naturais

Há milhares de anos os produtos naturais tem desempenhado um importante papel em todo o mundo na prevenção e cura de doenças. Esses produtos naturais têm sido originados de diversas fontes, incluindo um grande número de plantas, animais e microorganismos (NEWMAN *et al.*, 2000). Os primeiros registros, escritos em cuneiforme sob placas de argila, eram da Mesopotâmia e datavam cerca de 2.600 a.C.. Dentre as substâncias listadas encontravam-se óleos de plantas de cedro (*Cedrus* sp., Pináceas), cipreste (*Cupressus sempervirens* L., Cupressaceae), alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L., Fabaceae) e papoula (*Papaver somniferum* L., Papaveraceae), todos eles ainda utilizados hoje para o tratamento de indisposições como tosses e resfriados e doenças como infecções parasitárias e inflamações (SCHWARTSMANN *et al.*, 2002; NEWMAN *et al.*, 2003; NEWMAN & CRAGG, 2007). No Brasil, 80% da população brasileira utilizam os produtos de origem natural como única fonte de recursos terapêuticos (FOGLIO *et al.*, 2006).

Os estudos químicos, farmacológicos e clínicos desses medicamentos tradicionais, os quais derivam predominantemente de plantas, foram à base de alguns medicamentos de uso atual, tais como a aspirina e a morfina (NEWMAN

*et al.*, 2000; SCHWARTSMANN *et al.*, 2002; NEWMAN *et al.*, 2003; BUTLER, 2004; CRAGG *et al.*, 2006; NEWMAN & CRAGG, 2007).

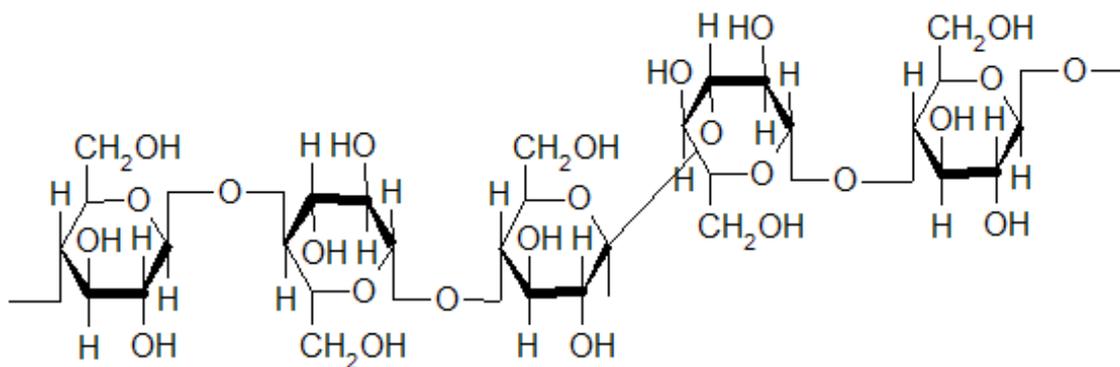
No câncer, em particular, esses compostos possuem fundamental importância, já que cerca de 60% dos medicamentos anticâncer utilizados na clínica são de origem natural (NEWMAN *et al.*, 2003). Dentre as diversas fontes encontradas na natureza, a maior deve-se às plantas (KIRKPATRICK *et al.*, 2002), o qual possibilitou a descoberta de vários fármacos para o tratamento do câncer, como os alcalóides bisindólicos vimblastina e vincristina isolados de *Catharanthus roseus* G., e seus derivados semi-sintéticos vindesina e vinorelbina (GUERITTE & FAHY, 2005; CRAGG & NEWMAN, 2005; NEWMAN & CRAGG, 2007).

Apesar deste quadro em relação ao desenvolvimento de fármacos para o tratamento do câncer, o tratamento do câncer metastático ainda é ineficaz (MENON *et al.*, 1999). Como a presença de metástase está diretamente relacionada com um prognóstico ruim ao paciente, torna-se urgente a busca de novas drogas que possam agir em uma das etapas da cascata metastática (invasão celular, sobrevivência na corrente sanguínea e angiogênese) impedindo, assim, a formação e o crescimento de tumores secundários. Diante disso, a utilização dos recursos naturais pode fornecer uma solução para o desenvolvimento de fármacos com potenciais antimetastático (CARVALHO, 2009).

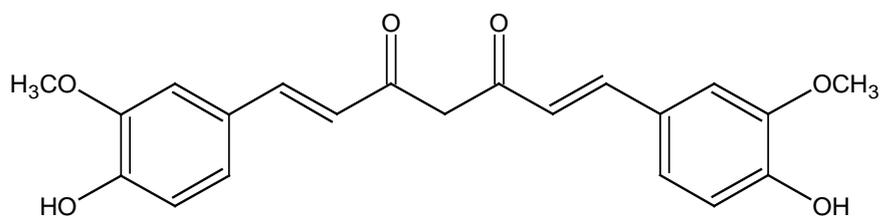
Diante desta problemática, muitas substâncias têm sido estudadas quanto ao seu provável potencial antimetastático, como o  $\beta$ -glucano **(3)** (YOON *et al.*, 2008), curcumina (diferuloilmetano) **(4)** (CHEN *et al.*, 2008), piperina **(5)** (PRADEEP & KUTAN, 2008), limoneno **(6)** (LU *et al.*, 2004), ácido perílico **(7)** (De OLIVEIRA, 2010), carvona **(8)** (RAPHAEL, T.J. & KUTTAN, G., 2003) withanolida **(9)** (ISHIKAWA *et al.*, 2006) e amentoflavona **(10)** (GURUVAYOORAPPAN, C. & KUTTAN, G., 2007). Apesar dos inúmeros esforços, nenhuma destas substâncias estudadas chegou ao estudo pré-clínico, o qual torna, ainda, falha as conquistas nesta área de pesquisa. Entretanto, e felizmente, um dos poucos produtos naturais em estudo clínico para o tratamento dos cânceres metastáticos é o Neovastat<sup>®</sup>.

O medicamento Neovastat<sup>®</sup> (AE-941), desenvolvido pela companhia canadense AEterna Zentaris, não é uma substância isolada, mas um extrato líquido padronizado da fração <500 kDa da cartilagem de tubarão *Squalus acanthias*. Encontra-se em estudo clínico de fase 3 para o tratamento de carcinoma renal metastático e carcinoma pulmonar de células não-pequenas, em combinação com outros quimioterápicos ou com radioterapia. Seu mecanismo de ação se dá através da inibição das MMPs (MMP-2, -9 e -12) (FALARDEAU *et al.*, 2001), do bloqueio dos receptores do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (BELIVEAU *et al.*, 2002) e da indução seletiva de apoptose em células endoteliais. Entretanto, sua comercialização poderá, a longo prazo, vir a ser um problema ecológico, pois a produção do extrato depende diretamente do sacrifício de tubarões (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

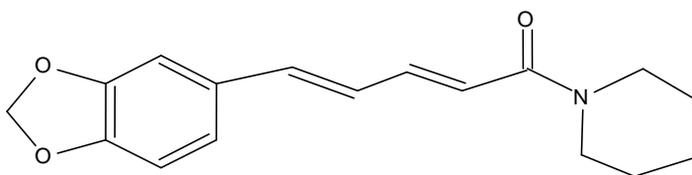
Além disso, estima-se que apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos (FOGLIO *et al.*, 2006). Isso torna a elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como de seus mecanismos de ação, um dos maiores desafios para a química e a farmacologia atualmente (GEBHARDT, 2000; CRAGG & NEWMAN, 2005; CRAGG *et al.*, 2006; SUBRAMANIAN *et al.*, 2006; NEWMAN & CRAGG, 2007).



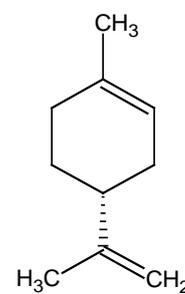
Beta-glucano (3)



Curcumina (4)

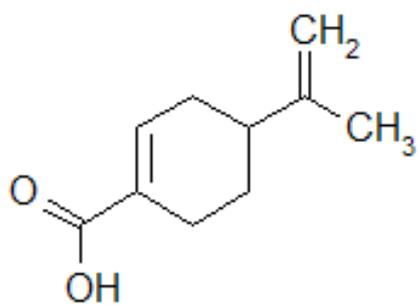


Piperina (5)

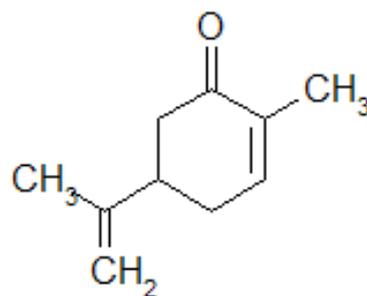


Limoneno (6)

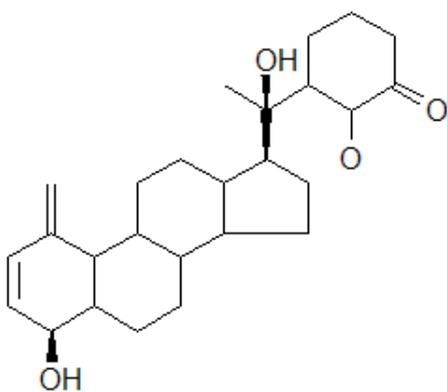
**Figura 8. Estrutura química de algumas substâncias com potencial antimetastático.**



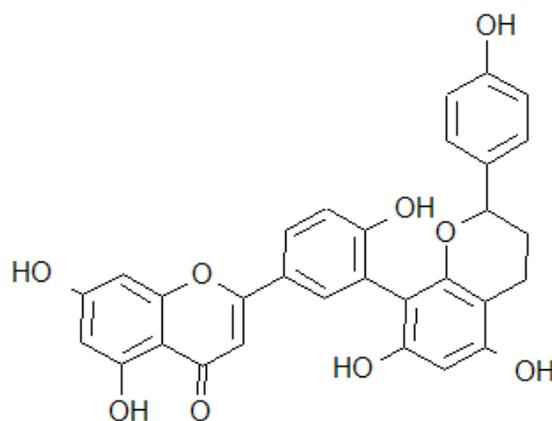
Ácido perílico (7)



Carvona (8)



Whitanolida (9)



Amentoflavona (10)

Figura 9. Estrutura química de algumas substâncias com potencial antimetastático.

E é neste quadro que entra o propósito e a importância do nosso trabalho, que visa estudar o potencial antimetastático de um produto natural oriundo da planta medicinal *Capraria biflora*.

### 1.3. Planta de estudo – *Capraria biflora*

A *Capraria biflora* L. (figura 10) é uma espécie pertencente à família Schrophulariaceae com origem nas Antilhas e América do Sul que habita zonas temperadas ou área de clima tropical (AQUINO, 2003). Esta planta encontra-se amplamente distribuída na América do Sul (Venezuela, Peru e Guiana Francesa); Na América Central (El Salvador, Trinidad-Tobago, Bahamas, Panamá, Curaçao, Guatemala e Porto Rico); Na América do Norte (Estados Unidos e México) e na Ásia (Índia e China) (CORRÊIA, 1984). No Brasil, a espécie está distribuída ao longo dos estados de Minas Gerais e Goiás e na costa entre os estados de Piauí e Espírito Santo (AQUINO *et al.*, 2007). É uma planta herbácea ou arbustiva, cujo caule é ramoso, até 150 cm de altura (CORRÊIA, 1984; CARVALHO, 2009).

Dentre os nomes populares, é conhecida no Brasil como: chá-da-terra, chá-do-méxico, chá- da-martinica, chá-de-goteira, chá-de-pé-da-calça, chá-do-rio, chá-da-américa, chá-das-antilhas, chá-de-lima, bem como chá-de-marajó, chá-da-balsaminha, chá-do-maranhão, chá-bravo e chá- de-preto (LE COINTE, 1947; LORENZI & MATOS, 2002). Em outros países, pode ter as seguintes denominações: earache bush, granny- bush, worry-bush e obeah-bush nas Bahamas; claudiosa e claviosa na Guatemala; tanchi em Curaçao; epazotillo e sjeja lipajni no México; dité peyi e du thé pays em Trinidad-Tobago; thé de pays na Guiana Francesa; te del peru no Peru (AQUINO, 2003).

Suas folhas são utilizadas na medicina popular como agente analgésico, especialmente para cólicas menstruais e para dor pós-parto, no tratamento de hemorróidas e distúrbios reumáticos (ACOSTA *et al.*, 2003) e para os sintomas da febre, gripe, vômitos, inflamação pélvica e diarreia (VASCONCELLOS *et al.*, 2007). Além disso, esta planta é utilizada para problemas estomacais,

desordens dermatológicas em geral, afecções do aparelho urinário, febrígura e como estimulante (MATOS *et al.*, 2002; CARVALHO, 2009).

Quanto aos seus efeitos biológicos, foi comprovada atividade analgésica central e periférica (ACOSTA *et al.*, 2003) e um potente efeito citotóxico e antiinflamatório (VASCONCELLOS *et al.*, 2007) do extrato aquoso das suas folhas.

Foi isolado a partir das raízes desta planta a biflorina (**11**), uma o-naftoquinona (GONÇALVES de LIMA *et al.*, 1953<sub>a</sub>, 1953<sub>b</sub>) com atividade antimicrobiana frente às bactérias GRAM-positivas álcool-ácido-resistentes e alguns fungos (GONÇALVES de LIMA *et al.*, 1958; 1962; SERPA, 1958). Esta quinona é o nosso objeto de estudo.

#### 1.2.1. Substância de estudo: Biflorina

A biflorina (**11**) é uma o-naftoquinona (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-bc]-piran-7,8-diona) de origem natural que pode ser facilmente obtida das raízes da *Capraria biflora* L. (figura 10). Foi isolada pela primeira vez em 1953 por Gonçalves de Lima e colaboradores e seus dados de RMN de <sup>13</sup>C foram reportados pela primeira vez por Fonseca e colaboradores (2002).

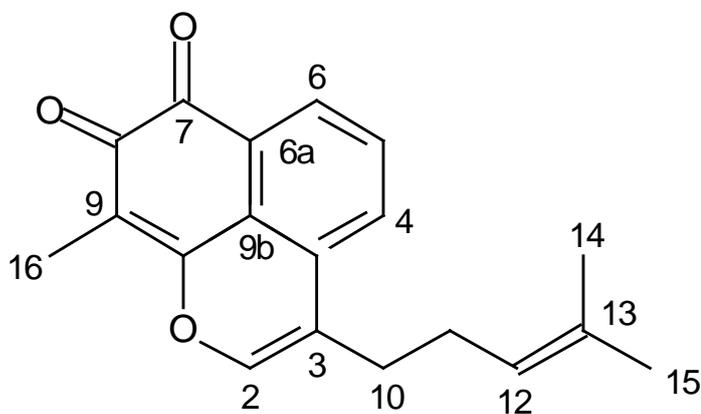
A atividade antimicrobiana da biflorina foi estudada por Gonçalves de Lima e col. em 1954 a 1962 o qual avaliaram diferentes tipos de extração e verificaram que a pureza da substância estava diretamente relacionada com sua atividade. Em 1958 foi observado que a biflorina mais pura possuía o valor da Concentração Mínima Inibitória (CMI) menor quando comparada a uma biflorina menos pura. Na época acreditava-se que essa alteração na sua atividade fosse atribuída à sua fotossensibilidade, cujo produto de sua degradação pudesse ter atividade antimicrobiana, porém inferior em relação a biflorina pura.



Figura 10. Foto da espécie *Capraria biflora* com detalhes das folhas e flores (Foto de: T.L.G. LEMOS).

Foi em 1961 que Gonçalves de Lima e colaboradores (1961), comprovaram experimentalmente a fotossensibilidade da biflorina, verificando sua degradação por exposição à luz natural. Foi observado que seu produto de degradação continha duas substâncias, uma solúvel e outra insolúvel em éter de petróleo, e que ambas apresentavam atividade antimicrobiana menor em relação à própria biflorina, como mostrado na Tabela 1.

Alem da sua atividade antimicrobiana, Lyra Júnior (1999), em ensaios frente a fungos dermatófitos e leveduras, observaram atividade antifúngica da biflorina de maneira dose-dependente.



**Figura 11. Estrutura química da biflorina (11), o-naftoquinona isolada das raízes da *Capraria biflora*.**

O único caso clínico relatado com o uso da biflorina foi em 1958, onde uma pasta com 1% de biflorina cristalizada foi utilizada em um paciente de 14 anos, do sexo masculino, com lesão descrita da seguinte forma:

“Lesão eritematosa peribucal, abrangendo a parte externa dos lábios, a qual se estendia para cima até a altura do nariz, para baixo em toda a região mentoniana e lateralmente, sobre a face, até uns 5 cm além da comissura labial. A pele da área atingida apresentava-se edematosa com uma coloração vermelho forte e deixava exudar constantemente líquido claro e de cheiro pútrido em face do que o paciente mantinha constantemente um lenço sobre a lesão. No caso, o paciente queixava-se de forte sensação de ardência e prurido na zona afetada”.

Após coleta em diferentes pontos da lesão foi possível isolar um fungo identificado como *Trichosporon margaritipherum*. Foi utilizada a pasta de biflorina a 1%, veiculada em lanolina e vaselina, duas vezes ao dia. Após dois dias, a lesão apresentava-se com cor rósea, sem exudação, sem prurido e sem o odor pútrico. Após mais quatro dias o aspecto da pele em toda a área atingida era quase normal. O veículo da pasta foi trocado por uma substância de maior penetração, polietilenoglicol, constatando-se, após mais uma semana, o desaparecimento completo de qualquer vestígio de eritema (AQUINO *et al.*, 2006; CARVALHO, 2009).

Além de seus efeitos antimicrobianos e antifúngicos, também foi demonstrado seu efeito citotóxico frente a 16 linhagens tumorais, elas: HL-60, CEM, K562 e HL-60 (leucemia humana); B-16 (melanoma murino); MDAMB-435, UACC257, UACC62 e M14 (melanoma humano); NCI H266 e NCI H23 (pulmão humano); HCT-8 (côlon humano); MCF-7, MX-1 e MDAMB-231 (mama humano) e PC3 (próstata) com IC<sub>50</sub> variando de 0,43 µg/mL a 14,61 µg/mL. Foi observado, também, ausência de potencial hemolítico frente a eritrócitos de camundongos, o qual sugere que a citotoxicidade da biflorina não esteja relacionada à ruptura inespecífica da membrana plasmática (VASCONCELLOS *et al.*, 2005; VASCONCELLOS, 2008). Quando avaliado seu potencial citotóxico frente a linhagem de célula humana normal (células polimorfonucleares de sangue periférico) observou IC<sub>50</sub> de 5,12 (4,28 – 6,12) µg/mL o que sugere uma baixa seletividade entre sua ação sobre células tumorais e normais.

Foi observado também que a biflorina não causa alterações no ciclo celular, mas que inibe a síntese de DNA e interage diretamente com DNA de fita simples e DNA de fita dupla, induzindo a morte celular por apoptose (VASCONCELLOS, 2007).

Em adição ao estudo do seu potencial citotóxico, foi estudada a atividade antitumoral da biflorina em ensaios *in vivo* utilizando animais transplantados com sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich. Nesses modelos, a biflorina demonstrou ter atividade antitumoral com baixa toxicidade, quando feita análise histopatológica do baço, rim e fígado. Além disso, apesar da baixa potência para a utilização da biflorina isoladamente, quando associada com o

5-Fluouracil (5-FU) a biflorina foi capaz de aumentar sua eficácia além de diminuir sua toxicidade sistêmica (VASCONCELLOS *et al.*, 2007). Também foi observado seu efeito sobre animais transplantados com melanoma B16 e observou que esta aumentava a sobrevida desses animais (VASCONCELLOS, 2007).

Foi avaliado também, por Vasconcellos (2008) a atividade imunoadjuvante da biflorina. Foi utilizado camundongos swiss tratados com ovalbumina na presença e ausência da biflorina para investigação da produção de anticorpos totais anti-OVA. Foi observado um aumento da produção de anticorpos totais (IgG, IgA e IgM) anti-OVA em camundongos imunizados com ovalbumina em associação com a biflorina quando comparados ao grupo tratado apenas com ovalbumina, o que indica uma atividade imunoadjuvante humoral desse composto (VASCONCELLOS, 2008).

Além desses resultados foi avaliado o potencial genotóxico da biflorina, o qual mostrou ser citotóxica e genotóxica em linfócitos humanos, contudo sem causar mutação. Em células V79 e *Saccharomyces cerevisiae* a biflorina apresentou potencial antimutagênico relacionado à remoção de radicais hidroxil. Em ensaio utilizando *Salmonella thyphimurium* e medula óssea de camundongos igualmente não foi mutagênica, mostrando que quando metabolizada a biflorina também não é mutagênica (VASCONCELLOS, 2009).

**Tabela 1. Concentrações mínimas inibitórias (CMI) da biflorina e de seus produtos de degradação pela luz natural (GONÇALVES DE LIMA et al., 1961)**

Microorganismos	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Biflorina	Produto solúvel em éter de petróleo	Produto insolúvel em éter de petróleo
<i>Bacillus subtilis</i>	0,8 – 1,2	50,0	8,0 – 10,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,2 – 1,6	50,0	6,0 – 8,0
<i>Sarcina lútea</i>	0,1 – 0,2	40,0 – 50,0	1,0 – 2,0
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	20,0	50,0	50,0
<i>Escherichia coli</i>	20,0	50,0	50,0
<i>Brucella suis</i>	3,2 – 4,0	30,0 – 40,0	10,0 – 20,0
<i>Mycobacterium humanus</i>	20,0	50,0	40,0 – 50,0
<i>Nocardia asteróides</i>	6,8 – 8,0	50,0	10,0 – 20,0
<i>Candida albicans</i>	1,6 – 3,2	50,0	8,0 – 10,0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	20,0	50,0	50,0

Em ensaios realizados em nosso laboratório (Laboratório de Oncologia Experimental/UFC), foi observado que a biflorina diminuía a formação de nódulos pulmonares em camundongos transplantados com células de melanoma metastático B16-F10, na dose de 25 e 50 mg/kg, com aumento da sobrevivência (CARVALHO, 2009). Além desse achado, a biflorina foi capaz de

inibir a adesão celular das linhagens B16-F10 e MDAMB-435 sobre o colágeno, um dos substratos da MEC, em concentrações não citotóxica. Foi também observado a inibição da migração celular das linhagens de melanoma metastático B16-F10 e MDAMB-435 de maneira concentração-dependente. Entretanto, não foi observado alterações na secreção de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e -9) quando realizado ensaio de zimograma (CARVALHO, 2009).

Diante destes resultados, torna-se necessário a continuidade do estudo desta quinona e seu potencial sobre a invasividade tumoral, visto que esta apresenta resultados amplos e diversos no que diz respeito a sua citotoxicidade e seu efeito sobre a invasividade celular. Neste trabalho propusemos estudar seu efeito sobre os mecanismos de invasão celular, utilizando a linhagem de melanoma humano metastático (MDAMB-435) e o estudo do seu mecanismo de ação utilizando esta célula como modelo.

# ***Objetivos***

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

- Avaliar o potencial antimetastático da biflorina

### **2.2. Específicos**

- Avaliar o efeito citotóxico da biflorina utilizando ensaio de Alamar Blue, Coloração por Cristal Violeta e Azul de Trypan, utilizando linhagem de melanoma humano MDAMB-435 e células normais;
- Avaliar o efeito da biflorina sobre a motilidade celular da linhagem MDAMB-435
- Avaliar o efeito da biflorina sobre a invasividade tumoral da linhagem MDAMB-435 utilizando a Câmara de Boyden revestida por Matrigel;
- Avaliar o efeito da biflorina sobre a expressão de moléculas de adesão do tipo caderina e vimetina na linhagem MDAMB-435;
- Avaliar o efeito da biflorina sobre a expressão protéica do Akt na linhagem MDAMB-435 e das proteínas envolvidas nesta via de sinalização.

# ***Materiais e Métodos***

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Materiais utilizados**

##### **3.1.1. Equipamentos**

- Agitador de placa, MLW modelo Thys 2
- Agitador vortex, AD8850
- Balança analítica, GEHAKA AG200
- Banho-Maria, MOD. 105 DI DELLTA
- Centrífuga centimicro, FANEM Modelo 212
- Centrífuga de placas Eppendorf, Modelo Centrifuge 5403
- Centrífuga excelsa Baby I, FANEM Modelo 206
- Contador manual, Division of Bexton, Dickinson and Company
- Destilador de água
- Deonizador de água Mili-Q, Millipore
- Espectrofotômetro de placas, DTX 880 multimode detector, Beckman Coulter
- Espectrômetro de massas, Micromass, Quattro MicroTM
- Electrophoresis Power supply EPS – 300
- Fluxo laminar, VECO
- Incubadora de células (CO<sub>2</sub> Water-Jacket Incubator), NUAIRES TS Autoflow
- Microscópio Confocal, Carl Zeiss LSM 710
- Microscópio óptico, Metripex Hungray PZO-Labimex Modelo Studar lab
- Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot

- Pipetas automáticas, Gilson
- Sistema HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência ou CLAE), Shimadzu
- Sistema para Western Blot, BioRad

### 3.1.2. Reagentes e Substâncias

- Ácido Clorídrico, Vetec
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), Proquímios
- Alamar Blue, Invitrogen
- Azul de Trypan, Invitrogen
- Acrilamida, Sigma
- *Blue Juice* (Tampão de Amostra), Invitrogen
- Bis-acrilamida, Sigma
- Cloreto de Sódio, Vetec
- Cloreto de Potássio, Vetec
- DC Protein Assay, BioRad
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Vetec
- Faloidina (Alexa-Fluor 488), Invitrogen
- *Full-Range Rainbow Marker*, GE HeathCare
- Iodeto de propídio, Sigma
- Leite destanato, Molico
- Meio de cultura para células RPMI, Cultilab
- Metanol, Vetec
- NBT/BCIP *Stock Solution*, Roche
- Paraformaldeído, Sigma

- RIPA Lysis Buffer, Santa Cruz Biotechnology Inc.
- Soro fetal bovino (SFB), Cultilab
- Soroalbumina bovina (BSA), Sigma
- SDS (dodecilsulfato de sódio), Sigma
- Tripsina, Cultilab
- Tris-Base, Sigma
- Triton-X-100, Vetec

### **3.1.3. Anticorpos Primários**

- Actina, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Akt total, Cell Signalling
- C-Raf, Cell Signalling
- E-caderina, Cell Signalling
- Fosfo-Akt (Ser473), Cell Signalling
- Fosfo-Akt (thr ), Cell Signalling
- N-caderina, Cell Signalling
- PDK-1, Cell Signalling
- P-GSK, Cell Signalling
- PTEN, Cell Signalling
- Vimetina, Cell Signalling

### **3.1.4. Anticorpos Secundários**

- Anti-mouse IGg, Cell Signalling
- Anti-rabbit, IGg, Cell Signalling

### 3.2. Manutenção das células

A linhagem celular de melanoma humano MDAMB-435 foi obtida através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD). Os ensaios com as linhagens de fibroblasto EBF e células epiteliais de mama MCF-10 foram realizados na *Havard Medical School*, MEEI, Estados Unidos pela Dra. Raquel Carvalho Montenegro. As linhagens foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL). O meio utilizado foi o RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio era trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Quando necessário, utilizava-se tripsina + EDTA (0,25%) para que as células se desprendessem das paredes da garrafa.

### 3.3. Obtenção da biflorina das raízes da *Capraria biflora*.

A planta foi coletada em 2008, em uma plantação no município de Fortaleza, e identificada pelo professor Edson de Paula Nunes (Universidade Federal do Ceará). A exsicata (nº 30.849) foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

A obtenção da biflorina foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará pela mestrandia Luciana Gregório de Souza Silva sob orientação da professora Dr<sup>a</sup> Telma Leda Gomes de Lemos.

As raízes (4,5 kg) foram secas e pulverizadas. O material obtido foi extraído com éter de petróleo (4 L) durante duas horas e parcialmente evaporado a temperatura ambiente até a formação de um material sólido. Este material foi filtrado a vácuo com o surgimento de um sólido roxo (1 g). Foi feita cromatografia em Sílica Gel e eluição isocrática através de uma mistura binária de Éter de Petróleo e Acetato de Etila 9:1 (v/v). As frações foram obtidas através da cromatografia de camada delgada (CCD). Para a identificação da

biflorina foram realizadas análises de espectroscopia (Ressonância Nuclear Magnética) além de comparações das suas propriedades físicas com os presentes na literatura.

### **3.4. Ensaio de citotoxicidade *in vitro***

#### **3.4.1. Princípio do teste**

Para avaliar a citotoxicidade da biflorina sobre a proliferação do melanoma humano MDAMB-435, e determinar as concentrações ideais para os ensaios de invasão celular, o ensaio do alamar blue foi realizado. A biflorina foi testada em concentrações crescentes (0,1 a 5,0  $\mu\text{M}$ ) após 8, 12 e 24 horas de exposição.

O alamar blue, recentemente identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.*, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. O alamar blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A redução do alamar blue reflete a proliferação celular. Este teste foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED *et al.*, 1994) e atualmente apresenta várias aplicações.

#### **3.4.2. Procedimento experimental**

Inicialmente, as células MDAMB-435 foram plaqueadas em placas de 96 cavidades ( $2 \times 10^5$  células/poço em 100  $\mu\text{L}$  de meio). Após 24 horas de incubação, a substância teste (0,1 a 5,0  $\mu\text{M}$ ) foi dissolvida em DMSO e adicionada em cada poço e incubada por 8, 12 ou 24 horas. O etoposídeo (10, 20 e 50  $\mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Três horas antes do final do período de

incubação, 10  $\mu\text{L}$  da solução estoque (0,312mg/mL) de Alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. Após o tempo de exposição (12h) foi mensurado a fluorescência utilizando fluorômetro de pacas (590 nm) (AHMED *et al.*, 1994).

### **3.4.3. Análise dos dados**

Os dados foram plotados em gráfico de barras. Para verificar ocorrência de diferenças significativas os valores foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido do teste Student-Newman-Keuls, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0.

## **3.5. Densidade Celular – Coloração por Cristal Violeta**

### **3.5.1. Princípio do Teste**

O Cristal Violeta é um corante que acumula-se no núcleo das células. Como as células deste trabalho são aderidas, e sabendo que as células que permanecem aderidas estão vivas, pode-se observar o efeito citotóxico de substância-testes observando alterações na densidade celular. Este ensaio é qualitativo.

### **3.5.2. Procedimento experimental**

As linhagens celulares MDAMB-435, EBF e MCF-10 foram plaqueadas ( $2 \times 10^5$  células/poço em 1000  $\mu\text{L}$  de meio) em placas de 12 poços. Após 24h, a biflorina foi adicionada às células (0; 1,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ) durante 12 horas de exposição. Após a exposição, foi retirado o sobrenadante e os poços foram lavados 3 vezes com PBS. Após a lavagem foi acrescentado solução de cristal violeta (ácido acético 30% e cristal violeta 1%) por 20 minutos. Após esse período, foi retirado o excesso do corante e realizadas fotografias para a avaliação da densidade celular. Neste ensaio foi utilizado células normais para

observar a seletividade da biflorina sobre células tumorais versus normais (CAO *et al.*, 2011).

Os ensaios realizados para as linhagens EBF e MCF-10 foram realizados pela Dr. Raquel Carvalho Montenegro como citado anteriormente.

### **3.5.3. Análise dos Dados**

A análise foi feita visualmente (análise qualitativa).

## **3.6. Ensaio de Proliferação Celular utilizando Azul de Tripán**

### **3.6.1. Princípio do Teste**

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

Este ensaio foi utilizado para confirmar se as concentrações utilizadas (1,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ) no tempo de exposição escolhido (12h) não possuem atividade citotóxica.

### **3.6.2. Procedimento Experimental**

As células das linhagens MDAMB-435, EBF e MCF-10 foram plaqueadas em placas de 12 poços na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL e após 24h do plaqueamento, as células foram incubadas com biflorina nas concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  durante 12h. Após o tempo de exposição, as células foram tripsinizadas e alíquotas de 90  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foram retiradas e misturadas com 10  $\mu\text{L}$  do azul de tripan. Em seguida, alíquota de 10  $\mu\text{L}$  foi colocada em câmara de Neubauer e as células que foram capazes de expulsar o tripan para fora foram contadas. Novamente utilizou linhagens de

células normais (EBF e MCF-10) para comparar o efeito da biflorina sobre célula tumoral versus célula normal.

### **3.6.3. Análise dos Dados**

O valor obtido para cada contagem foi plotado em gráfico de barras com as variáveis: número de células vs concentração. Para verificar ocorrência de diferenças significativas os valores foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido do teste Student-Newman-Keuls, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0.

## **3.7. Ensaio de Migração Celular por Cicatrização (*Wound Healing*)**

### **3.7.1. Princípio do Teste**

Migração celular é um fenômeno essencial para o processo de invasão e metástase. Quando realizado uma cicatriz na monocamada de células na placa, as células com alta capacidade migratória ultrapassam essa linha, tornando possível o estudo de drogas que possam interferir nesse mecanismo (BRITO *et al.*, 2005).

### **3.8.2. Procedimento Experimental**

O ensaio de migração celular foi baseado no modelo descrito por Bürk e colaboradores (1973), com adaptações. A célula utilizada para o ensaio, MDAMB-435 foi plaqueada na concentração de  $2,0 \times 10^5$  em placa de 12 poços, em meio de cultura. A célula foi mantida por 72 horas em estufa, após plaqueamento, para adquirir a confluência necessária. Em seguida os poços foram tratados com  $5\mu\text{g/mL}$  de mitomicina C (antiproliferativo) por 15 minutos. O pré-tratamento com mitomicina C garante que as células estejam migrando e

não proliferando. Os poços foram lavados 3x com tampão salina fosfato estéril (PBS) e foi acrescentado 1 mL de meio em cada poço onde foi feita uma lesão na monocamada com a ponta da ponteira de cima para baixo com a formação de uma fenda. Os poços foram lavados 3x com PBS e acrescentado 1 mL de RPMI sem soro. Após 12h, onde não foi observado migração, foram acrescentadas concentrações não-citotóxicas da biflorina (1,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ). Após 12h de exposição do composto, isto é, após completar 24h de plaqueamento na ausência do soro, foi observado migração celular e as placas foram fotografadas.

### **3.7.3. Análise dos Dados**

A análise foi feita visualmente (análise qualitativa).

## **3.8. Ensaio de invasão celular**

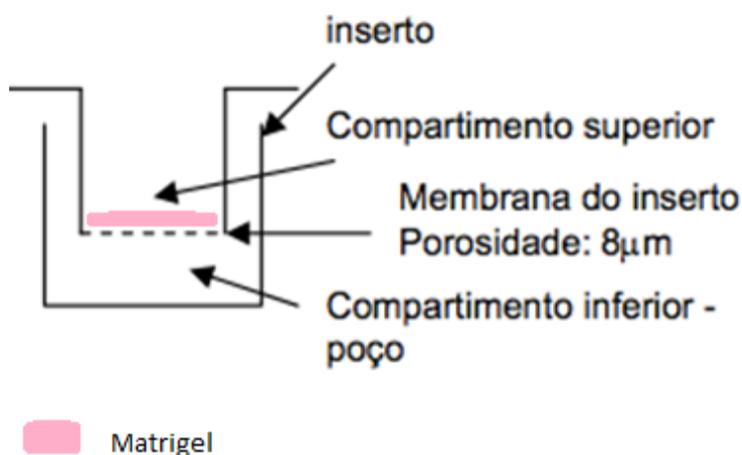
### **3.8.1. Princípio do teste**

A invasividade das células tumorais representa uma das várias propriedades necessárias para a formação de metástase. Diante disso, ensaio utilizando câmara de Boyden modificada como descrito por TERRANOVA *et al.*, 1986 e ALBINI *et al.*, 1987 faz necessário para avaliar a interferência da biflorina sobre esse processo.

### **3.8.2. Protocolo Experimental**

Para este ensaio, filtros de policarbonato (poros de 8 $\mu\text{m}$ ) recobertos com Matrigel foram utilizados (BD BioCoat<sup>TM</sup>). O Matrigel é um extrato solúvel e estéril derivado do estroma tumoral do tumor EHS que forma um gel a 37°C, também conhecido como extrato de EHS e membrana basal reconstituída (KLEINMAN & MARTIN, 2005).

No compartimento inferior foi adicionado o meio RPMI 1640. A linhagem celular MDAMB-435 ( $2 \times 10^5$  cells/mL), previamente exposta a biflorina durante 7h (0; 1,0; 2,5 e 5,0  $\mu$ M) foi adicionada no compartimento superior na presença e na ausência da biflorina nas mesmas concentrações. A placa foi incubada por 5h (completando as 12h de exposição) a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. As células da superfície superior do filtro foram completamente retiradas com ajuda de um cotonete de algodão e os filtros foram retirados e fixados com metanol por 5 min e corados com Cristal Violeta a 1%.



**Figura 12. Esquema do ensaio de Invasão Celular utilizando insertsos revestidos com Matrigel (BD).**

### 3.8.3. Análise de dados

As células presas no filtro foram contadas em dez campos utilizando microscópio óptico em objetiva de 40 (aumento de 400x) e fotografados. Os valores foram plotados em gráfico de barras e para verificar ocorrência de diferenças significativas os valores foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido do teste Student-Newman-Keuls, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0.

### **3.9. Análise morfológica – coloração por May-Grünwald-Giemsa**

#### **3.9.1. Princípio do teste**

A coloração por May-Grünwald-Giemsa baseia-se em interações eletrostáticas entre os corantes e as moléculas-alvo. Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma.

#### **3.9.2. Protocolo Experimental**

A linhagem celular MDAMB-435 foi plaqueada em placas de 12 poços na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL, e após 24h, biflorina foi adicionada (0; 1,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ). Após 12h de incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol durante 1 minuto. Após a fixação, os poços foram corados com May-Grünwald, por 10 segundos seguidos de Giemsa por 10 segundos e lavados com água destilada.

#### **3.9.3. Análise de dados**

A placa foi analisada utilizando microscópio de inversão para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle negativo (não-tratado). O registro das alterações celulares foi feito através de fotografia.

### **3.10. Coloração da F-actina – Microscopia Confocal**

#### **3.10.1. Princípio do teste**

O microscópio confocal de fluorescência por varredura laser utiliza a fluorescência para a aquisição das imagens. A fluorescência é um tipo de luminescência (emissão de luz) em que um corpo absorve luz e após um curto intervalo de tempo re-emite essa luz.

#### **3.10.2. Protocolo Experimental**

A linhagem celular MDAMB-435 foi plaqueada ( $2 \times 10^5$  células/mL) sobre lamínulas em placa de 6 poços. Após 24h, a biflorina foi adicionada aos poços (0; 1,0; 2,5; 5,0  $\mu\text{M}$ ) durante 12h. Após o período de incubação, o sobrenadante foi retirado e os poços lavados 3 vezes com PBS. Após a lavagem, os poços foram fixados com paraformaldeído (3,7% em PBS) por 30 min. Depois deste período, os poços foram novamente lavados 3 vezes com PBS e as células foram permeabilizadas utilizando solução de Triton X-100 (0,5% em PBS) por 12 min. Após a permeabilização, os poços foram lavados 3x com PBS e foi adicionado 15 $\mu\text{L}$  de RNase (10  $\mu\text{g/mL}$ ) e as lamínulas foram cobertas com parafilme durante 30 min. Após esse tempo, os poços foram lavados 3 vezes com PBS e foi adicionado 15  $\mu\text{L}$  de faloidina – FITC (3,7  $\mu\text{M}$ ) e as lamínulas cobertas com parafilme por 30 min. Após o tempo de incubação, os poços foram lavados 3 vezes com PBS e foi acrescentado 15  $\mu\text{L}$  de Iodeto de Propídeo (50  $\mu\text{g/mL}$ ) e novamente as lamínulas foram cobertas com parafilme por 10 min. Após esse tempo, a lamínula foi montada sobre lâmina utilizando Vectashield.

### 3.10.3. Análise de dados

As lâminas foram analisadas em microscópio confocal para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle negativo (não-tratado). O registro das alterações celulares foi feito através de fotografia.

## 3.11. Ensaio de Western Blot – expressão de moléculas de adesão do tipo caderina.

### 3.11.1. Princípio do teste

Western blot é uma técnica amplamente empregada para detectar uma determinada proteína numa dada amostra. Este método foi utilizado para verificar o efeito da biflorina sobre a expressão de moléculas de adesão envolvidas no processo de metástase.

Para este ensaio foram utilizados os seguintes anticorpos primários: N-caderina, E-caderina e Vimetina (Cell Signalling). A marcação com  $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) foi utilizada como referência experimental. Os anticorpos secundários anti-mouse IgG (Cell Signalling) e anti-rabbit IgG (Cell Signalling) ligados à enzima fosfatase alcalina foram utilizados na detecção.

### 3.11.2. Protocolo Experimental

#### *Extração de proteínas*

Células MDAMB-435 foram tratadas com biflorina (0; 1,0; 2,5 e 5,0  $\mu$ M) por 12h antes da extração de proteínas totais. Inicialmente, o meio de cultura foi retirado, os poços lavados 3 vezes com PBS e adicionado o tampão RIPA Lysis Buffer (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 1X acrescido de um coquetel com inibidores de proteases (1:100 v/v), ortovanadato de sódio (1:100 v/v) e PMSF (1:100 v/v). As células foram homogeneizadas mecanicamente com

ajuda de um raspador de plástico e deixadas em gelo por 1h30. Como orientado pelo fabricante, foi utilizada a proporção aproximada de 1mL de tampão RIPA completo para cada  $10^7$  células. Ao final da incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, aliquotado e armazenado a -20 °C.

#### *Quantificação de proteínas*

A quantificação das proteínas totais foi realizada utilizando o kit DC Protein Assay (BioRad Laboratories) e executado como descrito pelo fabricante em microplacas de 96 cavidades. Uma curva padrão com BSA (1 – 10µg) diluído em tampão RIPA completo foi preparada para a calibração do método. O tampão RIPA completo foi utilizado para marcar o branco experimental. Em seguida, 5µL de cada amostra foi plaqueado em duplicatas e adicionado 25µL do reagente A' (preparado a partir da adição de 20µL do reagente S a cada 1mL do reagente A) seguido por 200µL do reagente B. As amostras foram incubadas por 10 minutos, sob agitação leve e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620nm.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada frente à curva gerada pelo BSA. A curva foi gerada a partir de regressão linear no programa GraphPad Prism 4.0 e os valores de absorbância obtidos para cada amostra foram substituídas na equação da curva para determinar as respectivas concentrações de proteínas.

#### *Eletroforese em gel de poliacrilamida*

Para a separação das proteínas do extrato total baseado no peso molecular, as amostras foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida descontínuo (LAEMMLI, 1970). Após a montagem do sistema vertical o gel de resolução foi confeccionado para uma concentração final de 12,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8. O gel de concentração foi montado sobre este, com 5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.

De cada amostra, 15µg de proteína total carregada com o tampão Blue Juice 5X foi aplicado nos poços do gel de concentração. O marcador de peso molecular *Full-Range Rainbow Marker* (12 – 225 kDa; GE Healthcare) foi usado sempre para monitorar a separação das proteínas. A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100 V e 30 mA à temperatura ambiente, utilizando o tampão de corrida para eletroforese (Tris-Glicina-SDS).

### *Eletrotransferência*

As proteínas separadas foram transferidas para membrana de PVDF Hybond-P (GE Healthcare). Para tanto, o gel foi colocado em contato com a membrana previamente lavada em metanol entre esponjas e papéis de filtro banhados na solução de transferência (Tris-Glicina-MetOH). A eletrotransferência foi realizada pelo modo de imersão à voltagem constante de 100 V e 300 mA a 4 °C durante 2h.

### *Imunodeteção*

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 1h em solução de BSA 3% em TBS. Em seguida, foram lavadas (3 vezes, 10 minutos cada lavagem) com TBS-Tween 0,05% (TBS-T) e incubadas sob agitação overnight a 4 °C com o anticorpo primário diluído em solução de BSA 5% em TBS-T. Após lavagem com TBS-T (3 vezes, 10 minutos cada lavagem), as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário acoplado à enzima fosfatase alcalina diluído em solução de BSA 5% em TBS-T por 2h, sob agitação. Após lavagem com TBS-T (3 vezes, 10 minutos cada lavagem) seguida de lavagem no tampão de revelação (Tris-MgCl<sub>2</sub>-NaCl), as membranas foram reveladas com NBT (0,33 mg/mL) e BCIP (0,168 mg/mL), diluídos em 15mL de solução de revelação até a indicação colorimétrica desejada. A reação foi interrompida com banho da membrana em água destilada.

### **3.11.3. Análise estatística**

A documentação das membranas reveladas foi realizada em captador de imagens.

## **3.12. Ensaio de Western Blot – via do Akt**

### **3.12.1. Princípio do teste**

Western blot é uma técnica amplamente empregada para detectar uma determinada proteína numa dada amostra. Este método foi utilizado para verificar o efeito da biflorina sobre a expressão de moléculas envolvidas na via de sinalização do Akt.

Para este ensaio foram utilizados os seguintes anticorpos primários: Akt total, Fosfo-Akt (thr308), Fosfo-Akt(Ser473), PTEN, PDK-1, P-GSK e c-Raf (Cell Signalling). A marcação com  $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) foi utilizada como referência experimental. Os anticorpos secundários anti-mouse IgG (Cell Signalling) e anti-rabbit IgG (Cell Signalling) ligados à enzima fosfatase alcalina foram utilizados na detecção.

### **3.12.2. Protocolo Experimental**

O mesmo do item 3.11.2

### **3.12.3. Análise estatística**

A documentação das membranas reveladas foram realizadas em captador de imagens.

# ***Resultados***

## 4. Resultados

### 4.1 Citotoxicidade

Para evitar um resultado falso-positivo, os ensaios de migração e invasão celular devem ser realizados utilizando concentrações não citotóxicas. Diante dessa necessidade foram realizados ensaios de citotoxicidade com a biflorina para selecionar as concentrações e tempo de exposição ideais. Foi realizado, então, ensaio do Alamar blue utilizando concentrações e tempo de exposição crescente. Neste ensaio observamos que a biflorina apresenta efeito citotóxico a partir da concentração de 5  $\mu\text{M}$  após 24h de exposição (figura 13). Entretanto, essa mesma concentração não foi citotóxica durante 12h de exposição. Decidiu-se, então, utilizar as seguintes concentrações para os ensaios seguintes: 1,0; 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  durante 12h de exposição, tempo as quais não apresentaram efeito citotóxico.

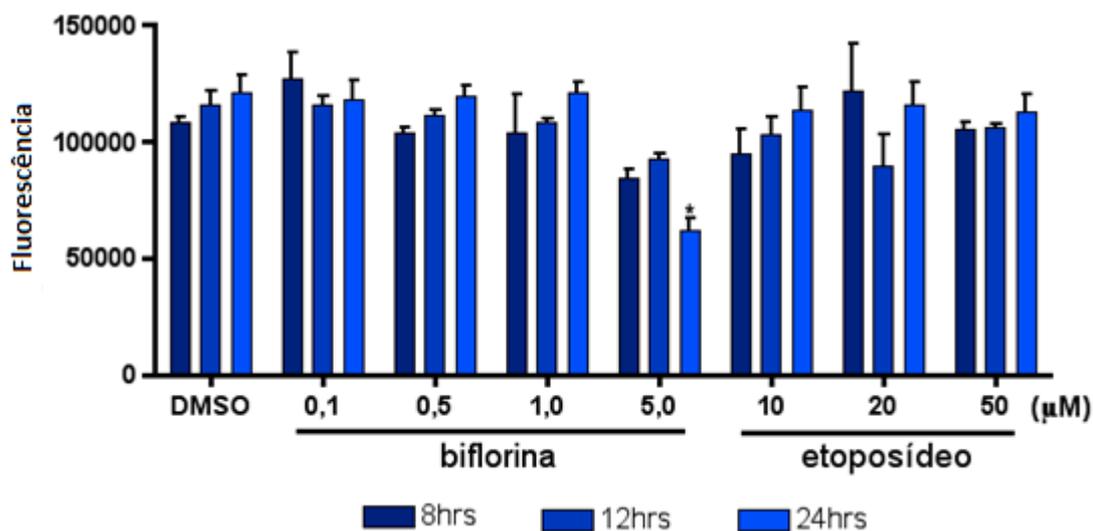


Figura 13. As células MDAMB-435 foram semeadas em placas de 96 poços ( $2 \times 10^5$  cell/poço) e após 24h foi adicionado DMSO, biflorina ou etoposídeo durante 8, 12 ou 24h de exposição. Três horas antes do tempo de exposição terminar, foi acrescentado o Alamar Blue e após 3h as placas foram lidas por fluorescência (590 nm). \*  $p < 0,05$ .

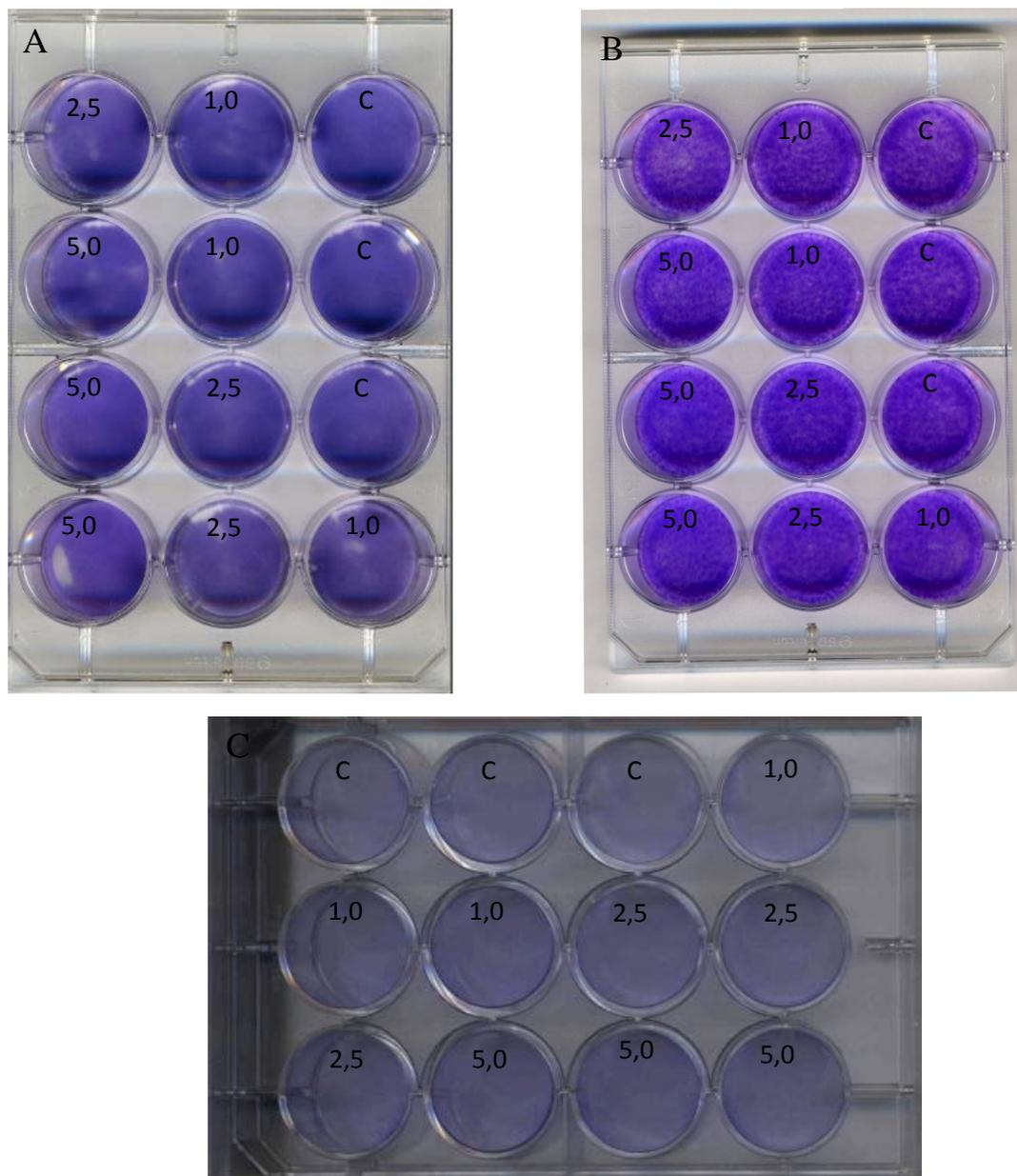
## **4.2. Coloração por Cristal Violeta.**

Com o objetivo de confirmar se a biflorina não apresenta efeito citotóxico nas concentrações a serem utilizadas, foi realizado um ensaio qualitativo por coloração por cristal violeta utilizando as concentrações de 1,0; 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  durante 12h de incubação. Foi testada tanto a linhagem de melanoma metastático MDAMB-435 quanto linhagens normais, esperando, assim, observar se a biflorina também não apresentava efeito tóxico sobre células normais. As células normais utilizadas nesse ensaio foram linhagem de fibroblastos EBF e de mama MCF-10.

Como podemos observar na figura 14, a biflorina não foi citotóxica nestas condições nas linhagens testadas.

## **4.3 Azul de tripan**

Com o mesmo propósito de observar se realmente a biflorina não possui atividade citotóxica nas condições de estudo, realizamos ensaio de proliferação utilizando o corante azul de tripan. Como observado na figura 15, a biflorina não alterou a proliferação de todas as linhagens testadas, na concentração de 1,0; 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  durante 12h de incubação, com a exceção da linhagem EBF, que apresentou uma diminuição da proliferação celular na maior concentração testada ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14.** As células MDAMB-435 (A), EBF (B) e MCF-10 (C) foram semeadas em placas de 12 poços ( $2 \times 10^5$  cell/mL) na presença e na ausência da biflorina. Após 12h, os poços foram lavados com PBS e foi acrescentado solução de Cristal Violeta a 3%. Logo em os poços foram fotografados e analisado qualitativamente alteração na densidade celular C = Controle; 1,0 = Biflorina 1,0  $\mu$ M; 2,5 = Biflorina 2,5  $\mu$ M e 5,0 = Biflorina 5,0  $\mu$ M.

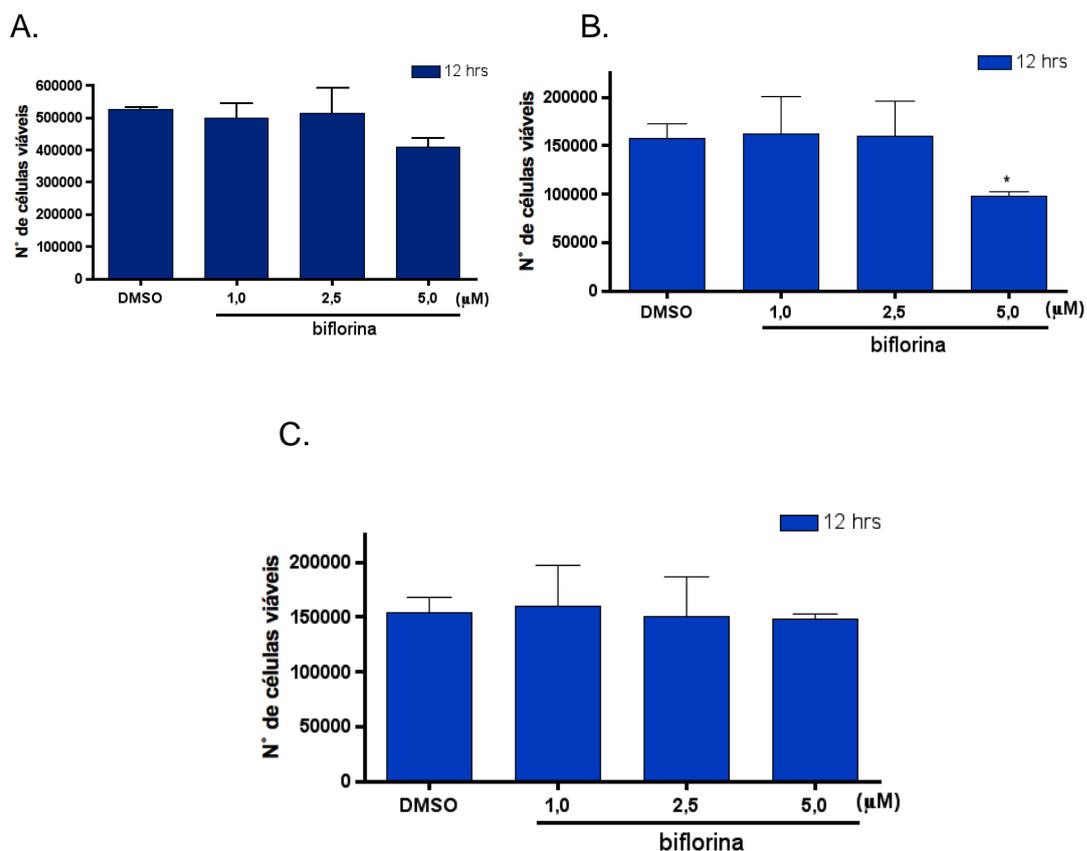


Figura 15. As células MDAMB-435 (A), EBF (B) e MCF-10 (C) foram semeadas em placas de 12 poços ( $2 \times 10^5$  cell/mL) na presença e na ausência da biflorina. Após 12h de incubação, as células foram tripsinizadas e adicionado o azul de tripan. A contagem foi feita em câmara de Neubauer. \*  $p < 0,05$ .

#### **4.4 Ensaio de Migração Celular por cicatrização**

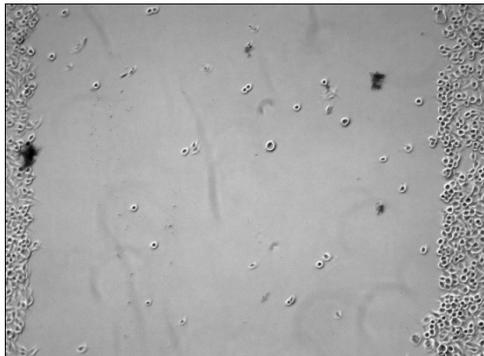
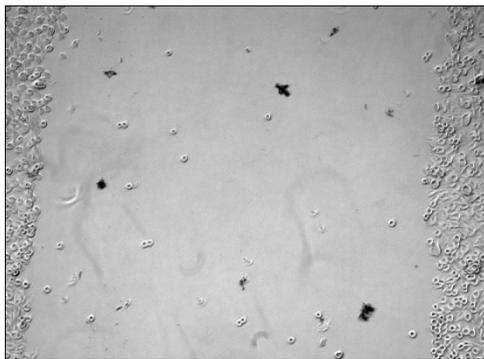
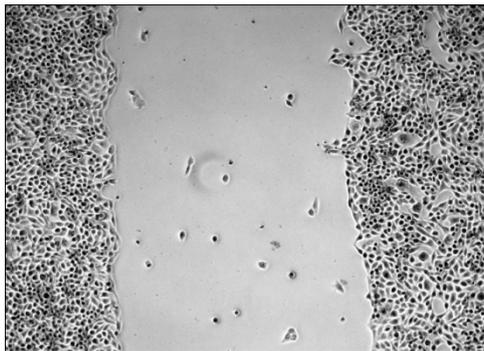
Com o objetivo de avaliar se a biflorina possui atividade sobre as etapas da invasão celular nas condições escolhidas, foi realizado o ensaio de migração celular por cicatrização utilizando a linhagem de melanoma humano altamente metastático MDAMB-435. Neste ensaio, observou-se que a biflorina diminui a motilidade celular nas concentrações de 1,0; 2,5 e 5  $\mu$ M durante 12h de incubação (figura 16, ensaio qualitativo).

#### **4.5 Ensaio de Invasão Celular utilizando a câmara de Boyden modificada.**

Com o objetivo de avaliar se a biflorina altera a capacidade de invasão celular, foi realizado ensaio de invasão celular utilizando placas Transwell revestidas por Matrigel. Neste ensaio, observamos que a biflorina inibiu de maneira concentração-dependente a invasão celular da linhagem MDAMB-435 ao longo da matriz ( $P < 0,05$ ) (Figura 17 e 18).

#### **4.6 Análise Morfológica – coloração por May-Grünwald-Giemsa**

De forma a elucidar o mecanismo de ação da biflorina sobre a linhagem MDAMB-435, foi realizado análise morfológica utilizando a coloração May-Grünwald-Giemsa. Neste ensaio, após 12h de exposição, observamos que, no controle, as células apresentaram forma de fibroblastos, o que já era esperado. Entretanto, após exposição com a biflorina, podemos observar células com formas arredondadas e menores quando comparadas ao controle e a presença de poucas células maiores. Também observamos células com prolongamentos semelhantes a filopódias orientados de forma paralela a membrana celular. Estes resultados sugerem que esta quinona esteja alterando citoesqueleto celular (Figura 19).



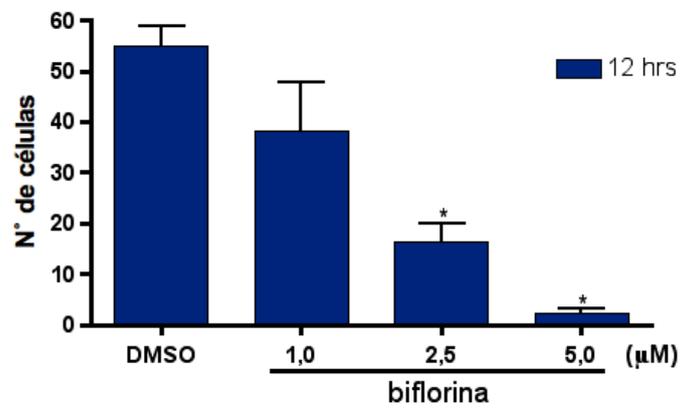


Figura 17. As células MDAMB-435 foram plaqueadas na presença da biflorina por 8h. Após o tempo de incubação as células foram semeadas na câmara de boyden revestida com Matrigel por 4h (total: 12h). O filtro revestido com Matrigel foi retirado, e montado em lâminas de vidro. As células que invadiram o Matrigel foram coradas com Cristal Violeta 3% e feita a contagem de 08 campos microscópio óptico. \*  $p < 0,05$ .

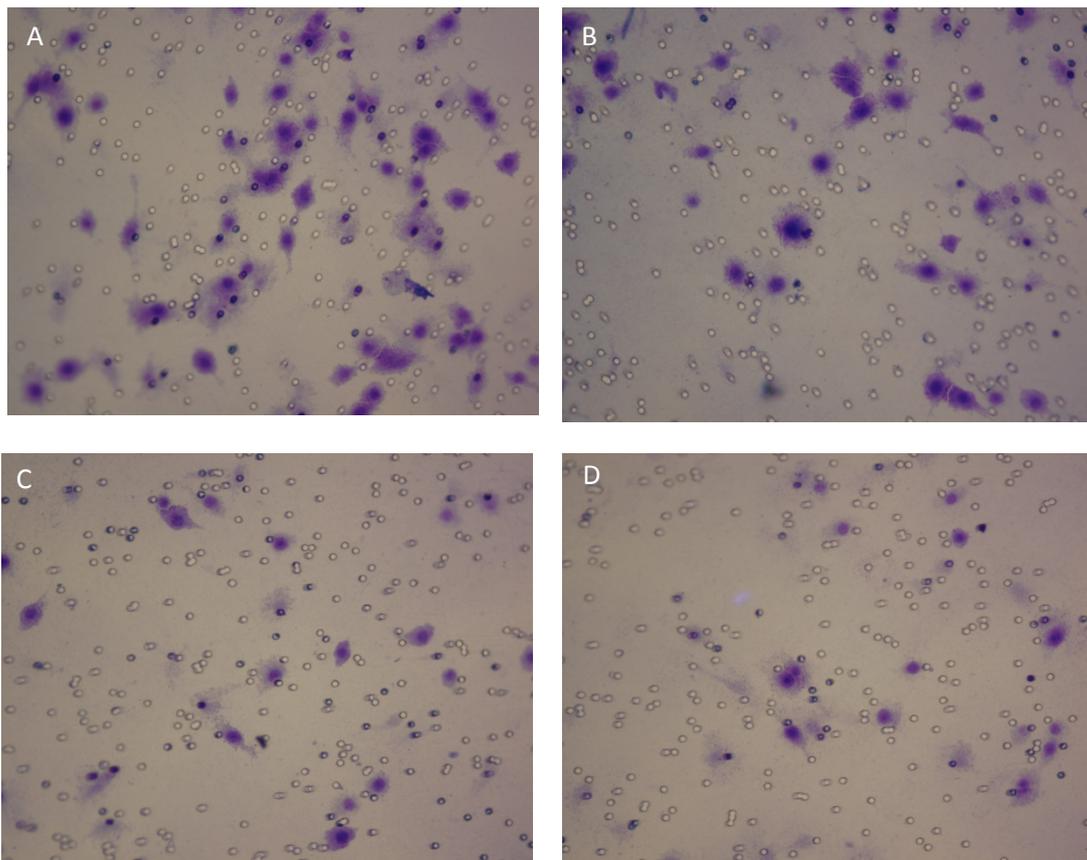


Figura 18. Microfotografias das células que invadiram o Matrigel no Ensaio de invasão celular. A. DMSO; B. Biflorina 1,0 μM; C. Biflorina 2,5 μM e C. Biflorina 5,0 μM.

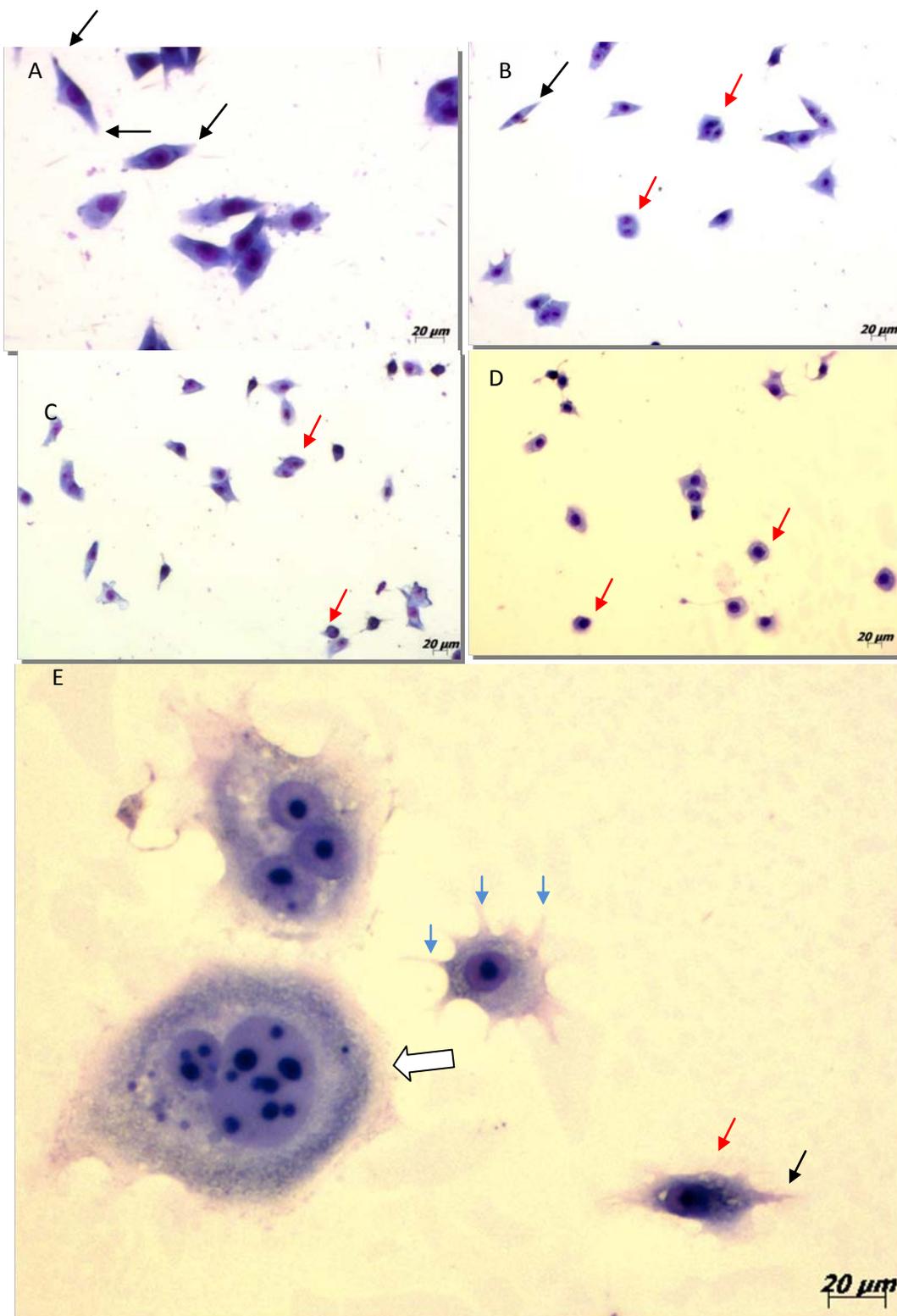


Figura 19: As células (MDAMB-435) foram expostas à biflorina durante 12h. Após o período de incubação, foi realizada ensaio de coloração por May-Grunwald-Giemsa. A. DMSO. B. Biflorina 1 μM; C. Biflorina 2,5 μM, D e E. Biflorina 5,0 μM. Setas pretas: lamelipódia; Setas vermelhas: células pequenas; Setas azuis: filamentos semelhantes a filopódia orientados paralelamente a membrana celular; Seta cheia branca: célula grande.

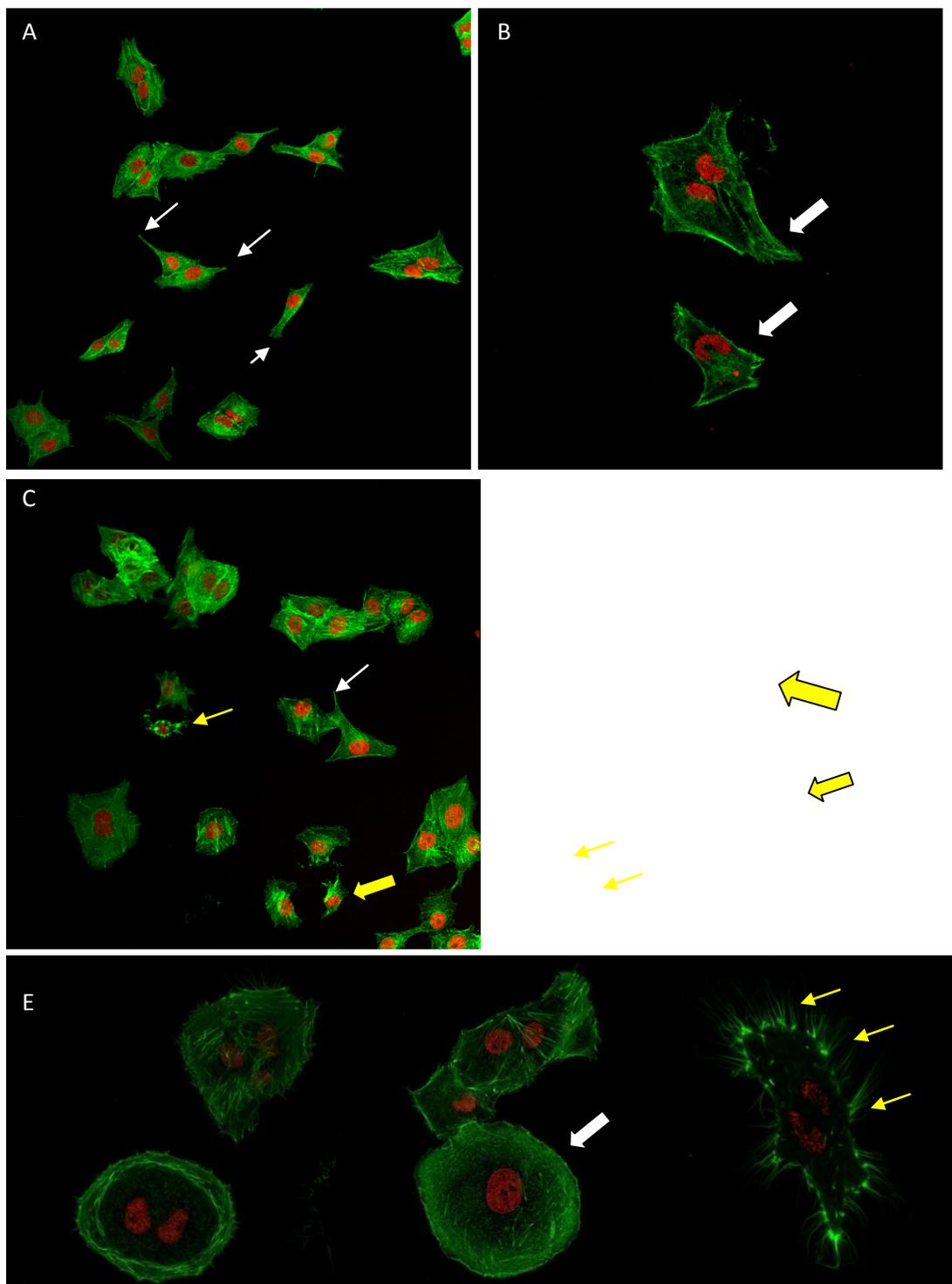


Figura 20. As células (MDAMB-435) foram expostas à biflorina durante 12h. Após o período de incubação, os filamentos de actina foram corados por Faloidina. A. DMSO. B. Biflorina 1,0  $\mu\text{M}$ ; C. Biflorina 2,5  $\mu\text{M}$ . D e E: Biflorina 5,0  $\mu\text{M}$ . Setas brancas: lamelipódia; Setas amarelas: lamelipódia orientadas paralelamente a membrana celular; Setas brancas cheias: filamentos de actina concentrados na periferia da célula; Setas amarelas cheias: Retração celular.

#### **4.7 Estrutura e distribuição dos Filamentos de actina – Microscopia Confocal.**

Procurando entender melhor o mecanismo de ação da biflorina, as células foram coradas com faloidina conjugada com Alexa-Fluor 488 utilizando microscopia confocal. Neste ensaio observamos que, no controle, as células apresentaram formas poligonais com lamelipodia e filopodia concentrado em uma ou poucas localizações na periferia da célula, com organização homogênea dos filamentos de actina por todo o citoplasma, formando inúmeras fibras de estresse. Após tratamento com a biflorina observamos retração celular com desorganização dos filamentos de actina concentrando-se na região periférica do citoplasma. Na maior concentração observamos uma maior concentração dos filamentos de actina nas regiões de contato com substrato e fibras de estresse orientados paralelamente semelhante a filopódios (Figura 20).

#### **4.8 Western Blot – Moléculas de adesão celular**

Como a expressão de moléculas de adesão célula-célula é um fator primordial para a invasividade tumoral, foi realizado ensaio de Western blot com intuito de avaliar a interferência da biflorina sobre a expressão das moléculas de E-caderina, N-caderina e Vimetina. Como esperado, mesmo no controle, não houve detecção de E-caderina, o que nos leva supor que esta linhagem já tenha realizado todo o processo da transição epitélio-mesenquimal. Entretanto, a biflorina foi capaz de diminuir a expressão da N-caderina, de maneira concentração-dependente, apesar de não ter alterado a expressão da vimetina (Figura 21).

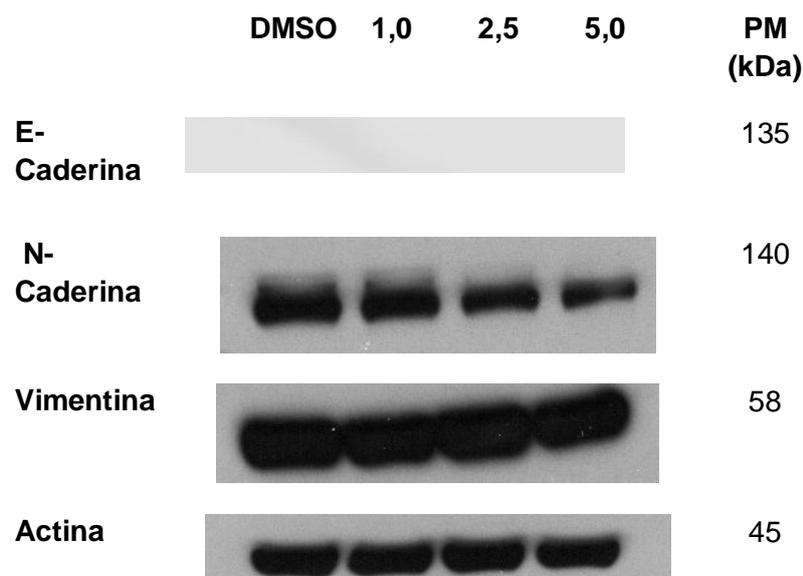
#### **4.9 Western Blot – via do Akt**

A via do Akt é importante para o crescimento, sobrevivência celular e no processo de migração e invasão celular. Diante disso, foi realizado ensaio de

Western blot para proteínas envolvidas na via de sinalização Akt como forma de avaliar a interferência da biflorina sobre esta via. Foi analisado a expressão protéica de PTEN, Akt total, Fosfo-Akt (Thr-308 e Ser-473), PDK-1, c-Raf e P-GSK. A análise foi realizada de forma visual (qualitativa).

A biflorina foi capaz de aumentar, de maneira concentração dependente, a expressão protéica de PTEN, o inibidor de PDK-1. PDK-1, por sua vez, teve expressão diminuída, também de maneira concentração-dependente.

Tanto Akt total quanto suas duas formas fosforiladas apresentaram diminuídas na presença da biflorina, também de maneira concentração-dependente. Entretanto não houve alteração na expressão de c-Raf e P-GSK. Todos os resultados sobre a via do Akt está representado na figura 22.



**Figura 21.** Ensaio de Western blot para E-caderina, N-caderina, Vimentina e  $\beta$ -actina (controle). As células foram incubadas por 12h com concentrações crescentes da biflorina. Após o período de incubação, as proteínas foram extraídas utilizando kit RIPA (Santa Cruz Biothecnology), quantificadas utilizando kit DC Protein Assay (BioRad) e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a separação protéica, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF. Após a tranferência foi realizada a imunodeteccção para E-caderina, N-caderina e Vimetina. A  $\beta$ -actina foi utilizada como controle. PM = Peso Molecular

	DMSO	1,0	2,5	5,0	PM (kDa)
AKT					

# ***Discussão***

## 5. DISCUSSÃO

A progressão de células malignas acaba resultando em invasão e metástase, o qual está envolvido diretamente no mal-prognóstico do paciente. Estes processos envolvem várias etapas: separação de algumas células do tumor primário, penetração destas através da membrana basal, migração das células ao longo da Matriz extracelular (MEC), extravasamento destas para os vasos sanguíneos, adesão das células tumorais ao endotélio vascular, extravasamento das células pelos capilares do órgão/tecido alvo e, finalmente, a formação dos tumores secundários. Durante este processo, várias etapas participam como evento crítico, como a motilidade celular e invasividade, o qual envolve a interação das células tumorais com a MEC (McCORMICK *et al.*, 1992; AKIYAMA *et al.*, 1995).

Substâncias que possam alterar uma(s) da(s) etapa(s) da cascata metastática tornam-se potenciais candidatos no desenvolvimento de substâncias antimetastáticas, condição urgente, hoje, devido ao tratamento das metástases serem ineficaz. E é diante desta necessidade que iniciou o estudo do potencial antimetastático da biflorina.

Foi demonstrado anteriormente por VASCONCELLOS e col. (2005) que a biflorina possui efeito citotóxico frente a cinco linhagens tumorais, elas: CEM e HL-60 (leucemia humana), B-16 (melanoma murino), HCT-8 (côlon humano) e MCF-7 (mama humano). VASCONCELOS e col (2007) também demonstraram que a biflorina possui atividade antitumoral em animais transplantados com Sarcoma 180 e tumor de Erlich com baixa toxicidade. Além disso, foi observado o efeito da biflorina sobre animais transplantados com melanoma B16 e observou que esta aumentava a sobrevivência desses animais, mesmo apresentando pouco efeito antitumoral (VASCONCELLOS, 2007; VASCONCELLOS, 2011).

Foi diante desses resultados da biflorina sobre os animais transplantados com o melanoma B16 (linhagem altamente metastática) que surgiu a hipótese de que essa quinona poderia agir sobre o processo de

formação de tumores secundários, já que esta linhagem em estudo possui alto potencial metastático.

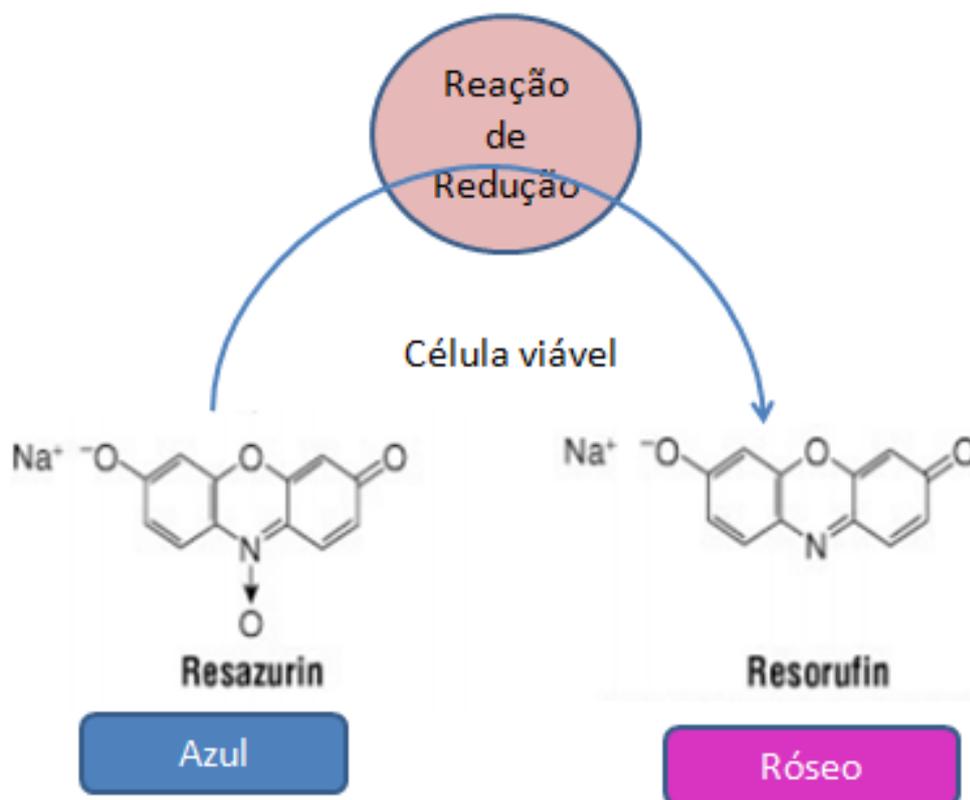
Já é bem descrito na literatura que, quando a linhagem B16-F10 é inoculada via veia caudal, estas migram e formam nódulos no parênquima pulmonar visível a olho nu (YANG *et al.*, 2010). Este ensaio é chamado de metástase experimental, já que as células são inoculadas diretamente na circulação sanguínea, pulando algumas etapas antecedentes para o processo de metastatização. Apesar desta limitação, este ensaio é extremamente útil para o estudo de drogas com potenciais antimetastático (ZHANG, 2010).

Utilizando esse ensaio, CARVALHO (2009) observou que a biflorina inibe a formação dos nódulos metastáticos em camundongos black C57Bl/6, além de aumentar sua sobrevivência, o que propõe que esta quinona possa ter efeito sobre o processo de metastatização. Diante disso resolvemos avaliar, o potencial antimetastático desta o-naftoquinona.

Como dito anteriormente, o ensaio de metástase experimental pula diversas etapas essenciais para a formação de tumores secundários. Dentre estas etapas podemos citar o processo de invasão celular ao longo da matriz extracelular (MEC). Diante disso, foi escolhido como primeiros ensaios, neste trabalho, os ensaios de migração por cicatrização e invasão celular sobre um substrato que mimetiza a MEC, o Matrigel. Entretanto, para realizar tais ensaios é necessário que as concentrações utilizadas do composto teste não apresentem efeito citotóxico, evitando, assim, um resultado falso-positivo.

Como estamos diante de uma molécula com potencial citotóxico já descrito na literatura (Vasconcellos *et al.*, 2005; Vasconcellos *et al.*, 2007; Carvalho, 2009), faz-se necessário a determinação das concentrações não citotóxicas desta quinona. Para este propósito realizamos o ensaio de citotoxicidade utilizando o Alamar Blue.

O Alamar blue, de coloração azul não-fluorescente, é convertido pelas células viáveis em sua forma reduzida, de coloração rósea e fluorescente, permitindo, assim, quantificar o composto formado por absorvância ou fluorescência (NAKAYAMA *et al.*, 1997) (Figura 23). É um reagente estável e solúvel em água, e pouco tóxico. É um ensaio extremamente sensível e por isso escolhido para este trabalho.



**Figura 23: Reação enzimática que ocorre nas células viáveis durante o ensaio do Alamar blue. A formação de Resorufina (composto róseo fluorescente), a partir de Resazurina (composto azul não-fluorescente) torna possível a quantificação de células viáveis em placa de cultura celular por absorvância e fluorescência.**

Foi utilizada, para todos os modelos experimentais, a linhagem celular MDAMB-435, um melanoma humano com alto potencial metastático. Anteriormente, a linhagem MDAMB-435 era classificada como células de

mama, classificação que tem sido debatida desde análise do DNA *microarray*, o qual levou Ross e col. (2000) a sugerir que esta linhagem possa ter se originado de melanócitos, devido às suas semelhanças com linhagens celulares de melanoma. Diante dos estudos que se sucederam, estas células foram re-classificadas como melanoma (CHAMBERS, 2009; LACROIX, 2009). Apesar dessa controvérsia, esta linhagem continua a ser bastante valiosa para o estudo de metástases, por serem agressivas com propriedade migratória e capacidade de invasão celular (RAE, 2007).

No ensaio de citotoxicidade utilizando Alamar blue observamos que a biflorina apresenta efeito citotóxico na linhagem celular MDAMB-435 a partir da concentração mínima de 5  $\mu\text{M}$  após 24h de exposição. Entretanto, nessa mesma concentração (5  $\mu\text{M}$ ), durante 12h de exposição, não foi observado efeito citotóxico. Diante disso, decidimos utilizar a concentração máxima de 5  $\mu\text{M}$  em 12 h de exposição e concentrações mínimas e intermediárias de 1,0 e 2,5  $\mu\text{M}$  para os demais ensaios.

Buscando avaliar se realmente as concentrações escolhidas e utilizadas nos demais ensaios não apresentam efeito citotóxico, realizamos o ensaio de proliferação celular por exclusão de azul de tripan nas concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  durante 12h de exposição.

O ensaio de exclusão por azul de tripan é um ensaio de viabilidade celular em que a absorção deste corante é um forte indicativo de dano na membrana plasmática que culmina na morte celular e fornece uma resposta sobre a viabilidade celular através da comparação do padrão de crescimento das células tratadas e não-tratadas (HYNES *et al.*, 2003).

Decidimos, também, observar o efeito da biflorina, nessas concentrações e condições, em duas linhagens de células normais humanas: células de mama (MCF-10) e fibroblastos (EBF), com o objetivo de avaliar a seletividade da biflorina sobre células tumorais e normais.

Neste ensaio observamos que a biflorina não altera a proliferação celular da linhagem MDAMB-435 e MCF-10 durante 12h de exposição.

Entretanto, para a linhagem de fibroblastos humanos (EBF), foi observada uma diminuição do número de células na maior concentração (5,0  $\mu\text{M}$ ).

Com o objetivo de realmente confirmar que nas concentrações utilizadas a biflorina não apresenta efeito citotóxico, foi realizado ensaio de proliferação celular utilizando como corante o Cristal Violeta (CAO *et al.*, 2011). O Cristal violeta acumula-se no núcleo das células permitindo, de forma qualitativa, a observação da densidade celular na placa de cultura de células. Como as células utilizadas neste trabalho são todas aderidas (e quando mortas, estas perdem a adesão ao assoalho da placa soltando-se após lavagem), as células coradas pelo corante encontram-se viáveis. Este ensaio é qualitativo. Neste ensaio observamos que em todas as concentrações utilizadas (1,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ) a biflorina não alterou a densidade celular nas placas, o qual reforça a segurança de se utilizar essas condições para os ensaios de migração e invasão celular na linhagem MDAMB-435.

A migração celular está envolvida em diversos fenômenos biológicos. É parte fundamental na formação dos órgãos na embriogênese, e sua importância permanece no organismo adulto, tanto na fisiologia normal, quanto nas patologias. Por exemplo, a migração dos fibroblastos e células endoteliais vasculares é essencial para a cura de feridas e angiogênese (LAUFFENBURGER & HORWITZ, 1996), e a migração das células tumorais ao longo da matriz extracelular é essencial para a formação de metástase.

Por ser um processo essencial para a malignidade da célula tumoral, avaliamos o efeito da biflorina sobre a migração celular utilizando o ensaio de migração por cicatrização (*Wound healing*), desenvolvido por Bürk em 1973. Neste ensaio observamos que a biflorina inibiu de maneira concentração-dependente a motilidade celular da linhagem MDAMB-435 (1,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ , 12h). Este dado corrobora com o encontrado anteriormente, no qual foi avaliado o efeito da biflorina sobre a migração celular, entretanto utilizando concentrações e tempo de exposição diferentes (CARVALHO, 2009). Esse resultado nos mostra que nas condições

utilizadas nesse ensaio a biflorina manteve seu efeito anti-migratório sobre as células MDAMB-435.

Entretanto o ensaio de migração por cicatrização possui algumas limitações. Neste ensaio, na verdade, é observado a motilidade celular sobre o material que compõe a placa de cultura celular, o plástico. Entretanto, no organismo vivo, encontramos vários substratos que interferem no processo de migração celular, como o colágeno, fibronectina, laminina, vitronectina entre outros componentes. Para o estudo da invasividade ser o mais próximo ao que ocorre *in vivo*, faz-se necessário o uso de substratos que possam intreragir com a célula tumoral. Um desses ensaios o qual dispõe de componentes que interagem com a célula tumoral é o ensaio de invasão celular utilizando a câmara de Boyden revestida com Matrigel.

O Matrigel constitui uma mistura protéica extraída do estroma tumoral do sarcoma murino EHS (*Engelbreth-Holm-Swarm*). Os principais componentes do Matrigel são proteínas estruturais como laminina, entactina e colágeno; fatores de crescimento e outras proteínas em menor quantidade. A proporção e quantidade exata dessas proteínas não são exatas. Devido a esta composição, o uso do Matrigel permite avaliar etapas primordiais para a invasividade celular, como, adesão, migração e degradação protéica.

No ensaio de invasão celular, é utilizado uma câmara dividida em dois compartimentos por um filtro com poros de 8  $\mu\text{m}$ . Revestindo esse filtro encontramos uma camada de Matrigel. No compartimento superior as células são cultivadas na presença e na ausência da droga em estudo, e no compartimento inferior apenas o meio de cultura que funciona como quimioatraente. Devido a sua característica invasiva, as células invadem a camada de Matrigel em direção ao compartimento inferior, e são essas células que invadiram o Matrigel que são quantificadas.

Este tipo de ensaio permite, então, realização de estudos de potencial antimetastático de drogas que possam agir diretamente sobre a célula tumoral, alterando sua motilidade, sobre moléculas de adesão e

metaloproteinases, o que torna o ensaio mais fidedigno com relação ao processo de invasividade tumoral.

Podemos encontrar na literatura o estudo de drogas que atuam sobre a migração e invasão celular utilizando essas metodologias, como os produtos naturais curcumina (LIN *et al.*, 2009) e berberina (HO *et al.*, 2009).

A curcumina, por exemplo, é capaz de inibir a migração e invasão celular da linhagem de carcinoma humano de pulmão (A549), nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  em ensaio utilizando câmara de boyden modificada. Foi descoberto que esta ação sobre a invasividade celular *in vitro* se dá através da ação sobre a via de sinalização MEKK e ERK com conseqüente inibição dos níveis de metaloproteinases (MMP-2 e -9), enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular (LIN *et al.*, 2009).

A berberina, alcalóide encontrado em plantas, apresentou atividade sobre a migração celular das células de carcinoma de língua (SCC-4) em ensaio de migração por cicatrização, quanto diminuição da invasão celular em ensaio utilizando a câmara de Boyden modificada revestida por matrigel, através da ação, também, sobre enzimas proteolíticas (uPA e MMPs) (HO *et al.*, 2009).

No ensaio de invasão celular utilizando a câmara de Boyden modificada observamos que a biflorina foi capaz de inibir a invasividade da linhagem MDAMB-435 sobre o matrigel de forma concentração-dependente, nas concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  durante 12h de exposição, o qual nos indica o possível potencial antimetastático desta quinona.

Porém, por qual mecanismo a biflorina utiliza para alterar a invasividade da linhagem MDAMB-435 *in vitro*?

A coloração por May-Grunwald-Giemsa é útil para analisar o possível mecanismo de ação da droga, pois permite avaliar alterações morfológicas que possam estar envolvidas na alteração da motilidade celular.

Neste ensaio de morfologia celular foi observada, na ausência da droga, a presença de células alongadas em forma de fibroblasto. Após exposição da biflorina nas concentrações de 1,0; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  durante 12h foi possível observar alterações na estrutura das células. Estas apresentaram formas mais arredondadas, células menores e células gigantes, os quais foram bastante evidentes na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$ . Essas alterações nos fazem propor que esta quinona possa agir sobre o citoesqueleto celular, alterando sua forma e conseqüentemente sua motilidade.

Diante deste pensamento, buscamos avaliar se a biflorina poderia causar alteração no citoesqueleto de actina, o qual possui extrema importância para a migração celular. Para visualização dos filamentos de actina as células foram marcadas com faloidina e visualizadas em microscopia confocal.

Neste ensaio observamos alterações morfológicas muito interessantes. Na ausência da biflorina observamos células poligonais com lamelipodia e filopodia concentrado em uma ou poucas localizações na periferia da célula, com organização homogênea dos filamentos de actina por todo o citoplasma, formando inúmeras fibras de estresse. Após o tratamento com a biflorina, nas concentrações de 1,0 e 2,5  $\mu\text{M}$  (12h), observamos diminuição das fibras de estresse na região central com concentração dos filamentos de actina na região periférica do citoplasma e retração celular. Já na maior concentração (5  $\mu\text{M}$ , 12h), encontramos, também, células maiores apresentando inúmeras expansões filamentosas semelhantes a filopódios contendo filamentos de actina orientados paralelamente.

Esses resultados mostram que a biflorina causa alterações severas na estrutura e distribuição dos filamentos de actina da linhagem MDAMB-435, com a presença de células retraídas e células gigantes com expansões filamentosas semelhantes à filopódios.

O citoesqueleto das células desempenha papel crucial na sustentação celular e alterações em sua estrutura podem influenciar interações adesivas das células (KORB *et al.*, 2004). Esta rede é composta por filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários que por sua vez são formados por subunidades quimicamente distintas, actina, tubulina e proteínas classificadas como proteínas de filamentos intermediários (JANMEY *et al.*, 1995).

Modulação na rede do citoesqueleto celular altera propriedades mecânicas da célula que são essenciais para diversas funções como locomoção e citoquinese (JANMEY *et al.*, 1995), isto é, possui papel primordial para a migração celular.

Consequentemente, a ação da biflorina sobre o citoesqueleto de actina acarreta danos à organização interna, estabilidade estrutural e mecânica da célula, podendo ser um dos mecanismos responsáveis pela inibição da invasividade celular.

Apesar desta vital importância do citoesqueleto de actina sobre a migração celular, agentes terapêuticos que atuem neste alvo farmacológico não têm sido extensamente estudado (HAYOT *et al.*, 2006). Entretanto, HAYOT e col (2006) observaram a ação de diversas drogas sobre o citoesqueleto de actina, como citocalasina D, latrunculina, os quais atuam inibindo a polimerização da actina, e jasplakinolida, o qual induz a polimerização da actina. Essas drogas demonstraram possuir ação inibitória sobre a migração celular, apesar da ação da jasplakinolida ser contraditória.

A jasplakinolida foi capaz de aumentar a locomoção da linhagem A549 (concentrações mais elevadas) enquanto que na linhagem MCF-7 diminuiu (concentrações mais baixas). Este efeito parece estar relacionado com a capacidade da droga em alterar as fibras de actina promovendo mudança na arquitetura celular (HAYOT *et al.*, 2006).

Sabe-se que as moléculas de adesão celular do tipo caderina clássica (como a E-caderina, por exemplo) ligam-se aos filamentos de actina através

de proteínas de ancoragem do tipo catenina. As caderinas não clássicas, de uma forma geral, interagem com os filamentos intermediários.

Como marcadores para a transição epitélio-mesenquimal (TEM) podemos citar a perda da expressão de E-caderina, o aumento da expressão de metaloproteínases envolvidas na degradação da membrana basal, ativação da família de pequenas GTPase Rac/Rho/Cdc42 para a reorganização do citoesqueleto e a translocação. A perda de marcadores epiteliais (E-caderina, citoqueratina, desmoplaquina) é acompanhada pela expressão de marcadores mesenquimais (N-caderina, vimentina e fibronectina) (WALLERAND *et al.*, 2010).

É fato que alterações, transitórias ou permanentes, na expressão de E-caderina tem demonstrado grande importância no processo de metástase tumoral (HARINGTON; SYRINGOS, 2000). Na progressão de tumores uma diminuição ou perda da expressão de E-caderina nas células neoplásicas levaria a redução da aderência dessas células entre as suas vizinhas resultando na migração da mesma (BEAVON *et al.*, 1999). Essa perda da expressão de E-caderina tem sido documentada ocorrer em vários tipos de câncer (BEAVON *et al.*, 1999) inclusive no melanoma.

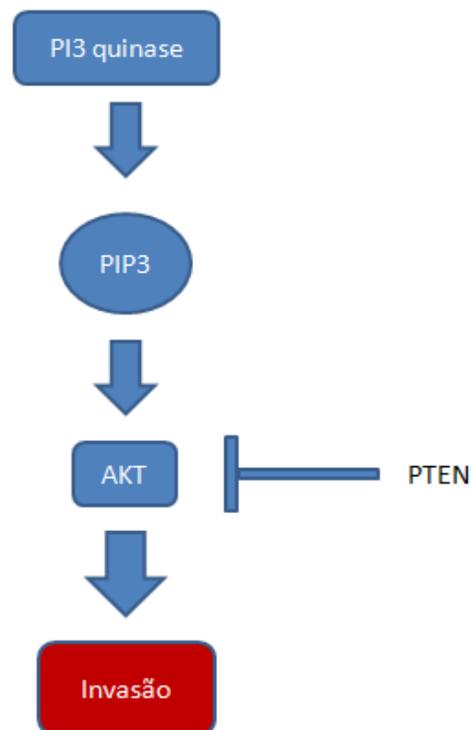
A transição da expressão de E-caderina pela N-caderina pelo melanoma é de suma importância para a invasividade celular. Nos melanócitos normais, a interações célula-matriz ocorre através das moléculas de E-caderina que liga os melanócitos ao colágeno tipo IV- e laminina. Já no melanoma, a adesão ocorre através da N-caderina que liga as células do melanoma ao colágeno tipo I e vitronectina. Esta mudança confere a estas células propriedades agressivas permitindo que estas invadam a derme, a partir da epiderme (HAASS *et al.*, 2005). Algumas células de melanoma ainda podem expressar E-caderina, entretanto parece não ser funcional (HAASS *et al.*, 2005). É claro observar que a expressão de N-caderina funciona como um marcador para a TEM e nos diz muito sobre a invasividade da célula, o qual tem sido demonstrado como indutora do fenótipo mesenquimal em carcinoma de mama e outras células epiteliais *in*

*vitro* com a promoção de invasão e metástase *in vivo* (WALLERAND *et al.*, 2010).

Sabendo que o citoesqueleto das células desempenha papel crucial na sustentação celular e alterações em sua estrutura podem influenciar alterações adesivas das células (KORB *et al.*, 2004), e que a biflorina interferiu sobre a organização do citoesqueleto de actina, o qual possui papel sobre a migração e adesão celular, resolvemos avaliar o efeito da biflorina sobre moléculas de adesão do tipo caderinas utilizando ensaio de Western blot.

Nos ensaios de Western blot percebemos que a linhagem MDAMB-435 não expressa a molécula de adesão E-caderina, provavelmente devido a transição epitélio-mesenquimal estar completa (NAWROCKI *et al.*, 2001). Entretanto, observamos alta expressão de N-caderina nestas células o qual foi diminuída após exposição da biflorina, de maneira concentração-dependente. A inibição da interação célula-MEC, mediada pela N-caderina, em células de melanoma, representa um alvo farmacológico para a diminuição do fenotípico metastático (SATYAMOORTHY *et al.*, 2001). Diante disso, este resultado nos mostra que uma forma da biflorina inibir a invasão celular possa ser através da inibição da expressão da N-caderina.

É descrito na literatura que o aumento da expressão de N-caderina é suficiente para desencadear a TEM, pelo menos, através da ativação da via do Akt/PI3K (WALLERAND *et al.*, 2010) (Figura 24).



**Figura 24. Via do PI3K/Akt ativado em células com alta expressão de N-caderina. PTEN, supressor tumoral, antagoniza a via PI3K/Akt.**

Foi observado em 2010 por Wallerand e col., em células de câncer de bexiga humano, que a expressão de N-caderina está associada com a ativação da via do Akt e com a modulação da forma invasiva celular. Também foi observado, nesse trabalho, que a neutralização de N-caderina inibe a invasão celular através da inativação do Akt e restauração da expressão de E-caderina, o qual traça uma correlação entre a expressão de N-caderina e ativação da via PI3K/Akt. Além desses achados, Rieger-Christh e col. (2004) também observaram que N-caderina possui um papel na invasividade de células de carcinoma de bexiga através da ativação da via PI3k/Akt.

Apesar desses achados, a sinalização entre N-caderina e a via do Akt ainda não está bem elucidada.

Wallerand e col (2010) observaram que a neutralização de N-caderina possui efeito inibitório maior sobre a invasividade celular do que a inibição

do PI-3 quinase sozinho, apesar de que a expressão do Akt sozinho é suficiente para causar invasão na ausência da expressão de N-caderina. Uma explicação para este efeito da N-caderina sobre a invasão celular ser maior, seria que esta regula de forma negativa a expressão de E-caderina. Então sua inibição confere à célula uma restauração da expressão de E-caderina (WALLERAND *et al.*, 2010).

O papel do Akt sobre a progressão tumoral e formação de metástase, além de estar em conjunto com a expressão de N-caderina, nos fez avaliar o efeito da biflorina sobre esta via, utilizando ensaio de Western blot.

No ensaio de Western blot, observamos que a biflorina diminui de maneira concentração-dependente tanto a expressão do Akt quanto do Akt fosforilado (isto é, ativado).

Como a ativação do Akt acarreta no aumento da motilidade e invasão celular (GRILLE *et al.*, 2003), sua diminuição pela biflorina parece estar relacionada com seu efeito na migração celular.

Com objetivo de entender melhor em qual etapa da via do Akt a biflorina poderia agir, realizamos ensaio de Western blot para diversas proteínas envolvidas na via de sinalização do Akt.

Inicialmente observamos a expressão de PDK-1 e PTEN.

A ativação da via do Akt inicia quando fatores de crescimento ligam-se a seus respectivos receptores de tirosina quinase (RTQ), como receptor do fator de crescimento epidermal, receptor do fator de crescimento semelhante a insulina entre outros. Estes receptores promovem ativação da PI3Ka, o qual cataliza a fosforilação do fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP2) gerando o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que liga-se ao Akt. Uma vez posicionado na membrana pela ligação do PIP3, o Akt pode ser fosforilado por quinases como a quinase dependente de fosfoinosítídeo-1 (PDK-1 na treonina 308) e PDK-2 (na serina 473) (HOFLER *et al.*, 2011).

PDK1 e a PDK2 são enzimas que fosforilam os resíduos Ser473 e Thr308 do Akt, ativando-o (CHAN & TSICHLIS, 2001; ALESSI *et al.*, 1996).

Sugere-se que o resíduo Thr308 seja fosforilado pela PDK1 e o resíduo Ser473 pela própria Akt, outras quinases, ou pela PDK2 (CHAN & TSICHLIS, 2001). Uma vez ativada, Akt fosforila uma seqüência de substratos, incluindo mTOR e GSK-3 $\beta$ , que medeiam síntese proteica, transcrição gênica e proliferação celular (GLASS *et al.*, 2003).

Diante disso, estas quinases tornam-se alvos farmacológicos interessantes para ação de drogas que alterem a via de sinalização PIP3/Akt. Portanto, analisamos, inicialmente, o efeito da biflorina sobre o PDK-1.

Avaliando a expressão da PDK1 pela biflorina, observamos que esta quinona foi capaz de inibir de maneira concentração-dependente esta enzima responsável pela ativação do Akt. Também observamos que a biflorina aumentou a expressão do inibidor do PDK1, o PTEN.

O gene PTEN é frequentemente mutado em tumores primários e linhagens tumorais de células humanas. Tanto que o envolvimento de PTEN na oncogênese mamária humana tem sido implicado em estudos os quais mostram que a mutação germinativa do PTEN na doença de Cowden predispõe ao câncer de mama (PETROCELLI & SLINGERLAND, 2001), o que ressalta o papel desta proteína sobre a doença neoplásica.

Com estes resultados, supomos que a biflorina esteja interferindo na via do Akt ao aumentar a expressão do PTEN com conseqüente inibição da expressão do PDK1. Por sua vez, a fosforilação do Akt será diminuída devido à inibição da expressão da sua proteína ativadora, PDK1.

Sargeante e col (2007) também observaram a ação de uma droga com efeito inibidor sobre a PDK-1. O OSU03012, substância derivada do celecoxibe (apesar de ausência de atividade sobre as ciclooxigenases), foi capaz de diminuir o crescimento tumoral em modelo *in vivo* de câncer de próstata, além de ter inibido a incidência de metástase.

Foi demonstrado por Sato e col. (2002) que UCN-01 (7-hidroxytaurosporina), droga que encontra-se em estudo clínico para o

tratamento de diversos tipos de câncer, como leucemia, linfoma, pâncreas e diversos tumores sólidos, induz a desfosforilação e inativação do Akt. Esta ação acarreta na diminuição dos sinais de sobrevivência com indução da morte celular por apoptose. Este efeito também foi observado em ensaios *in vivo* em modelo animal e xenográfico.

UCN-01 participou em estudo clínico de fase II para o tratamento de melanoma metastático avançado, o qual foi administrado via endovenosa durante 3 horas em um ciclo de 21 dias, na ausência de progressão da doença e toxicidade inaceitável. Entretanto, neste estudo, foi observado que embora bem tolerada, UCN-01 como um agente único não possui atividade clínica suficiente para justificar um estudo mais aprofundado no melanoma refratário (LI *et al.*, 2010).

Com o objetivo de investigar as vias que são interferidas pela ação do Akt, avaliamos também a expressão de c-Raf e GSK-3 $\beta$  na presença e ausência da biflorina. Nestas condições, esta quinona não alterou a expressão destas proteínas.

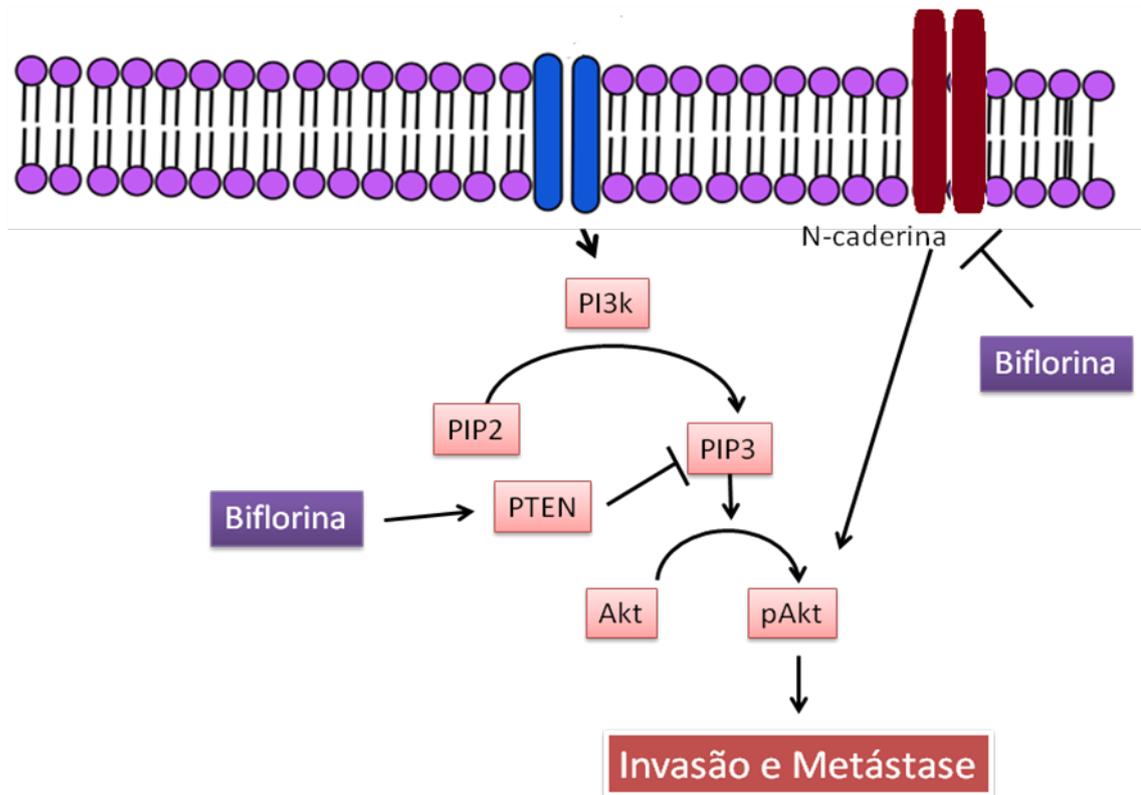
A fosforilação de GSK-3 $\beta$  pelo Akt inibe a ação deste cujo papel principal é modular o metabolismo de carboidratos, agindo sobre a glicogênio sintase, o qual modula a síntese do glicogênio. O GSK-3 $\beta$  também possui papel vital sobre o processo de inflamação, adesão e migração celular, o qual possui contribuições em alguns tipos de câncer (JOPE, *et al.*, 2007).

Ativação da proteína quinase c-Raf pode gerar respostas celulares opostas a proliferação, como parada de crescimento, apoptose ou diferenciação. O Akt também modula estas respostas ao interagir com c-Raf, fosforilando-o inibindo a ativação da via de sinalização Raf-MEK-ERK promovendo um deslocamento da parada do ciclo celular para proliferação (ZIMMERMAN *et al.*, 1999), via importante quando falamos em crescimento tumoral.

Apesar da biflorina atuar diminuindo a expressão tanto do Akt quanto do Akt fosforilado, não observamos alterações nas proteínas GSK-3b fosforilada e c-Raf nas condições realizadas nesse trabalho.

Entretanto esses resultados corroboram com o fato de que as concentrações e condições dos experimentos realizados nesse trabalho não levam a alteração da proliferação nem morte celular. Então seria de esperar que neste tempo de exposição a biflorina não promovesse alterações em vias que levariam a morte celular por apoptose, ou parada de ciclo celular. Entretanto, percebemos que na maior concentração testada neste trabalho (5,0  $\mu\text{M}$ ) durante o dobro do tempo de exposição utilizado (24h em vez de 12h) observa-se diminuição da proliferação celular, quando realizado o ensaio de Alamar blue. Provavelmente, podemos sugerir que em tempo de exposição mais prolongado a fosforilação do c-Raf pode encontrar-se alterado ocasionando a parada do ciclo celular e/ou morte celular por apoptose. Porém isso é apenas uma suposição já que o objetivo deste trabalho não foi estudar o efeito citotóxico da biflorina, e sim, seu potencial antimetastático.

Por fim, sugerimos, como provável mecanismo de ação da biflorina, a modulação da expressão protéica de molécula de adesão do tipo N-caderina além da sua ação sobre a via de sinalização PI3k/Akt, como ilustrado na figura 25.



**Figura 25** Resumo do provável mecanismo de ação da biflorina sobre a invasividade tumoral: A biflorina atuaria aumentando a expressão protéica do PTEN, diminuindo, assim, a via de sinalização PI3k/Akt. Além disso, a biflorina atuaria diminuindo a expressão protéica de moléculas de adesão do tipo N-caderina.

# ***Conclusão***

## 6. CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos dentro deste projeto de pesquisa, podemos concluir que:

- A biflorina possui efeito citotóxico frente à linhagem tumoral MDAMB-435;
- Em condições não-citotóxicas a biflorina é capaz de inibir a migração celular da linhagem MDAMB-435;
- A biflorina também tem a capacidade de inibir a invasão celular da linhagem MDAMB-435 em poços revestidos por Matrigel;
- A biflorina promove a desorganização dos filamentos de actina alterando a morfologia da célula, funcionando como um alvo farmacológico da ação desta droga;
- A biflorina altera a expressão de N-caderina, considerado um marcador para a Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM) e relacionado com a invasividade tumoral;
- A biflorina altera a via de sinalização PI3K/Akt, via na qual possui papel primordial no processo de TEM e de metástase tumoral.

Diante dos resultados encontrados neste trabalho, podemos concluir que a biflorina possui um potencial antimetastático bastante promissor. Entretanto mais estudos são necessários visando entender melhor seu mecanismo de ação e seu papel no desenvolvimento de novos fármacos anticâncer.



# ***Referências Bibliográficas***

## 7. Referências bibliográficas

ALBERTS, A. et al. *Biologia molecular da célula*. Tradução Ana Beatriz Gorine et al. 4a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ACOSTA, S.L.; MURO, L.V.; SACERIO, A.L.; PEÑA, A.R.; OKWEI, S.N. Analgesic properties of *Capraria biflora* leaves aqueous extract. **Fitoterapia** v.74: 7-8, p. 686-688, 2003.

ALBINI, A., IWAMOTO, Y., KLEINMAN, H.K., MARTIN, G.R., AARONSON, S.A., KOZLOWSKI, J.M. AND MCEWAN, R.N. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. **Cancer Res** 47:3239–3245, 1987.

ALESSI, D.R.; JELKOVIC, M.; CAUDWELL, B.; CRON, P.; MORRICE, N.; COHEN, P.; HEMMINGS, B.A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. **EMBO J.**, v. 15, 6541–6551, 1996.

AGARWAL A, DAS, K.; LERNER, N.; SATHE, S.; CICEK, M.; CASEY, G.; SIZEMORE, N. The AKT/IkappaB kinase pathway promotes angiogenic/metastatic gene expression in colorectal cancer by activating nuclear factor-kappaB and beta-catenin. **Oncogene**, 24:1021-31, 2005.

AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v.170, p.211 - 224, 1994.

AKIYAMA, S.K.; AOTA, S.; YAMADA, K.M. Function and receptor specificity of a minimal 20 kilodalton cell adhesive fragment of fibronectin. **Cell Adhes Commun.** v. 3(1) p.13-25, 1995.

AQUINO, T.M. "Caracterização Farmacognóstica de *Capraria biflora*, L. e Estudo Biológico e Físico-químico de seus Metabólitos Secundários." **[DISSERTAÇÃO]**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

AQUINO, T.M.; LIMA, C.S.A.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae): uma Revisão. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25 (3), p.460-7, 2006.

AQUINO, T.M.; AMORIM, E.L.C.; FELICIANO, G.D.; LIMA, E.A.C.; GOMES, M.L.; LIMA, C.S.A.; ALBUQUERQUE, U.P.A.; BERNARDO-FILHO, M. Influence of biflorin on the labelling of red blood cells, plasma protein, cell protein, and lymphocytes with technetium-99m: in vitro study. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v. 17(2), p. 181-185, 2007

BEAVON, I.R.G. Regulation of E-cadherin: does hypoxia initiate the metastatic cascade? **J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.** V. 52, p.179-188, 1999.

BELIVEAU, R.; GINGRAS, D.; KRUGER, E.A.; LAMY, S.; SIROIS, P.; SIMARD, B.; SIROIS, M.G.; TRANQUI, L.; BAFFERT, F.; BEAULIE, E.; DIMITRIADOU, V.; PEPIN, M.C.; COURJAL, F.; RICARD, I.; POYET, P.; FALARDEAU, P.; FIGG, W.D.; DUPONT, E. The Antiangiogenic Agent Neovastat (AE-941) Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-mediated, Biological Effects. v.8, p.1242-1250, **Clinical Cancer Research**, 2002.

BUTLER, M.S. The role of natural products in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v.67, p.2141 – 2153, 2004.

BURK, R.R. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.70, p.368-372, 1973.

BRITO, G.A.; CARNEIRO-FILHO, B.; ORIA, R.B.; DESTURA, R.V.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Clostridium difficile toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. **Dig Dis Sci** v.50, n.7, p.1271-1278, 2005.

CARVALHO, A.A. Estudo da atividade antimetastática da biflorina, uma o-naftoquinona isolada das raízes de *Capraria biflora* **[DISSERTAÇÃO]** Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil, 2009.

CAO, X.; YANG, M.; WEI, R-C.; ZENG, Y.; GU, J-F.; HUANG, W.D.; YANG, D-Q.; LI, H-L.; DING, M.; WEI, N.; ZHANG, N-J.; XU, B.; LIU, X-R.; QIAN, Q.J.; LIU, X-Y. Cancer targeting Gene-Viro-Therapy of liver carcinoma by dual-regulated oncolytic adenovirus armed with TRAIL gene. **Gene Therapy** 18, p. 765-777, 2011.

CAZAUBONS, S.; CHAVEROT, N.; ROMERO, A.; GIRAULT, J.A.; ADAMSON, P.; STRSBERG, A.D.; COURAUND, P.O. Growth factor activity of endothelin-1 in primary astrocytes mediated by adhesion-dependent and -independent pathway. **J. Neurosci.** v. 17, p.6203-6212, 1997.

CHAMBERS, A.F. MDA-MB-435 and M14 Cell Lines: Identical but not M14 Melanoma? **Cancer Res**; v. 69(13, p. 5292-3, 2009

CHAN, T.O. & TSICHILIS, P.N. PDK2: a complex tail in one Akt. **Science's STKE**, v. 66, p. 1-5, 2001

CHEN, H.W.; LEE, J.Y.; HUANG, J.Y.; WANG, C.C.; CHEN, W.J.; SU, S-F.; HUANG, C-W.; HO, C-C.; CHEN, J.J.W.; TSAI, M-F.; YU, S-L.; YANG, P-C. Curcumin Inhibits Lung Cancer Cell Invasion and Metastasis through the Tumor Suppressor HLJ1. **Cancer Res** v. 15 68; p. 7428-38 , 2008.

CHENG, G.Z.; PARK, S.; SHU, S.; HE, L.; KONG, W.; ZHANG, W.; YUAN, Z; WANG, L.H.; CHENG, J.Q. Advances of AKT pathway in human oncogenesis and as a target for anti-cancer drug discovery. **Curr Cancer Drug Targets** 8:2-6, 2008.

CORREIA, M.P. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil, vol 02, p. 205. **Ministério da Agricultura**, Inst. Bras. de Desenvolv. Florestal, 1984.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C. Organismos marinhos como fontes de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Quim. Nova.** v.32, p.703-716, 2009.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; YANG, S.S. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. **J Nat Prod** 69: 488-498, 2006.

DADRAS, S.S.; ASSCHENFELDT, B.L.; VELASCO, P.; NGUYEN, L.; VORÁ, A.; MUZIKANSKY, A.; JEHNKE, K.; HAUSCHILD, A.; HIRAKAWA, S.; MIHN, M.C.; DETMAR, M. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. **Mod Pathol.** 18:1-11, 2005.

DATTA, S.R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M.E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev.** 13(22): 2905-2927, 1999.

FENG, Y.; BHATT, A.J.; FRATKIN, J.D.; RHODES, P.G. Neuroprotective effects of sodium orthovanadate after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats **Brain Research Bulletin**, v. 76(1-2), p. 102-108, 2008.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais Como fontes de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. *Multiciência (UNICAMP)*, 7, 2006.

FONSECA, A.M.; PESSOA, O.D.L.; SILVEIRA, E.R.; LEMOS, T.L.G.; MONTE, F.J.Q.; BRAZ-FILHO, R. Total assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra of biflorin and bis-biflorin from *Capraria biflora*. **Magn Reson Chem** 2003; 41:1038–1040

GEBHARDT, R. In vitro screening of plant extracts and phyto-pharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanism. **Planta Med.** 66: 99–105, 2000.

GLASS, D.J. Signaling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **Nat Cell Biol.** v. 5, 87-90, 2003.

GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L. Método Simples de Extração da Biflorina. **Rev. Inst. Antibiot.** 1, p. 7-9, 1958.

GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; LOUREIRO, P.; CARMONA, C. L.; BERNARD, M. Z. Biflorina, Novo Antibiótico, Isolado da Capraria biflora. **Rev. Quím. Industrial** 14, p. 2-3, 1953.

GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; LOUREIRO, P.; CARMONA, C. L.; BERNARD, M. Z. Novas Observações Sobre a Biflorina, Antibiótico Isolado da Capraria biflora L. **Rev. Quím. Industrial** 249, p. 28-30, 1954.

GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; NAVARRO, M. C. P. Novo Método de Extração e Purificação da Biflorina com Possibilidade Industrial. **Rev. Inst. Antibiot.** 1/2, p. 79-81, 1962.

GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; NETO, B. M.; ALBUQUERQUE, M. M. Breve Nota Sobre a Atividade Antimicrobiana da Biflorina Purificada por Partição Graig. **Rev. Inst. Antibiot.** 1/2, p. 95-97, 1958.

GONÇALVES DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; MAIA, D.; BORBA, M. A. A Ação da Luz Sobre a Biflorina. **Rev. Inst. Antibiot.** 3, p. 97-100, 1961.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.72 – 79, 2005.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; YANG, S.S. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. **Journal of Natural Products**, v.69, p.488 – 498, 2006.

GRILLE, S.J.; BELLACOSA, A.; UPSON, J.; KLEIN-SZANTO, A.J.; ROY F.V.; LEE-KWON, W.; DONOWITZ, M.; TSICHLIS, P.N.; LARUE, L. The Protein Kinase Akt Induces Epithelial Mesenchymal Transition and Promotes Enhanced Motility and Invasiveness of Squamous Cell Carcinoma Lines. **Cancer Research** v. 63, p. 2172–2178, 2003

GRIMBERG A. Mechanisms by which IGF-I may promote cancer. **Cancer Biol Ther** 2:630-5, 2003.

GUMBINER, B.M. Regulation of Cadherin Adhesive Activity. **JCB** v.. 148: 3 p. 399-404, 2000.

GUERITTE, F. & FAHY, J. The vinca alkaloids, Anticancer Agents from Natural Products, **Brunner-Routledge Psychology Press**, v.7 pp. 123–136, 2005

GUERTIN, D.A.; STEVENS, D.M.; THOREEN, C.C.; BURDS, A.A.; KALAANY, N.Y.; MOFFAT, J.; BROWN, M.; FITZGERALD, K.J.; SABATINI, D.M. Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC $\alpha$ , but Not S6K1 **Developmental Cell**, v. 11: 6 p. 859-871, 2006.

GURUVAYOORAPPAN, C. & KUTTAN, G. Effect of Amentoflavone on the Inhibition of Pulmonary Metastasis Induced by B16F-10 Melanoma Cells in C57BL/6 Mice. **Integrative Cancer Therapies** v. 6(2), pp. 185-197, 2007.

HAASS, N. K.; SMALLEY, K. S. M.; LI, L.; HERLYN, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* 18; 150–159, 2005

HARINGTON, K.J.; SYRIGOS, K.S. The role of E-cadherin-catenin complex: more than an intracellular glue? **Annals of Surgical Oncology**. V.7, n.10, p.783-788, 2000.

HSU, M-Y.; MEIRER, F.E.; Nesbit, M.; HSU, J-Y.; Belle, P.V.; ELDER, D.E.; HERLYN, M. E-Cadherin Expression in Melanoma Cells Restores Keratinocyte-Mediated Growth Control and Down-Regulates Expression of Invasion-Related Adhesion Receptors. **The American Journal of Pathology**, v. 156: 5, p. 1515-1525, 2000.

HAYOT, C.; DEBEIR, O.; HAMB, P.V.; DAMME, M.V.; KISS, R.; Decaestecker, C. Characterization of the activities of actin-affecting drugs on tumor cell migration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 211 30 – 40, 2006.

HO, Y-T; Yang, J-S; Li, T-C; Lin, J-J; Lin, J-G; Lai, K-C; Ma, C-Y; Wood, W-G; Chung, J-G. Berberine suppresses in vitro migration and invasion of human

SCC-4 tongue squamous cancer cells through the inhibitions of FAK, IKK, NF- $\kappa$ B, u-PA and MMP-2 and -9. **Cancer Letters** 279 155–162, 2009.

HOFLER, A.; NICHOLS, T.; GRANT, S.; LINGARDO, L.; ESPOSITO, E.A.; GRIDLEY, S.; MURPHY, S.T.; KATH, J.C.; CRONIN, C.N.; KRAUS, M.; ALTON, G.; XIE, Z.; SUTTON, S.; GEHRING, M.; ERMOLIEFF, J. Study of the PDK1/AKT signaling pathway using selective PDK1 inhibitors, HCS, and enhanced biochemical assays. **Analytical Biochemistry** 414 179–186, 2011.

HOSOOKA, T.; NOGUCHI, T.; NAGAI, H.; HORIKAWA, T.; MATOZAKI, T.; ICHIHASHI, M.; KASUGA, M. Inhibition of the motility and growth of B16F10 mouse melanoma cells by dominant negative mutants of Dok-1. **Mol Cell Biol**. v. 21 (16) p. 5437-46, 2001.

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

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em: 04 de janeiro de 2011

ICHIKAWA, H.; TAKADA, Y.; SHISHODIA, S.; JAYAPRAKASAM, B.; NAIR, M.G.; AGGARWAL, B.B. Withanolides potentiate apoptosis, inhibit invasion, and abolish osteoclastogenesis through suppression of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation and NF- $\kappa$ B-regulated gene expression. **Mol Cancer Ther** v. 5(6), p.1434-45, 2006.

JACINTO, E.; FACCHINETTI, V.; LIU, D.; SOTO, N.; WEI, S.; JUNG, S.Y.; HUANG, Q.; QIN, J.; SU, B. SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. **Cell** v. 127 p. 125–137 2006

JANMEY, P.A. The cytoskeleton and cell signaling: Component localization and mechanical coupling. **Physiological Reviews**. V.78, n.3, p.763-781, 1998.

JIANG, B.H.; ZHENG, J.Z.; AOKI, M.; VOGT, P.K. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular-endothelial growth factor in endothelia cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 97:1749–1753, 2000

JPE, R.S.; YUSKAITIS, C.J.; BEUREL, E. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, **Diseases, and Therapeutics. Neurochem Res** v. 32:577–595, 2007.

KANAYAMA, S.; YAMADA, Y.; KAWAGUCHI, R.; TSUJI, Y.; HARUTA, S.; KOBAYASHI, H. Hepatocyte growth factor induces anoikis resistance by upregulation of cyclooxygenase-2 expression in uterine endometrial cancer cells. **Oncol Rep** 19:117-22, 2008.

KIM, D.; CHUNG, J. Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 35(1): 106-115, 2002.

KIM, D.; KIM, S.; KOH, H.; YOON, S.O.; CHUNG, A.S.; CHO, K.S.; CHANG, J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. **FASEB J** 15:1953–1962, 2001

KIRKPATRICK, P. Antibacterial drugs - Stitching together naturally. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v. 1, n. 10, p. 748-748, 2002.

KLEINMAN, H.K. & MARTIN, G.R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. **Seminars in Cancer Biology** v. 15, p.378–386, 2005.

KOBLINSKI, J. E., AHRAM, M. & SLOANE, B. F. Unraveling the role of proteases in cancer. **Clin Chim Acta** 291, 113-135, 2000.

KOCH, A., D. BOZIC, O. PERTZ, AND J. ENGEL. Homophilic adhesion by cadherins. **Curr. Op. Struct. Biol.** 9:275–281, 1999.

KORB, T.; SCHLUTER, K.; ENNS, A.; SPIEGEL, H-U; SENNINGER, N.; NICOLSOM, G.L.; HAIER, J. Integrity of actin fibers and microtubules influences metastatic tumor cell adhesion. **Exp. Cell Res.** V.299, p.236-247, 2004.

KURCHAT P & MAUCH C Mechanisms of metastasis. **Clin Exp Dermatol** v. 25 p.482-489, 2009.

LACROIX, M. MDA-MB-435 cells are from melanoma, not from breast cancer. **Cancer Chemother Pharmacol** v. 63, p.567, 2009.

LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: A physically integrated molecular process. **Cell**, v.84, n.3, p.359-369. 1996.

LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v.227, p. 680-685, 1970.

LE COINTE, P. "Amazônia Brasileira: Árvores e Plantas Úteis", Nacional, São Paulo, 1947.

LEE, B.H., BAE, J.S., PARK, R.W., KIM, J.E., PARK, J.Y., KIM, I.S.  $\beta$ ig-h3 triggers signaling pathways mediating adhesion and migration of vascular smooth muscle cells through  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin. **Exp. Mol. Med.** 38:153–161, 2006.

LIN, S.S.; LAI, K-C.; HSU, S-C; YANG, J-S; KUO, C-L; LIN, J-P; MA, Y-S; WU, C-C; CHUNG, J-G. Curcumin inhibits the migration and invasion of human A549 lung cancer cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). **Cancer Letters** 285, 127–133, 2009.

LI, T.; CHRISTENSEN, S.D.; FRANKEL, P.H.; MARGOLIN, K.A.; AGARWALA, S.S.; LUU, T.; MACK, P.C.; LARA, P.N. JR; GANDARA, D.R. A phase II study of cell cycle inhibitor UCN-01 in patients with metastatic melanoma: a California Cancer Consortium trial. **Invest New Drugs.** 2010

LIU, W.; BAGAITKAR, J.; WATABE, K. Roles of AKT signal in breast cancer. **Front Biosci** 12:4011-9, 2007.

LORENZI, H.; F.J.A. MATOS (2002) "Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas" **Instituto Plantarum**, São Paulo.

LU, X.G., ZHAN, L.B., FENG, B.A., QU, M.Y. YU, L.H. & XIE, J.H. Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene **World Journal of Gastroenterology**, 10, 2140-2144, 2004.

LYRA JÚNIOR, D. P. Isolamento, Atividade Antifúngica e Validação do Método de Doseamento da 3-prenil-6,9-dimetil-7,8-dioxoquinona - Biflorina. **[DISSERTAÇÃO]** Recife, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE, 1999, 106p. Dissertação de Mestrado.

MADDODI, N.; SETALURI, V. Role of UV in cutaneous melanoma. **Photochem Photobiol.** 84(2):528-36, 2008.

MANNING, B.D.; CANTLEY, L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, 129(7): 1261-1274, 2007.

MATOS, F. J. A. Plantas Mediciniais. **Univ. Aberta.** p. 2, 1988.

MENDEZ, M.G.; KOJIMA, S-I.; GOLDMAN, R.D. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. **The FASEB Journal.** v. 24, p.1838-51, 2010.

MENON, L.G.; KUTTAN, R.; KUTTAN, G. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. **Cancer Lett.** v. 1;141(1-2), p. 159-65, 1999.

MCCUBREY, J.A.; STEELMAN, L.S.; FRANKLIN, R.A.; ABRAMS, S.L.; CHAPPELL, W.H.; WONG, E.W.; LEHMANN, B.D.; TERRIAN, D.M.; BASECKE, J.; STIVALA, F.; LIBRA, M.; EVANGELISTI, C.; MARTELLI, A.M. Targeting the RAF/ MEK/ERK, PI3K/AKT and p53 pathways in hematopoietic drug resistance. **Adv Enzyme Regul** 47:64-103, 2007.

MITCHISON, T. J. & CRAMER, L. P. Actin-based cell motility and cell locomotion. **Cell** 84, 371-379, 1996.

MITSIADES, C.S.; MITSIADES, N.; KOUTSILIERIS, M. The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. **Curr Cancer Drug Targets** 4:235-56, 2004.

MIYATA, Y. *et al.* Lymphangiogenesis and angiogenesis in bladder cancer: prognostic implications and regulation by vascular endothelial growth factors-A, -C, and -D. **Clin. Cancer Res.** 12:800-6, 2006.

MOELLING, K.; SCHAD, K.; BOSSE, M.; ZIMMERMANN, S.; SCHWENEKER, M. Regulation of Raf-Akt Cross-talk. **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 277, No. 34, 31099–31106, 2002

NAHTA, R.; YU, D.; HUNG, M.C.; HORTOBAGYI, G.N.; ESTEVA, F.J. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. **Nat Clin Pract Oncol** 3:269-80, 2006.

NAKAYAMA, G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the alamarBlue assay for cellular growth and viability in vitro. **J Immunol Methods** v.26;204(2) p.205-8, 1997.

NEAL, C.P. & BERRY, D.P. Basic principles of the molecular biology of cancer II: angiogenesis, invasion and metastasis . **Surgery (Oxford)**, v. 24: 4 p. 120-125, 2006.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v.17, p.215 – 134, 2000.

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

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, p.461 – 477, 2007.

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

de OLIVEIRA, M.M.J. Atividade Antitumoral Do Álcool E Ácido Perílico Em Células De Leucemia Mielóide Crônica E Glioblastoma Multiforme. **[DISSERTAÇÃO]** Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2010.

PARK, B.K.; ZENG, X.; GLAZER, R.I. Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells. **Cancer Res** 61:7647–7653, 2001

PETROCELLI, T. & SLINGERLAND, J.M. PTEN deficiency: a role in mammary carcinogenesis. **Breast Cancer Res** v.3, p.356-360, 2001.

POLLARD, T. D.; BORISY, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465, 2003.

PRADEEP, C.R. & KUTTAN, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. **Clinical & Experimental Metastasis** v.19 p. 703–708, 2002.

QIAO, M.; IGLEHART, J.D.; PARDEE, A.B. Metastatic potential of 21T human breast cancer cells depends on Akt/protein kinase B activation. **Cancer Res** 67:5293-9, 2007.

QIAO, M.; SHENG, S.; PARDEE, A.B. Metastasis and AKT activation. *Cell Cycle* 7:19, 2991-2996, 2008.

RAE, J.M.; CREIGHTON, C.J.; MECK, J.M.; HADDAD, B.R.; JOHNSON, M.D. MDA-MB-435 cells are derived from M14 Melanoma cells—aloss for breast cancer, but a boon for melanoma research. **Breast Cancer Res Treat** 04:13–19, 2007.

RAPHAEL, T.J. & KUTTAN, G. Effect of naturally occurring monoterpenes carvone, limonene and perillic acid in the inhibition of experimental lung metastasis induced by B16F-10 melanoma cells. **J Exp Clin Cancer Res.** v. 22(3) p. 419-24, 2003.

RASS, K.; HASSEL, J.C. Chemotherapeutics, chemoresistance and the management of melanoma. **G Ital Dermatol Venereol.** 144(1):61-78, 2009.

RÉCAMIER, J.C.A. In: Recherches sur le traitement du cancer. Gabon, Paris, 1829.

RIETHDORF, S.; WIKMAN, H.; PANTEL, K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. **Int. J. Cancer** v. 123, 1991–2006, 2008.

RIEGER-CHRIST, K. M.; LEE, P.; ZAGHA, R.; KOSAKOWSKI, M.; MOINZADEH, A.; STOFFEL, J.; BEN-ZE'EV, A.; LIBERTINO, J. A.; SUMMERHAYES, C. Novel expression of N-cadherin elicits in vitro bladder cell invasion via the Akt signaling pathway. **Oncogene** 23, 4745–4753, 2004.

RIGEL, D.S. Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. **J Am Acad Dermatol.** 58 (5 Suppl 2): S129-32, 2008.

SARGEANT, A.M.; KLEIN, R.D.; RENGEL, R.C.; CLINTON, S.K.; KULP, S.K.; KASHIDA, Y.; YAMAGUCHI, M.; WANG, X.; CHEN, C-S. Chemopreventive and Bioenergetic Signaling Effects of PDK1/Akt Pathway Inhibition in a Transgenic Mouse Model of Prostate Cancer. **Toxicologic Pathology**, 35:549–561, 2007

SATYAMOORTHY, K., MUYRERS, J., MEIER, F., PATEL, D., AND HERLYN, M. Mel-CAM-specific genetic suppressor elements inhibit melanoma growth and invasion through loss of gap junctional communication. **Oncogene** 20, 4676–4684, 2001.

SERPA, J. Ticosporonose Cutânea Curada com Biflorina. **Anal. Fac. Med. Recife** 18, p. 33-37, 1958.

SCHWARTSMANN, G.; RATAIN, M.J.; CRAGG, G.M.; WONG, J.E.; SAIJO, N.; PARKINSON, D.R.; FUJIWARA, Y.; PAZDUR, R.; NEWMAN, D.J.; DAGHER, R.; DI-LEONE, L. Anticancer drug discovery and development throughout the world. **Journal of Clinical Oncology**, v.20, p.47S - 59S, 2002.

SATO, S.;FUJITA, N.; TSURUO, T. Interference with PDK1-Akt survival signaling pathway by UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) **Oncogene** v. 21: 11 p. 1727-1738, 2002.

SHI, X. & WU, C. A Suppressive Role of Mitogen Inducible Gene-2 in Mesenchymal Cancer Cell Invasion. **Mol Cancer Res** v. 6(5), p. 715-24, 2008

SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, W.; CARLSON, A.J.; MATSUOKA, L.Y.; BALCH, C.M.; MIHM, M.C. Malignant Melanoma, An Update. **Arch Pathol Lab Med.** 125(10):1295-1306, 2001.

STILES, B.; GILMAN, V.; KHANZENON, N.; LESCHE, R.; LI, A.; QIAO, R.; LIU, X.; WU, H. Essential role of AKT-1/protein kinase B alpha in PTEN-controlled tumorigenesis. **Mol Cell Biol** 22:3842-51, 2002.

SUBRAMANIAN, B.; NAKEFF, A.; TENNEY, K.; CREWS, P.; GUNATILAKA, L.; VALERIOTE, F. A new paradigm for the development of anticancer agents from natural products. **J Exp Ther Oncol** v. 5(3): p. 195–204, 2006.

TAKAHASHI, Y.; MORALES, F.C.; KREIMANN, E.L.; GEORGESCU, M.M. PTEN tumor suppressor associates with NHERF proteins to attenuate PDGF receptor signaling. **Embo J** 25:910-20, 2006.

TAWBI, H.A. & BUCH, S.C. Chemotherapy Resistance Abrogation in Metastatic Melanoma. **Clinical Advances in Hematology & Oncology**, v. 8, i. 4 p. 259-66, 2010.

TERRANOVA, V.P., HUJAN EN, E.S. AND MARTIN, G.R. Basement membrane and the invasive activity of metastatic tumor cells. **J Natl Cancer Inst** 77:311–316, 1986.

THIERY, J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat. Rev. Cancer.** 2:442–454, 2002.

THIERY, J. P. & SLEEMAN, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 7: 131-142, 2006.

WALLERAND, H.; ROBERT, G.; PASTICIER, G.; RAVAUD, A.; BALLANGER, P.; REITER, R.E.; FERRIÈRE, J-M. The epithelial-mesenchymal transition-inducing factor TWIST is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations** v. 28, p. 473– 479, 2010.

WARMUTH, M.; DAMOISEAUX, R.; LIU, Y.; FABBRO, D.; GRAY, N. SRC family kinases: potential targets for the treatment of human cancer and leukemia. **Curr Pharm Des** 9:2043-59, 2003.

WEI, Q.; LEE, J.E.; GERSHENWALD, J.E.; ROSS, M.I.; MANSFIELD, P.F.; STROM, S.S.; WANG, L.E.; GUO, Z.; QIAO, Y.; AMOS, C.I.; SPITZ, M.R.; DUVIC, M. Repair of UV light-induced DNA damage and risk of cutaneous malignant melanoma. **J Natl Cancer Inst.** 95 (4):308-315, 2003.

WINSEY, S.L.; HALDAR, S.A.; MARSH, H.P.; BUNCE, M.; MARSHALL, S.E.; HARRIS, A.L.; WOJNAROWSKA, F.; WELSH, K.I. A variant within the DNA repair gene *XRCC3* is associated with the development of melanoma skin cancer. **Cancer Res.** 60 (20):5612-5616, 2000.

VASCONCELLOS, M.C.; BEZERRA, D.P.; FONSECA, A.M.; PEREIRA, M.R.P.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; ALVES, A.P.N.N.; COSTA-LOTUFO, L.V. Antitumor activity of biflorin, an o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*. *Biological pharmaceutical bulletin*. V. 30, p.1416-21, 2007.

VASCONCELLOS, M.C.; MONTENEGRO, R.C.; MILITAO, G.C.G.; FONSECA, A.M.; PESSOA, O.D.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. **Z Naturforsch C** v.60(5-6) p.394-8, 2005.

VERSTEEG, H.H.; SPEK, C.A.; PEPPELENBOSCH, M.P.; RICHEL, D.J. Tissue factor and cancer metas- tasis: the role of intracellular and extracellular signaling pathways. **Mol. Med.** 10:6-11, 2004.

YANG, Z.; LEI, Z.; LI, B.; ZHOU, Y.; ZHANG, G-M.; FENG, Z-H.; ZHANG, B.; SHEN, G-X.; HUANG, B. Rapamycin inhibits lung metastasis of B16 melanoma cells through down-regulating alphav integrin expression and up-regulating apoptosis signaling. **Cancer Sci** vol. 101 no. 2 494–500, 2010

YOON, T.J.; KIM, T.J.; LEE, H.; SHIN, K.S.; YUN, Y.P.; MOON, W.K.; KIM, D.W.; LEE, K.H. Anti-tumor metastatic activity of beta-glucan purified from mutated *Saccharomyces cerevisiae*. **Int Immunopharmacol.** v. 8(1), p.36-42, 2008.

ZHANG, L-J.; CHEN, L.; LU, Y.; WU, J-M; SUN, Z-G; ZHENG, S-Z; WANG, A-Y. Danshensu has anti-tumor activity in B16F10 melanoma by inhibiting angiogenesis and tumor cell invasion. **European Journal of Pharmacology** v. 643, p. 195 –201, 2010.

ZHAO, J.; LU, B.; XU, H.; TONG, X.; WU, G.; ZHANG, X.; LIANG, A.; CONG, W.; DAI, J.; WANG, H.; WU, M.; GUO, Y. Thirty-kilodalton Tat-interacting protein suppresses tumor metastasis by inhibition of osteopontin transcription in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology** v. 48:1 p. 265–275, 2008