



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

DIEGO VERAS WILKE

ESTUDO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE SUBSTÂNCIAS
OBTIDAS DO ZOANTÍDEO *Protopalpythoa variabilis* Duerden,
1898 (CNIDARIA, ANTHOZOA) ENCONTRADO NO LITORAL
CEARENSE

FORTALEZA
2009

DIEGO VERAS WILKE

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE SUBSTÂNCIAS
OBTIDAS DO ZOANTÍDEO *Protopalythoa variabilis* Duerden,
1898 (CNIDARIA, ANTHOZOA) ENCONTRADO NO LITORAL
CEARENSE**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo

FORTALEZA
2009

Wilke, Diego Veras

W669e Estudo do potencial anticâncer de substâncias obtidas do zoantídeo *Protopalythoa variabilis* Duerden, 1898 (Cnidaria, Anthozoa) encontrado no litoral cearense / Diego Veras Wilke. – Fortaleza, 2009.
171 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2009.

1. Antozoários. 2. Ensaios de seleção de medicamentos antitumorais. 3. Citotoxicidade. 4. Polissacarídeos. 5. Imunização. I. Lotufo, Letícia Veras Costa (orient.). II. Título.

CDD 615.1

DIEGO VERAS WILKE

ESTUDO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DO ZOANTÍDEO *Protopalythoa variabilis* Duerden, 1898 (CNIDARIA, ANTHOZOA) ENCONTRADO NO LITORAL CEARENSE

Aprovada em 24 de julho de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Rosângela de Almeida Epifanio

Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves

Universidade Federal do Ceará

*Ao meu pai (in memoriam),
pelo estímulo, torcida e entusiasmo com o filho cientista.*

*À Dra. Leticia,
Por todas as lições aprendidas ao longo desses anos e com muito orgulho.*

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Letícia Veras Costa Lotufo** por tudo mesmo: desde a oportunidade de estudar produtos naturais marinhos, vibração tão empolgante com os resultados bons, motivação para seguir adiante para superar todos os problemas encontrados e, naturalmente, pela dedicada orientação, confiança e incentivo à realização das minhas idéias; até seus gestos e exemplos próprios de um exímio caráter que tive como admiráveis lições o meu mais sincero agradecimento. E... conseguimos hein!

Ao **Dr. Manoel Odorico de Moraes** pela oportunidade de estagiar no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) e proporcionar as melhores condições de trabalho possíveis para que fosse realizado;

À **Dra. Otília Pessoa** pela dedicada orientação na química, amizade, empolgação e pela doação à um trabalho tão cheio de dificuldades a serem superadas que foi, sem dúvidas, indispensável para alcançar os resultados alcançados;

À **Dra. Renata Araujo e ao Wildson Max da Silva** pela ajuda na purificação química, empolgação compartilhada, apoio, amizade construída e por não terem desistido de fazer um fracionamento bioguiado “com marinhos”;

À técnica **Silvana França**, pela contribuição fundamental no monitoramento da citotoxicidade deste trabalho, paciência e placas de MTTs sempre urgentíssimas quase toda semana, amizade e convivência diária;

Ao **Dr. Edilberto Silveira** por permitir a realização de etapas de purificação importantes no CENAURENM com liberdade, confiança, amizade e pelo incentivo e contribuição científica dada a este trabalho;

À amiga **Dra. Paula Jimenez** sempre, começando pela contribuição tão preciosa na minha formação científica desde a iniciação científica, pela participação decisiva neste trabalho, e também pela total dedicação, confiança, apoio nas minhas decisões sempre, amizade, hi/estórias compartilhadas e por ter ensinado a me defender do mundo “nem sempre azul” como procuro ver;

Às secretárias **Adelânia Roque** e **Sheyla** pela prestatividade incondicional e amizade, com direto ao prometido “poema dos camundongos” para Adelânia: Um dia quis fazer mais/ Só pra terminar/ Mas só, não dava conta/ Não hesitaste, nem mediste esforços/ Conseguiste/ fiz/ Consegui/ E agradeço enormemente (sem rima, mas a sinceridade é que vale);

Ao **Dr. Antônio Carlos Marques** (USP) pela identificação das espécies utilizadas neste trabalho, e também atenção, prestatividade sempre;

Ao **Dr. Norberto Peporine Lopes** pela amizade, apoio, análises de espectroscopia de massa (valeu também **Tomáz**!) e participação decisiva na elucidação das estruturas;

Ao **Dr. Raimundo Braz-filho** pelo apoio e participação decisiva na elucidação das estruturas;

Aos amigos **Dra. Raquel Montenegro**, **Msc. Delano Marinho**, **Msc. Danilo Rocha** e **Msc. Ana Jérсия** pela ajuda em diversos experimentos, estreita amizade e discussões enriquecedoras;

À **Dra. Cláudia Pessoa**, pela confiança, amizade, apoio e incentivo sempre durante todos os anos de iniciação científica e pós-graduação no LOE;

À **Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes** por disponibilizar a estrutura da Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) para execução de etapas deste trabalho;

Aos amigos **Msc. Bruno Cavalcanti, Elthon John e Felipe Rocha** pela convivência, amizade, ajuda e bom humor;

À **Kézia Lins e Adriana Carvalho** pela amizade, aprendizado e importante ajuda nos experimentos *in vivo* e de imunestimulação;

Aos ICs **Paula Abreu, Miler Barreto, Rafael Sucupira, Arinice, Eveline e Igor** pela convivência, amizade e ajuda em experimentos;

A todos os demais colegas do Laboratório de Oncologia Experimental pela convivência diária e amizade;

Ao **Dr. Marcio Roberto Pereira** pela amizade e lições preciosas e tão didáticas em imunologia inclusive pela disposição para ensinar ELISA em meio a um sem fim de aulas e provas;

À **Dra Nylane, Ingrid e Ítalo** pela disposição em ajudar sempre e com os testes bioquímicos e amizade;

À **Dra. Ana Paula** pela análise histopatológica dos resultados e ajuda na sua interpretação, amizade construída e por ter aceitado dar suas considerações a este trabalho;

À **Dra. Nágila** pela orientação do Max na área de polímeros que rendeu a purificação dos polissacarídeos e pelas análises químicas destes;

Ao **Dr. Ronaldo Ribeiro** pelos conselhos e esclarecimentos importantes para a realização do trabalho da atividade imunestimulante, pelo entusiasmo com o meu rendimento acadêmico, amizade e por ter aceitado dar suas contribuições a este trabalho;

Ao **Dr. Mauro Pavão** e à **Dra. Rosângela Epifanio** por terem aceitado dar suas contribuições e considerações para este trabalho;

À **Dra. Mariana Vale** pelos reagentes cedidos para a realização dos ensaios imunestimulantes;

Às **Dra. Camila Indiani e Msc. Fernanda Novais** (Fiocruz-Ba) pela amizade, aprendizado em imunologia e por ter posto à disposição o laboratório de imunoparasitologia para realização de experimentos finais;

À **Dona Rogéria e Erivanda França** pela amizade, convivência e dedicação excepcional para fornecer as melhores condições de trabalho no LOE;

Às secretárias da Pós-graduação em Farmacologia **Aura Rhanes e Márcia Borges** pelo esforço e prestatividade para resolver todos os assuntos burocráticos cotidianos encontrados ao longo dos anos;

A todo o pessoal da UNIFAC, secretárias **Maria Tereza e Fábria**, técnicos **Raimundo, Paulo Magaiver e Evanir** e **Dra. Ana Leite e Dr. Demétrius**, pela amizade e disposição em ajudar sempre;

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia especialmente, **Chiquinho**, **Alana** e **Sr. Carlos** por fornecerem sempre boas condições de trabalho;

À minha namorada, **Lílian Felismino** desde a participação direta no trabalho nas coletas e formatação e revisão textual, mas também pelo apoio incondicional, imensa compreensão do tempo tomado para realização deste trabalho e, pelos exemplos de/e companheirismo, sinceridade, amor e incontáveis momentos felizes vividos juntos;

Aos irmãos **Gabriel**, **Greta** e **Christiano** e cunhada **Cristina** pela convivência, amor, amizade e apoio sempre;

À minha mãe (**Suzana**) e meu pai (**Rogério**) por serem meus maiores exemplos de caráter e que me faz sentir tanto orgulho, inspiração e admiração, e também pelo estímulo, apoio incondicional e amor sempre;

A todos os demais familiares, que estiveram sempre presentes, pelo estímulo e convivência;

Aos amigos, todos, pela amizade alegria e empolgação com a vida.

Ao CNPq pelo apoio financeiro fundamental à dedicação exclusiva das atividades da pós-graduação.

*“Fazer ou não fazer algo
só depende da nossa vontade e perseverança”*

Albert Einstein

RESUMO

ESTUDO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE SUBSTÂNCIAS OBTIDAS DO ZOANTÍDEO *Protopalythoa variabilis* Duerden, 1898 (CNIDARIA, ANTHOZOA) ENCONTRADO NO LITORAL CEARENSE. Diego Veras Wilke. Doutorado em Farmacologia. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Defesa: 24 de julho de 2009. Orientadora: Dra. Letícia Veras Costa Lotufo.

O câncer é um dos principais problemas mundiais de saúde e uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade em crianças e adultos. Apesar do sucesso no tratamento de diversos tipos de tumor, ainda não se chegou ao fármaco ideal e as terapias existentes nem sempre alcançam resultados satisfatórios além de induzir muitos efeitos colaterais. A pesquisa em produtos naturais marinhos (PNM), embora recente, tem revelado uma enorme diversidade de estruturas químicas, muitas vezes inéditas e com potente atividade biológica. Moléculas citotóxicas, com potencial aplicação na quimioterapia do câncer, são freqüentemente isoladas dos organismos marinhos e dos quatro fármacos oriundos de PNM comercializados atualmente, dois são utilizados na quimioterapia do câncer. Além dos metabólitos secundários, o estudo de polissacarídeos modificadores da resposta biológica para imunoterapia adjuvante também vem surgindo como uma área bastante promissora. Os cnidários juntamente com esponjas, ascídias, moluscos e algas compõem o grupo de representantes marinhos quimicamente mais prolíficos. O zoantídeo *Protopalythoa variabilis* (Cnidaria, Anthozoa) é encontrado no litoral do mundo inteiro, porém o seu potencial farmacológico nunca foi investigado anteriormente. O potencial antitumoral de substâncias obtidas do *P. variabilis* encontrado no litoral cearense foi avaliado neste trabalho. O fracionamento guiado pela citotoxicidade de 4 linhagens de células tumorais (HL-60, leucemia; HCT-8, cólon; SF-295, sistema nervoso central e MDA-MB-435, melanoma) do extrato hidroalcoólico bruto (EHB) rendeu uma mistura de α -aminoácidos lipídicos (**1a/1b**) inéditos a partir da fração hexano e 5 frações (AcOEt-P-1-5) contendo sinais compatíveis com esteróides da fração acetato de etila. Os **1a/1b** apresentaram uma média de concentração inibitória média (CI₅₀) nas linhagens testadas de 85 ng/mL, enquanto a AcOEt-P-4, mais ativa dentre as derivadas da AcOEt exibiu uma média de CI₅₀ de 117,5 ng/mL. Essa foi a primeira vez que α -aminoácidos lipídicos foram obtidos de uma fonte natural e também que o potencial citotóxico de compostos dessa classe é demonstrado. O estudo da citotoxicidade dos **1a/1b** e da AcOEt-P-4, na linhagem leucêmica HL-60, revelou que estas amostras devem sua atividade à indução de apoptose com via intrínseca desempenhando um importante papel. A partir do resíduo do EHB do *P. variabilis*, foram obtidos polissacarídeos sulfatados ligados a proteínas (PPV). O PPV não apresentou citotoxicidade contra as células tumorais *in vitro*, porém induziu 50% de inibição do crescimento tumoral em camundongos transplantados com a linhagem B-16 (melanoma). As análises dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos indicaram que o PPV não apresentou toxicidade nos animais e aumentou a proliferação de monócitos. Estudos adicionais com macrófagos peritoneais *in vitro* confirmaram que o PPV é um modificador da resposta biológica. A ativação dos macrófagos pelo PPV induziu a produção de óxido nítrico, e das citocinas IL-1 β e IL-6, mas não TNF- α . O presente trabalho mostrou que a espécie *P. variabilis* é uma rica e profícua fonte de compostos com potencial antitumoral a ser explorada, possuindo tanto metabólitos citotóxicos capazes de induzir apoptose em células tumorais diretamente, quanto macromoléculas imunomoduladoras com atividade antitumoral *in vivo*.

Palavras-chave: *Protopalythoa variabilis*, α -aminoácidos lipídicos, antitumoral, citotoxicidade, polissacarídeos, imunestimulação.

ABSTRACT

STUDY OF ANTICANCER POTENTIAL OF COMPOUNDS OBTAINED FROM THE ZOANTHID *Protopalpythoa variabilis* DUERDEN, 1898 (CNIDARIA, ANTHOZOA) FROM THE CEARÁ COAST. Diego Veras Wilke. Doctorate Thesis. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Defense: July 24th, 2009. Advisor: Dr. Letícia Veras Costa Lotufo.

Cancer is one of the biggest health problems in all over the world and causes a great amount of death of children and adults. Despite success of several cancer therapies, the ideal anticancer drug is not available yet and the numerous side effects are a limiting point. The natural products research, although recent, has shown often a variety of new chemical structures and potent biological activities. Cytotoxic compounds with possible cancer chemotherapy application are commonly isolated from marine organisms. Two within four marketed drugs from marine sources are used for cancer chemotherapy. Besides small weight molecules, the polysaccharides biological response modifiers also have showing to be a promising field as adjuvant in traditional chemotherapy. Cnidarians together with sponges, ascidians, mollusks and algae form the most promising marine group. The zoanthid *Protopalpythoa variabilis* (Cnidaria, Anthozoa) is found in coastline of whole world, however its pharmacological potential have never been investigated before. The antitumor potential of compounds from *P. variabilis* from Ceará coast was evaluated in this work. The chemical fractionation guided by the cytotoxicity on four tumor cell lines (HL-60, leukemia; HCT-8, colon; SF-295, central nervous system and MDA-MB-435, melanoma) from crude hydroalcoholic extract yield two new lipidic α -amino acids (**1a/1b**) in mixture from hexane fraction and five fractions (EtOAc-P-1-5) containing sterols signals from ethyl acetate fraction. **1a/1b** showed a mean inhibitory concentration mean (IC₅₀) of 85 ng/mL against cell lines tested, whereas EtOAc-P-4, the most powerful of EtOAc derivatives fractions, showed a mean IC₅₀ of 117.5 ng/mL. This was the first report of lipidic amino acids obtained from natural sources and also the first cytotoxic data for this class of compounds. The cytotoxic investigation of **1a/1b** and EtOAc-P-4 on HL-60 cells showed treated-cells dead by apoptosis with critical involvement of intrinsic pathway. Protein-bound sulfated polysaccharides (PPV) with high molecular mass were obtained from residue of the hydroalcoholic extract. PPV did not showed cytotoxicity on tumor cell lines *in vitro*, however it induced 50% of tumor growth inhibition on melanoma B-16 bearing-mice. No toxic evidences were observed in histopathology analysis as well as in biochemical and hematological parameters, however circulating monocytes increased with PPV treatment. In addition peritoneal macrophages investigated *in vitro* confirmed that PPV is a biological response modifier. The PPV-induced macrophage activation stimulated the release of nitric oxide and cytokines IL-1 β and IL-6, but did not do TNF- α . This work showed that *P. variabilis* is a rich source of antitumor compounds, having both small cytotoxic molecules and polysaccharides biological response modifiers with antitumor activity *in vivo*.

Key-words: *Protopalpythoa variabilis*, lipidic α -amino acids, antitumor, cytotoxicity, polysaccharides, immunostimulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características comuns a quase todos os tipos de câncer.	23
Figura 2 – Relação entre os aspectos intrínsecos e extrínsecos da progressão tumoral.	24
Figura 3 – Estruturas químicas dos nucleosídeos espongotimidina e esponouridina isolados por Bergmman e Feeney e dos derivados Ara-A e Ara-C utilizados na clínica.....	27
Figura 4 – Primeiros compostos de origem marinha a serem aprovados para uso clínico, ω -conotoxina e trabectadina.	28
Figura 5 – Quantidade relativa de compostos marinhos agrupados por filo.	33
Figura 6 – Estruturas de compostos isolados de cnidários com diferentes atividades biológicas.	34
Figura 7 – Distribuição relativa da quantidade de novos compostos marinhos descobertos no mundo.	36
Figura 8 – Fotografias de colônias do zoantídeo <i>Protopalythoa variabilis</i> encontrados na costa cearense.	38
Figura 9 – Locais onde foram realizados estudos e/ou registros taxonômicos de <i>Protopalythoa variabilis</i>	39
Figura 10 – Estrutura química de zoantaminas e da pseudozoantoxantina.	42
Figura 11 – Local de coleta.	44
Figura 12 – Fluxograma esquemático dos processos de extração e partições do zoantídeo <i>Protopalythoa variabilis</i>	58
Figura 13 – Fluxograma esquemático dos procedimentos realizados para purificação da fração hexano (Hex) obtida através de partição líquido/líquido do extrato hidroalcoólico bruto do zoantídeo <i>Protopalythoa variabilis</i> (EHB).....	61
Figura 14 – Estrutura química dos α -aminoácidos lipídicos 1a e 1b isolados do zoantídeo <i>Protopalythoa variabilis</i>	63
Figura 15 – Fluxograma esquemático dos procedimentos realizados para purificação da fração acetato de etila (AcOEt) obtida através de partição líquido/líquido do extrato hidroalcoólico bruto do zoantídeo <i>Protopalythoa variabilis</i> (EHB).....	64

Figura 16 – Cromatograma da fração acetato de etila AcOEt-P. E	64
Figura 17 – Alterações morfológicas em células HL-60 sem tratamento (A) ou tratadas com 300 ng/mL de doxorubicina (B), ou com 100 e 250 ng/mL de 1a/1b (C e D respectivamente), após 24 horas de incubação.	66
Figura 18 – Espalhamento frontal da luz (FSC-Linear) e lateral (SSC-Linear) de células HL-60 sem tratamento (A) ou tratadas com 300 ng/mL de doxorubicina (B), ou com 100, 250 e 500 ng/mL de 1a/1b (C, D e E respectivamente), após 24 horas de incubação.	67
Figura 20 – Viabilidade celular.	69
Figura 21 – Potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	70
Figura 22 – Fragmentação de DNA.	71
Figura 23 – Resumo das alterações induzidas pelos α -aminoácidos lipídicos (1a/1b) nas células HL-60 após 24 horas de incubação.	72
Figura 24. Alterações morfológicas em células HL-60 sem tratamento (A) ou tratadas com 300 ng/mL de doxorubicina (B), ou com 50 e 100 ng/mL da fração AcOEt-P-4 (C e D respectivamente), após 24 horas de incubação.	73
Figura 25 – Espalhamento frontal da luz (FSC-Linear) e lateral (SSC-Linear) de células HL-60 sem tratamento (A) ou tratadas com 300 ng/mL de doxorubicina (B), ou com 50 e 100 ng/mL da fração AcOEt-P-4 (C e D respectivamente), após 24 horas de incubação.	74
Figura 27 – Viabilidade celular.	75
Figura 28 – Potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	76
Figura 29 – Fragmentação de DNA.	77
Figura 30 – Resumo das alterações induzidas pela fração AcOEt-P-4 em células HL-60 após 24 horas de incubação.	78
Figura 31 – Estruturas químicas dos aminoácidos lipídicos 1a e 1b isolados de <i>P. variabilis</i> , dos esfingolipídeos esfingosina e esfingosina-1-fosfato e dos inibidores da esfingosina quinase safingol, dimetil-esfingosina e episulolina.	83
Figura 32 – Ilustração esquemática do mecanismo proposto para ativação de células imunes por polissacarídeos modificadores da resposta biológica.	91

Figura 33 – Fluxograma esquemático dos processos de extração dos polissacarídeos de zoantídeo <i>Protopalythoa variabilis</i> a partir do resíduo do extrato hidroalcoólico bruto (EHB).	105
Figura 34 – Efeito dos polissacarídeos sulfatados ligados a proteínas de <i>Protopalythoa variabilis</i> (PPV) sobre o volume tumoral de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 transplantados com melanoma B-16 subcutâneo.	106
Figura 35 – Efeito do polissacarídeo isolado de <i>Protopalythoa variabilis</i> (PPV) sobre a massa tumoral de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 transplantados com melanoma B-16 subcutâneo.	107
Figura 36 – Efeito dos polissacarídeos isolados de <i>Protopalythoa variabilis</i> (PPV) sobre a massa de órgãos de camundongos	108
Figura 37 – Fotomicrografias de fígados de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 tratados com salina intraperitonealmente sem transplante do tumor (A) ou transplantados com melanoma B-16 (B) e tratados com polissacarídeos de <i>Protopalythoa variabilis</i> (25 mg/kg/dia) por via intraperitoneal (C) ou oral (D).	109
Figura 38 – Fotomicrografias de baços de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 tratados com salina intraperitonealmente sem transplante do tumor (A) ou transplantados com melanoma B-16 (B) e tratados com polissacarídeos de <i>Protopalythoa variabilis</i> (25 mg/kg/dia) por via intraperitoneal (C) ou oral (D).	110
Figura 39 – Fotomicrografias de rins de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 tratados com salina intraperitonealmente sem transplante do tumor (A) ou transplantados com melanoma B-16 (B) e tratados com polissacarídeos de <i>Protopalythoa variabilis</i> (25 mg/kg/dia) por via intraperitoneal (C) ou oral (D).	111
Figura 40 – Fotomicrografias de melanoma B-16 transplantados sub-cutâneamente em camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 tratados com salina intraperitonealmente (A) tratados com polissacarídeos de <i>Protopalythoa variabilis</i> (25 mg/kg/dia) por via intraperitoneal (B) ou oral (C).	112
Figura 42 – Contagem de leucócitos totais de sangue de camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 saudáveis ou transplantados com melanoma B-16.....	114
Figura 44 – Migração de neutrófilos em camundongos	116
Figura 45 – Detecção de nitrito no sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos.....	117

Figura 46 – Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos	117
Figura 47 – Produção de IL-1 β por macrófagos peritoneais de camundongos.	118
Figura 48 – Produção de IL-6 por macrófagos peritoneais de camundongos.....	118
Figura 49 – Os monócitos podem diferenciar em diferentes tipos de macrófagos (M ϕ) dependendo dos fatores a que são expostos.	124
Figura 50 – Resumo esquemático dos efeitos observados em camundongos <i>Mus musculus</i> C57BL/6 tratados com os polissacarídeos do <i>Protopolythoa variabilis</i> (PPV) administrado intraperitonealmente (IP).....	125
Figura 51 – Figura esquemática evidenciando os fatores liberados (em azul) pelos macrófagos (M ϕ) ativados pelos polissacarídeos do <i>Protopolythoa variabilis</i> (PPV) e os efeitos possíveis no organismo (em laranja).....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação da citotoxicidade e do potencial hemolítico do extrato hidroalcoólico bruto (EHB) e frações obtidas por partição líquido/líquido com solventes de polaridades crescentes: n-hexano (fração Hex), diclorometano (fração DCM) e acetato de etila (fração AcOEt) e fração hidroalcoólica contendo compostos mais polares (MeOH/H₂O) 59

Tabela 2 – Avaliação da citotoxicidade das sub-frações da fração hexano (Hex) através do teste do MTT após 72 horas de incubação em linhagens de células tumorais 62

Tabela 3 – Avaliação da citotoxicidade das sub-frações obtidas a partir da fração acetato de etila (AcOEt) através do teste do MTT após 72 horas de incubação em linhagens de células tumorais 65

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\psi_m$	potencial transmembra mitocondrial
AALs	α -aminoácidos lipídicos
AAs	aminoácidos
AcOEt	acetato de etila
ALT	alanina transaminase
AST	aspartato transaminase
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
C-	controle negativo
CE ₅₀	concentração efetiva média
CF	citometria de fluxo
CI ₅₀	concentração inibitória média
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CR3	receptor do complemento-3
CTL	linfócitos citolíticos T
DCM	diclorometano
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
Dox	doxorrubicina
EF	esfingosina
EF1P	Esfingosina 1-fosfato
EFQ	esfingosina quinase
EHB	extrato hidroalcoólico bruto
EMEA	Agência Européia de Medicamentos
EPM	erro padrão da média
EtOH	etanol
FDA	Food and Drug Administration
FSC	<i>forward scatter</i>

HE	hematoxilina e eosina
HEPES	ácido 4-2-(hidroxietil-1)-piperazinaetanosulfônico
Hex	Hexano
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HSV	vírus <i>Herpes simplex</i>
IC95%	intervalo de confiança de 95%
IFN	interferon
IL	Interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
IP	via intraperitoneal
IV	infravermelho
LAFIPLAM	laboratório de análise fitoquímica de plantas medicinais
LAK	células <i>natural killer</i> ativadas por linfocinas
LPS	lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
MDR	modificador da resposta biológica
MeOH	metanol
MIT	microambiente inflamatório tumoral
MP	membrana plasmática
MR	receptor de manose
MRB	modificadores da resposta biológica
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MUZUSP	Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo
M ϕ	Macrófagos
NCI-USA	Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América
NK	células <i>natural killer</i> (assassinas naturais)
NOS	óxido nítrico sintase
p/v	peso por volume
PAMPs	padrões moleculares associados à patógenos
PBS	tampão fosfato
PI	iodeto de propídeo

PNM	produtos naturais marinhos
PPV	extrato de polissacarídeos do zoantídeo <i>Protopalythoa variabilis</i>
PRR	receptor de reconhecimento de padrões
PS	polissacarídeos
PSP	polissacaro-peptídeo
PTX	Palitoxina
RMN	ressonância magnética nuclear
s	singleto
SFB	soro fetal bovino
sl	singleto largo
SR	receptor <i>scavenger</i>
SSC	<i>side scatter</i>
t	Tripleto
TAM	macrófagos associados ao tumor
TIL	linfócitos infiltrados no tumor
tl	tripleto largo
TLR	receptor <i>toll-like</i>
TNF	fator de necrose tumoral
VO	via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	22
1.1 Câncer	22
1.2 Produtos naturais marinhos	26
1.3 Potencial anticâncer de organismos marinhos do litoral cearense	36
1.4 <i>Protopalythoa variabilis</i>	38
2 CAPÍTULO I	40
2.1 Introdução	41
2.2 Objetivos	43
2.2.1 Geral	43
2.2.2 Específicos	43
2.3 Materiais e métodos	44
2.3.1 Materiais Utilizados	44
2.3.2 Coleta e identificação do zoantídeo <i>Protopalythoa variabilis</i>	44
2.3.3 Extração e partições	45
2.3.4 Fracionamento guiado pela atividade citotóxica da fração hexano	45
2.3.4.1 <i>Caracterização estrutural dos α-aminoácidos lipídicos (1a/1b)</i>	46
2.3.5 Fracionamento guiado pela atividade citotóxica da fração acetato de etila	46
2.3.5.1 <i>Dados espectroscópicos das frações AcOEt-P-1-5</i>	47
2.3.6 Monitoramento da atividade biológica.....	47
2.3.6.1 <i>Atividade citotóxica</i>	47
2.3.6.2 <i>Atividade hemolítica</i>	49
2.3.7 Estudo da citotoxicidade.....	50
2.3.7.1 <i>Análise morfológica por microscopia óptica</i>	51
2.3.7.2 <i>Análise morfológica e contagem celular por citometria de fluxo</i>	52
2.3.7.3 <i>Determinação da integridade da membrana plasmática</i>	54
2.3.7.4 <i>Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial</i>	54
2.3.7.5 <i>Avaliação da fragmentação de DNA</i>	56
2.3.7.6 <i>Análise de alterações no ciclo celular</i>	57
2.4 Resultados	58
2.4.1 Extração e partições	58
2.4.2 Fracionamento guiado pela atividade citotóxica da fração hexano	59
2.4.3 Fracionamento guiado pela atividade citotóxica da fração acetato de etila	63
2.4.4 Estudo da citotoxicidade dos α -aminoácidos lipídicos 1a/1b em células HL-60 após 24 horas de incubação.....	65

2.4.4.1 Alterações na morfologia e viabilidade celular.....	66
2.4.4.2 Despolarização do potencial transmembrana mitocondrial	69
2.4.4.3 Fragmentação de DNA.....	70
2.4.4.4 Análise do ciclo celular	71
2.4.4.5 Resumo dos resultados	71
2.4.5 Estudo da citotoxicidade da fração acetato de etila-4	72
2.4.5.1 Alterações na morfologia e viabilidade.....	73
2.4.5.2 Despolarização do potencial transmembrana mitocondrial	76
2.4.5.3 Fragmentação de DNA.....	76
2.4.5.4 Análise do ciclo celular	77
2.4.5.5 Resumo dos resultados	77
2.5 Discussão.....	79
2.6 Conclusões	88
3 CAPÍTULO II	89
3.1 Introdução	90
3.2 Objetivos.....	93
3.2.1 Geral	93
3.2.2 Específicos	93
3.3 Métodos	94
3.3.1 Extração e caracterização dos polissacarídeos.....	94
3.3.2 Avaliação da atividade citotóxica	94
3.3.3 Avaliação do efeito antitumoral <i>in vivo</i> em camundongos.....	95
3.3.4 Análise da toxicidade	96
3.3.4.1 Análise histopatológica dos órgãos e tumores	96
3.3.4.2 Análise dos parâmetros bioquímicos	97
3.3.4.3. Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	98
3.3.5 Estudo da atividade imunoestimulatória	99
3.3.5.1 Avaliação da migração de neutrófilos <i>in vivo</i> em camundongos	100
3.3.5.2 Avaliação da ativação <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneais de camundongos	101
3.3.5.2.1 Obtenção dos macrófagos peritoneais	101
3.3.5.2.2 Manuseio dos macrófagos <i>in vitro</i>	101
3.3.5.2.3 Ativação dos macrófagos	101
3.3.5.2.4 Produção de NO	102
3.3.5.2.5 Detecção de citocinas	103
3.4. Resultados.....	105

3.4.1 Extração, isolamento e caracterização dos polissacarídeos isolados de <i>Protopalycha variabilis</i>	105
3.4.2 Efeitos sobre a proliferação <i>in vitro</i>	106
3.4.3 Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	106
3.4.4 Análise da toxicidade	107
3.4.4.1 Análise histopatológica	107
3.4.4.2. Análise dos parâmetros bioquímicos.....	112
3.4.4.3 Análise dos parâmetros hematológicos.....	113
3.4.5 Estudo da atividade imunoestimulante.....	115
3.4.5.1 Migração de neutrófilos	115
3.4.5.2 Ativação de macrófagos peritoneais <i>in vitro</i>	116
3.4.5.2.1. Produção de NO	116
3.4.5.2.2 Liberação de citocinas	117
3.5 Discussão	119
3.6 Conclusões	128
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
ANEXO I	152
ANEXO II	161
ANEXO III	166

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Câncer

O câncer é um dos principais problemas mundiais de saúde e uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade em crianças e adultos de ambos os sexos. No ano de 2000 foram registrados 5,3 milhões de casos de câncer em homens e 4,7 milhões de casos em mulheres (PARKIN, 2001). A incidência mundial desta doença chega a mais de 10 milhões de novos casos, dentre os quais 53% têm ocorrido nos países em desenvolvimento (INCA, 2009). No Brasil, 145.433 mortes por neoplasias malignas foram registradas em 2005 (DATASUS, 2009) e a estimativa é que surgirão mais 466.730 novos casos em 2009 (INCA, 2009).

As neoplasias malignas estão intimamente relacionadas a alterações no genoma. As mutações de maior relevância encontradas no câncer tornam o funcionamento dos oncogenes dominante e o dos genes supressores tumorais recessivo. A partir de observações clínicas e modelos animais, tem sido feito um paralelo do desenvolvimento tumoral com a evolução Darwiniana, a qual postula que uma sucessão de alterações genéticas conferem características vantajosas à sobrevivência do indivíduo, mas com a grande diferença, nesse caso o indivíduo em questão é o câncer (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Existem mais de 100 tipos de câncer, sendo que quase todos eles possuem em comum, além da instabilidade genética, 7 alterações celulares intrínsecas: auto-suficiência em fatores de crescimento, insensibilidade a fatores antiproliferativos, invasão tecidual e metástase, neo-vascularização, potencial replicativo ilimitado, evasão da apoptose e “invisibilidade” à imunovigilância (Fig. 1) (HANAHAN e WEINBERG, 2000; DUNN *et al.*, 2004). Recentemente, também tem sido discutida a importância crucial do microambiente inflamatório tumoral (MIT) no favorecimento da progressão tumoral (Fig. 1) através do recrutamento e diferenciação subsequente de linfócitos, macrófagos (M ϕ) e células dendríticas em tipos inofensivos às células neoplásicas culminando na subversão do sistema imune (Fig. 2) (ZITVOGEL *et al.*, 2006; COLOTTA *et al.*, 2009).

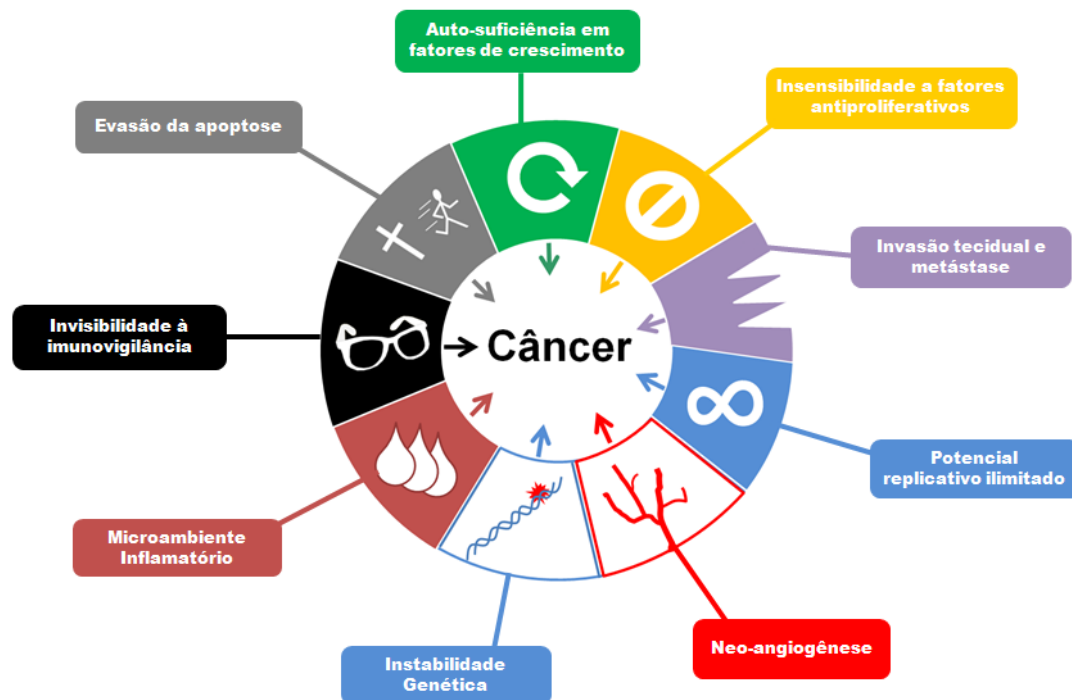


Figura 1 – Características comuns a quase todos os tipos de câncer. Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2000; Dunn et al., 2004 e Colotta et al., 2009.

O sistema imune tem a função natural de reconhecer e eliminar as células aberrantes ou disfuncionais por um processo chamado de imunovigilância (REIMAN *et al.*, 2007). Mesmo quando já há um tumor, a migração de linfócitos seguida da infiltração, a priori, pode aumentar as chances de resposta antitumoral do sistema imune, porém o MIT regula negativamente as respostas antitumorais (BALKWILL, 2003; BALKWILL, 2004). Mais especificamente, a produção de: quimiocinas (p. ex. CCL2, CCL20 e interleucina 8); de fatores de crescimento [p. ex. fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês, *Granulocyte Macrophage- Colony Stimulating Factor*) e fator de crescimento tumoral β (TGF- β , do inglês, *Tumor Growth Factor*)] e metaloproteases (p. ex. MMP7 e MMP9) no MIT desempenha o papel supressor à imunidade antitumoral e favorecedor do crescimento e invasividade de diferentes maneiras (MANTOVANI *et al.*, 2008).

Inicialmente, na progressão tumoral, por efeito autócrino ou parácrino, as quimiocinas podem estimular o crescimento tão rápido do tumor que a imunovigilância não é capaz de erradicar todas as células alteradas. Também foi demonstrado que quimiocinas como as MCP-1/CCL-2 podem induzir a diferenciação dos linfócitos infiltrados no tumor

(TILs, do inglês, *Tumor Infiltrating Lymphocytes*), para tipo Th2, que por sua vez, contribuem para a polarização da resposta inflamatória tipo II (BALKWILL e MANTOVANI, 2001). As respostas tipo II favorecem o crescimento e sobrevivência das células tumorais e suprimem a imunidade celular (GU *et al.*, 2000). Além destes efeitos, as quimiocinas do MIT podem suprimir a apresentação de antígenos através da inibição da maturação de células dendríticas e também induzir morte dos TILs pela indução da produção autócrina de CCR5 (ZOU *et al.*, 2001; MELLADO *et al.*, 2001).

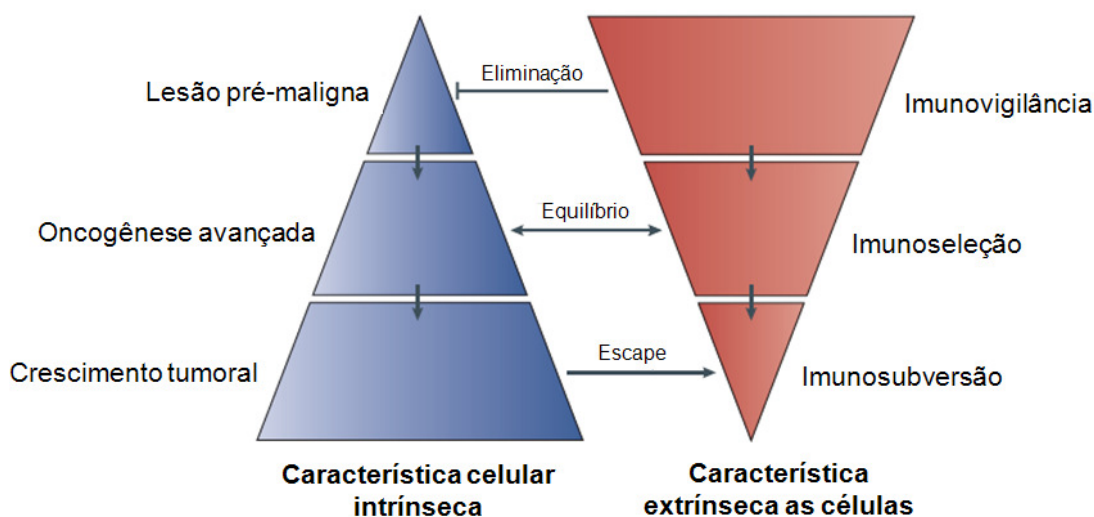


Figura 2 – Relação entre os aspectos intrínsecos e extrínsecos da progressão tumoral. A figura sumariza o crosstalk entre os fatores intrínsecos (celulares) e extrínsecos (sistema imune do hospedeiro) relacionados ao desenvolvimento do câncer. Modificado de Zitvogel *et al.*, 2006.

A cirurgia, quimioterapia e radioterapia são as estratégias terapêuticas clássicas para o tratamento de pacientes com diferentes tipos de câncer. Hoje se contam muitos casos de sucesso no tratamento de diversos tipos de tumor, mas ainda não se chegou ao fármaco ideal e as terapias existentes nem sempre alcançam resultados satisfatórios como a remissão de tumores e a prevenção de metástase, além de induzir muitos efeitos colaterais (SALGALLER e LODGE, 1998).

Uma característica comum a grande parte dos quimioterápicos antineoplásicos é a citotoxicidade, que tem como resultado final na maioria das vezes a morte por apoptose das células tumorais. Diferentes alvos como os ácidos desoxirribonucléicos (DNA, do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*) microtúbulos, tubulina, topoisomerase, proteassomo, tirosinas quinase, telomerase, proteínas de checagem do ciclo celular, ceramidases entre outros, são

capazes induzir a célula tumoral a entrar em apoptose (JORDAN, 2002; LOS *et al.*, 2003; CHASE e CROSS, 2006; BAILLY, 2000; ROSA *et al.*, 2008; KAWABE, 2004; HUWILER e ZANGEMEISTER-WITTKE, 2007).

A massa tumoral originada a partir de uma única célula clone é constituída por uma população de células heterogêneas. As sub-populações de células podem diferir fenotipicamente no cariótipo, na responsividade hormonal e na suscetibilidade a agentes antineoplásicos. Por exemplo, tumores com baixa fração de crescimento como o câncer de mama e de colo do útero possuem uma menor suscetibilidade à quimioterapia e a ausência de antigenicidade das células favorece a uma maior tolerância ao ataque do sistema imunológico (KUMAR *et al.*, 2004). Tendo ciência de que o câncer apresenta uma grande diversidade biológica, a associação de diferentes tipos de terapias utilizadas atualmente no tratamento de neoplasias e a busca de novas estratégias de intervenção tem surgido com uma perspectiva de se alcançar maior eficácia terapêutica (EVAN e VOUSDEN, 2001).

A imunoterapia é uma das estratégias que tem sido estudada em diversos modelos animais e ensaios clínicos em pacientes com câncer, objetivando aumentar a eficiência terapêutica com baixa toxicidade. Evidências que demonstram a importância do sistema imunológico inato e adquirido têm sido acumuladas até mesmo em tratamentos baseados em quimio ou radioterapia (ZITVOGEL *et al.*, 2008). As diversas formas de imunoterapia enquadram-se dentro de três categorias principais: anticorpos monoclonais, vacinas e modificadores da resposta imune (KULCSAR, 1997).

Anticorpos monoclonais contra agentes específicos tumorais têm sido aprovados para, por exemplo, o tratamento do câncer de mama (trastuzumab), linfoma não-Hodgkin (rituximab), e no diagnóstico por imagem de diversos cânceres (oncoscint) (PLUNKETT e MILES, 2002). Vários estudos pré-clínicos foram realizados para avaliar diferentes estratégias de vacinas, utilizando células tumorais alogênicas, peptídeos, vetores virais, DNA e células dendríticas (DERMIME *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2002).

Os modificadores da resposta biológica são componentes capazes de interagir e regular o sistema imunológico através de aumento ou diminuição da resposta imune (LEUNG *et al.*, 2006; RIHOVA, 2002; TZIANABOS, 2000). Esses componentes são moléculas que podem ser de natureza extrínseca ou intrínseca. Os modificadores intrínsecos podem ser citocinas produzidas pelas células do sistema imune, por exemplo, interleucinas (IL), interferon (IFN), fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento para célula B e fatores

de crescimento hematopoéticos que podem influenciar a resposta imune em diferentes estágios. Os modificadores extrínsecos podem ser potencializadores da resposta imune como o *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), *Corynebacterium parvum*, endotoxinas, lipídeos, ácidos nucléicos e polissacarídeos (PS) que influenciam o crescimento tumoral através de uma imunestimulação não-específica (ADAM *et al.*, 2003; LEUNG *et al.*, 2006; BREMERS e PARMIANI, 2000).

1.2 Produtos naturais marinhos

O homem utiliza a natureza como fonte de medicamentos desde os tempos mais remotos. A imensa diversidade química de espécies de plantas, animais, microorganismos e fungos é resultado da evolução na seleção e conservação de importantes mecanismos de defesa utilizados, dentre outros, para repelir, paralisar ou matar predadores (CRAGG e NEWMAN, 1999; FAULKNER, 2000). Os produtos naturais são substâncias produzidas por organismos vivos, derivados do metabolismo primário ou secundário, e podem pertencer às mais diferentes classes de substâncias orgânicas. Os metabólitos secundários ou metabólitos especiais são de particular estima para o desenvolvimento de novos fármacos, ao passo que são também de fundamental importância adaptativa para um grupo de organismos e determinantes para o sucesso e aumento da biodiversidade dos ecossistemas (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

Os produtos naturais têm um papel de grande valor na descoberta de novas drogas. No caso particular do câncer isto é evidente, aproximadamente 60% das drogas em uso são de origem natural ou derivadas de um protótipo natural (NEWMAN *et al.*, 2003). De todas as fontes naturais de fármacos, o ambiente marinho é certamente a última grande fronteira a ser explorada. Evitado por muito tempo, devido às dificuldades de acesso às grandes profundidades e às limitações das técnicas químicas para o isolamento e elucidação estrutural, hoje este ecossistema foi reconhecido como uma fonte de produtos naturais com potencial terapêutico altamente rica e promissora (FENICAL, 1997; JIMENO *et al.*, 2004b).

O trabalho de Bergman e Feeney publicado no início da década de 50 que descreveu o isolamento dos nucleosídeos espongimidina e espongouridina e que serviu de inspiração para a síntese de moléculas como a citosina arabinosídeo [ara-C (Citarabine[®])], um quimioterápico anticâncer e a adenina arabinosídeo [ara-A (Vidarabine[®])] (Fig. 3) é tido

como o marco inicial da história da contribuição dos produtos naturais marinhos para geração de novos fármacos (BERGMANN e FEENEY, 1951; NEWMAN e CRAGG, 2006). As duas décadas seguintes foram marcadas pelo intenso trabalho de isolamento químico que culminou no isolamento de milhares de estruturas de compostos peculiares com ação sobre alvos inusitados. Porém, até 5 anos atrás, ainda não havia nenhum fármaco de origem marinha sendo comercializado, principalmente pelo fato da indústria farmacêutica ter dado preferência à síntese baseada na química combinatória (BLUNT *et al.*, 2008).

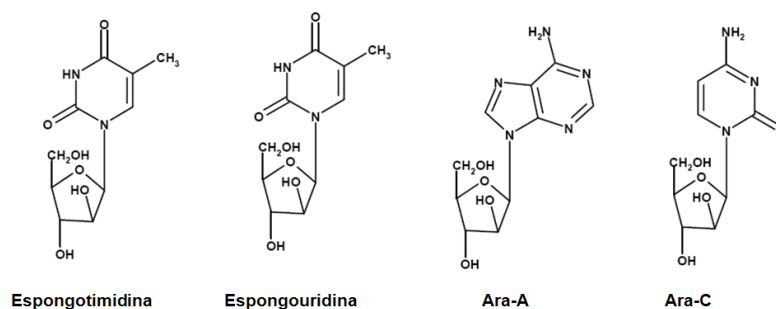


Figura 3 – Estruturas químicas dos nucleosídeos espongotimidina e espongouridina isolados por Bergmman e Feeney e dos derivados Ara-A e Ara-C utilizados na clínica.

Nesta década, os produtos naturais marinhos começaram a mudar o seu *status* de grande promessa, sobretudo no meio acadêmico, para se tornarem fármacos, e ainda se conta com uma lista razoável de candidatos em estudos clínicos, inclusive de fase III (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009; FENICAL, 2006). O primeiro deles, aprovado em 2004, foi o ziconotídeo ou ω -conotoxina (Prialt[®]), um peptídeo com poder analgésico isolado na década de 80 do molusco *Conus magnus* mil vezes mais potente que a morfina (Fig. 4). A agência norte-americana para controle e aprovação de medicamentos e alimentos, FDA (*Food and Drug Administration*) o liberou para administração intratecal na remediação da dor severa, inclusive àqueles pacientes refratários a tratamentos com opióides. O extraordinário poder analgésico das ω -conotoxinas se deve, principalmente, a particular sensibilidade das fibras tipo C e a ausência de tolerância ao tratamento mesmo em uso crônico com esses peptídeos (WILLIAMS *et al.*, 2008).

Em 2007, foi a vez do quimioterápico antineoplásico trabectedina (Ecteinascidina-743, ET-743, Yondelis[®]), produzido pela PharmaMar, ter sua aprovação pela agência européia de medicamentos (EMEA, do inglês *European Medicine Agency*) para a

comercialização pela União Européia para o tratamento de sarcoma de tecidos moles (Fig. 4) (EMEA, 2009). Atualmente, está sob ensaios clínicos de fase 3 para tratamento de câncer de ovário e de fase 2 para câncer de próstata e mama, osteossarcoma e tumores sólidos pediátricos (CLINICALTRIALS, 2009).

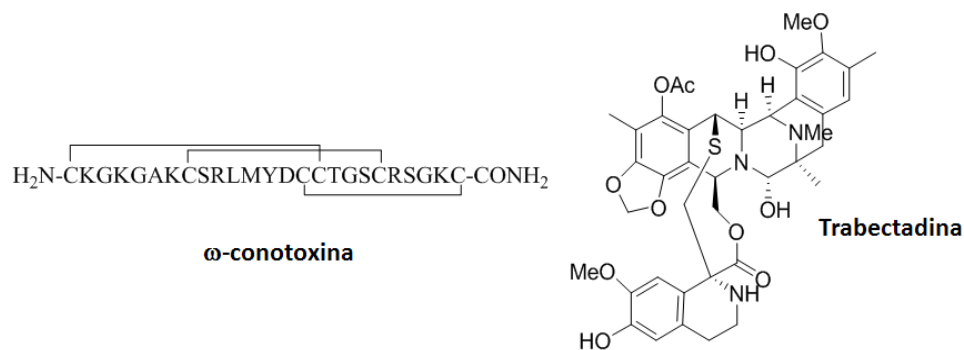


Figura 4 – Primeiros compostos de origem marinha a serem aprovados para uso clínico, ω -conotoxina e trabectadina.

A trabectadina é um alcalóide tetra-hidroquinolínico isolado da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinata* que age alquilando o DNA, mas de modo diferente dos outros agentes alquilantes. Ela se liga à guanina em sequências específicas de bases nas fendas menores da dupla hélice induzindo uma dobra nas fitas de DNA que tem diversas consequências como desorganização do citoesqueleto e bloqueio da divisão celular (ZEWAIL-FOOTE *et al.*, 2001; ERBA *et al.*, 2001). Outra consequência de grande importância é a interferência no reconhecimento e ligação normal de fatores de transcrição ou proteínas ligantes do DNA incluindo a MDR1 ou glicoproteína-P, proteína de resistência a múltiplas drogas (do inglês, *Multi Drug Resistance*) a qual bombeia diversos quimioterápicos e pode estar superexpressa nas células tumorais. Portanto o tratamento com trabectadina pode prevenir a resistência a quimioterápicos das células tumorais pela inibição da glicoproteína-P (JIN *et al.*, 2000; KANZAKI *et al.*, 2002).

A severa toxicidade da trabectadina tornou complicados os primeiros ensaios clínicos devido à alta toxicidade como neutropenia, transaminite e rabdomiólise e algumas mortes. Após vários estudos realizados para o entendimento das reações relacionadas à toxicidade e ajuste de doses, o perfil toxicológico melhorou substancialmente restando apenas uma mielotoxicidade residual nas doses terapêuticas (PUCHALSKI *et al.*, 2002). A

Ecteinascidia turbinata foi cultivada com sucesso, mas os testes clínicos foram realizados por um eficiente método de síntese patenteado pela Universidade de Harvard e licenciado para a PharmaMar. Atualmente, a sua produção é realizada em 4 etapas a partir da cianosafracina B, proveniente da cultura da bactéria *Pseudomonas fluorescens* (MARTINEZ e COREY, 2000).

Os protótipos derivados ou isolados de produtos naturais marinhos em fase de testes clínicos possuem diversos alvos terapêuticos como canais iônicos, enzimas, microtúbulos, DNA, lisossomos, calmodulina, proteossomos, além de indução de estresse oxidativo e modulação do sistema imunológico (NEWMAN e CRAGG, 2006). A identificação de novos alvos de ação tem sido de grande relevância para o tratamento do câncer, e é exatamente no estudo e na terapêutica dessa doença aonde se concebe também o maior impacto das substâncias de origem marinha (NEWMAN e CRAGG, 2006; HAEFNER, 2003).

A quantidade de moléculas novas oriundas de organismos marinhos ultrapassa 18.500,00 e já se contam pelo menos 300 patentes (HUNT e VINCENT, 2006; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009). Dentre essa enorme quantidade, algumas substâncias em particular como as didemninas, halicondrinas, dolastatinas, briostatinas, discodermolido, espisulosina, neovast e a salinosporamida A são exemplos históricos importantes ou que estão em voga por serem candidatos da indústria farmacêutica, por terem exibido promissor desempenho em estudos clínicos ou mesmo por representarem novas alternativas terapêuticas (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009; MOLINSKI *et al.*, 2009).

A dideminina B, um depsipeptídeo cíclico isolado da ascídia caribenha *Trididemnum solidum*, foi a primeira substância natural marinha a entrar em estudos clínicos, nesse caso, como substância anticâncer. Esta substância demonstrou potente atividade antiviral, imunossupressora e anticâncer, com valores de concentração inibitória média de 1nM, e com uma surpreendente atividade antitumoral contra leucemias e melanomas (RINEHART *et al.*, 1981). O mecanismo de ação da dideminina B é muito complexo e ainda está por ser completamente esclarecido. Apesar dos vários esquemas de tratamento testados e dos diversos tumores experimentados, a dideminina B desapontou no quesito eficácia e apresentou alta toxicidade para prosseguir com os ensaios clínicos. Alguns autores argumentam que a logística envolvida no ajuste de doses e nos esquemas de administração utilizados não teria sido otimizada para favorecer a atividade antitumoral e adequava-se melhor aos protocolos de estudo de agentes imunomoduladores (VERA e JOULLIE, 2002).

Independente disso, a dideminina B foi retirada dos testes clínicos, mas deixou uma valiosa contribuição para a formação de químicos e farmacologistas básicos e clínicos da área de produtos naturais marinhos.

O legado da dideminina B teve repercussão direta nos estudos com a aplidina A, um depsipeptídeo cíclico isolado da ascídia mediterrânea *Aplidium albicans* parecido com a dideminina B e também conhecida por dehidrodideminina B (RINEHART, 2000). A aplidina A foi a mais ativa em um estudo relacionando estrutura e atividade antiviral e citotóxica de uma série de 42 didemininas análogas naturais ou sintéticas, entre as quais a própria dideminina B (SAKAI *et al.*, 1996). Em modelos *in vivo*, a aplidina reduziu radicalmente o volume de diversos tumores, inclusive daqueles resistentes à dideminina B, e demonstrando menos toxicidade associada ao uso (SIMMONS *et al.*, 2005). Seu mecanismo de ação é bastante peculiar e envolve várias vias que levam à apoptose, mas ainda não está completamente esclarecido (URDIALES *et al.*, 1996).

A aplidina foi então licenciada para a PharmaMar com o nome Aplidin[®] e começaram os testes clínicos em 1999, se beneficiando diretamente das informações obtidas nos estudos com dideminina B. De modo geral, o tratamento com aplidina tem sido bem tolerado, a toxicidade neuro-muscular, seu principal fator limitante, pode ser superada com a co-administração de *L*-carnitina (JIMENO *et al.*, 2004a). Outra característica importante é que o tratamento com aplidina não causa reações tipicamente associadas à quimioterapia do câncer, como mucosite, alopecia e mielossupressão. Essa molécula já se encontra em fase 2 para uma diversidade de tumores sólidos e hematológicos como terapia única e em fase 1 para terapia com outros quimioterápicos e para o tratamento de leucemias pediátricas agudas (CLINICALTRIALS, 2009; GOMEZ *et al.*, 2003).

As dolastatinas naturais e seus derivados são outra classe de peptídeos importantes. Eles foram encontrados em pequenas quantidades no molusco *Dolabella auricularia* e que agem em concentrações da ordem de picoMolar em vários tipos de células tumorais (PETTIT *et al.*, 1987; PETTIT *et al.*, 1989). As dolastatinas agem ligando-se à tubulina no sítio dos alcalóides da *Vinca*, mas em um domínio diferente, o que despertou o entusiasmo para início dos estudos clínicos (BAI *et al.*, 1990). Com a síntese da dolastatina 10, a mais potente da série, tornou-se possível o ingresso desta molécula nos estudos clínicos de fases 1 e 2 pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (NCI-USA, do inglês, *National Cancer Institute of United States of America*). Embora a toxicidade tenha

sido tolerada nas doses administradas na maioria dos casos, os estudos clínicos, já em fase 2, acabaram pela ausência de resultados significativos (KINDLER *et al.*, 2005). Um estudo estrutura-atividade gerou uma série de análogos com o objetivo de manter ou melhorar a citotoxicidade e reduzir a toxicidade. Atualmente, 3 derivados sintéticos das dolastatinas, soblidotina, cematodina e sintadotina, estão em estudos clínicos para vários tipos de tumores.

Apesar de relativamente bem toleradas a soblidotina e a cematodina não têm demonstrado boa eficácia antitumoral. A sintadotina já é uma dolastatina de 3^a geração que age estabilizando microtúbulos, porém com um mecanismo singular, distinto das outras dolastatinas ou mesmo dos taxanos. A sintadotina apresenta grandes vantagens como a ser ativa por via oral e possuir uma janela terapêutica maior que a da cematodina. Outro resultado animador foi a atividade em modelos xenográficos com tumores resistentes a terapia com taxanos visto que, não raro, pacientes com melanoma desenvolvem resistência à esta quimioterapia (DE JONGE *et al.*, 2005; RIELY *et al.*, 2007; BHAKUNI e RAWAT, 2006; EBBINGHAUS *et al.*, 2004).

No ano 2000, a ILEX comprou os direitos da BASF Pharma sobre a sintadotina (ou ILX-651), o que gerou a expectativa de aceleração dos estudos clínicos devido ao domínio desta indústria no desenvolvimento de quimioterápicos anticâncer. Ainda em fase 1, a sintadotina demonstrou boas respostas, inclusive havendo a cura de um paciente com melanoma metastático. Estes resultados foram bastante animadores porque existem poucas opções para o tratamento de melanoma metastático. Além do melanoma, também foram tratados, e com bons resultados, tumores sólidos recorrentes e câncer de não pequenas células ainda em fase 1 (BNET, 2008). A sintadotina foi considerada segura e bem tolerada, sendo relatados apenas efeitos colaterais de pequena importância como alopecia, náuseas, vômitos e fadiga (EBBINGHAUS *et al.*, 2004).

A briostatina 1 também tem uma grande importância na história dos produtos naturais marinhos e é uma das duas substâncias em fase de testes clínicos que são obtidas diretamente do organismo no seu ambiente natural (briostatina 1 e o Æ-941). A briostatina 1, uma lactona macrocíclica, é considerada a molécula mais promissora da sua família tendo sido isolada do briozoário *Bugula neritina* por Pettit e colaboradores em 1970 (PETTIT *et al.*, 1970). Devido à sua complexidade, a estrutura química só foi esclarecida uma década depois do seu descobrimento (PETTIT *et al.*, 1982c). Entre as diferentes atividades observadas, destacam-se a regulação da apoptose, o sinergismo com outros quimioterápicos anticancer e a

estimulação do sistema imunológico (FARROW *et al.*, 2002; DOWLATI *et al.*, 2003; AL-KATIB *et al.*, 1998). Atualmente, o maior interesse com a briostatina 1 é na quimioterapia anticancer e já somam mais de 80 ensaios clínicos de fase 1 ou 2 realizados ou em andamento (PETTIT *et al.*, 2002).

O discodermolido, isolado da esponja *Discodermia dissoluta*, é o agente estabilizante de microtúbulos mais potente já descrito, devendo seus efeitos a uma parada do ciclo celular seguida de morte por apoptose. Embora o paclitaxel e o discodermolido compartilhem do mesmo mecanismo de ação, o composto marinho é eficiente contra linhagens taxano resistentes, tanto *in vitro* como *in vivo* (TER HAAR *et al.*, 1996).

A episulosina, inicialmente isolada do molusco *Mactromeris* ou *Spisula polynyma* no ano de 1999, está sendo produzida através de síntese e encontra-se em fase 1 de ensaios clínicos em pacientes com tumores sólidos sob licença da PharmaMar (MARINEBIOTECH, 2009; PHARMAMAR, 2008). A sua estrutura se parece muito com a dos esfingolipídeos. As células tratadas com episulosina perdem a organização dos microfilamentos de actina e entram em apoptose por vias diferentes daquelas induzidas pelos esfingolipídeos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2004; CUADROS *et al.*, 2000).

Outro candidato a medicamento, e que vem sendo obtido pela maricultura, é o agente antiangiogênico Neovastat® (ou Æ-941), desenvolvido pela indústria canadense Æterna Zentaris. Na verdade não se trata de uma substância isolada, mas sim um extrato líquido padronizado da fração < 500 kDa da cartilagem do tubarão *Squalus acanthias* (GINGRAS *et al.*, 2003). O Æ-941 já completou estudos de fase 3 para o tratamento de carcinoma renal metastático e para carcinoma pulmonar de não-pequenas células em combinação com outros quimioterápicos ou com radioterapia. Um empecilho a sua comercialização em escala mundial é que esse extrato é produzido exclusivamente a partir de tubarões criados em cativeiro e não se reconhece qualquer outra possibilidade de obtenção do material, e a exploração a longo prazo de espécies de tubarão cujas populações naturais já estão ameaçadas pode ser ecologicamente desastroso (GINGRAS *et al.*, 2003).

O vislumbre da obtenção de moléculas marinhas, frequentemente tão complexas e difíceis de sintetizar, de fontes naturais e sem causar impactos vem sendo concretizado com o exemplo da salinosporamida A. Esse composto é obtido de microorganismos marinhos e é um marco no quesito quantidades suficientes para ensaios clínicos sem impacto ambiental. O actinomiceto marinho *Salinospora tropica*, encontrado no sedimento das Bahamas está hoje

no *pipeline* da Nereus Pharmaceuticals Inc, uma companhia criada para prospecção de fármacos a partir de produtos marinhos (FENICAL *et al.*, 2009). O mecanismo de ação da salinosporamida A consiste em uma potente e seletiva inibição da função catalítica dos proteossomos, estruturas celulares responsáveis pela degradação de proteínas (FELING *et al.*, 2003). Os proteossomos foram legitimados como alvo para a quimioterapia do câncer com a aprovação da bortezomida (Velcade®) para o tratamento de mieloma múltiplo (RICHARDSON *et al.*, 2003). Atualmente, a salinosporamida está em alguns ensaios simultâneos de fase I, mas ela traz o trunfo de ter passado pelos testes pré-clínicos mais rapidamente, tendo entrado em estudo clínicos após somente 3 anos da sua descoberta (CLINICALTRIALS, 2009).

Os cnidários juntamente com esponjas, ascícias, moluscos e algas compõem o grupo de representantes marinhos quimicamente mais prolíficos. A maioria deles possui em características como hábito sésil, corpo macio e ausência de estruturas físicas de defesa (Fig. 5) (HUNT e VINCENT, 2006; HARPER, 2001). A citotoxicidade é a atividade biológica mais comumente encontrada e normalmente se apresenta com grande potência, o que é condizente com a função ecológica proposta para esses compostos de favorecer a competição por espaço, eliminar micro-organismos patogênicos e paralisar ou matar predadores superando os efeitos diluidores do ambiente aquático (MUNRO *et al.*, 1999).

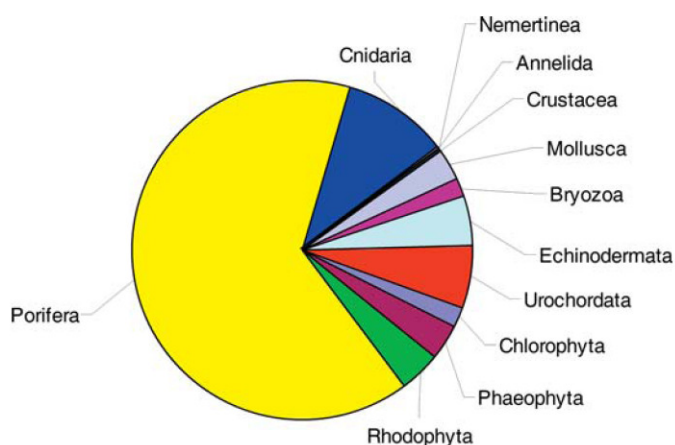


Figura 5 – Quantidade relativa de compostos marinhos agrupados por filo. Extraído de Hunt e Vicent, 2006.

Estudos com substâncias bioativas de cnidários mostraram diferentes atividades biológicas como anti-inflamatória, analgésica e citotóxica. A palitoxina (PTX), isolada do zoantídeo *Palythoa toxica* por Richard E. Moore e Paul J. Scheuer, é a toxina não-protéica de origem animal mais potente que se conhece (Fig. 6) (MOORE e SCHEUER, 1971). Trata-se de uma molécula grande em tamanho e complexidade estrutural, ela é o segundo maior produto natural excluindo-se aqueles que contem unidades repetidas de aminoácidos ou monossacarídeos e possui 64 carbonos quirais (KAN *et al.*, 2001). Já foi demonstrado que outras espécies do gênero *Palythoa*, como *P. tuberculosa* e *P. mammilosa*, também possuem PTX (OKU *et al.*, 2004; ISHIDA *et al.*, 1983).

Os diterpenos fuscoidina A e pseudopterosinas, isolados dos corais *Eunicea fusca* e a *Pseudopteroergorgia elisabethae* respectivamente, apresentaram potente atividade antiinflamatória (CARTÉ, 1996; KIJJOA e SAWANGWONG, 2004). As pseudopterosinas também apresentam atividades tópicas antialérgica e analgésica inibindo a 5-lipoxigenase e, especificamente, a fosfolipase A2 de leucócitos polimorfonucleares (Fig. 6). A pequena indústria farmacêutica OsteoArthritis Sciences licenciou o uso das pseudopterosinas para o uso como antiinflamatório e teve aprovação para tal finalidade pelo FDA. Essas moléculas também são o princípio ativo do creme facial Resilience® da Estée Lauder, indicada para prevenir a irritação causada pela exposição ao sol (KIJJOA e SAWANGWONG, 2004).

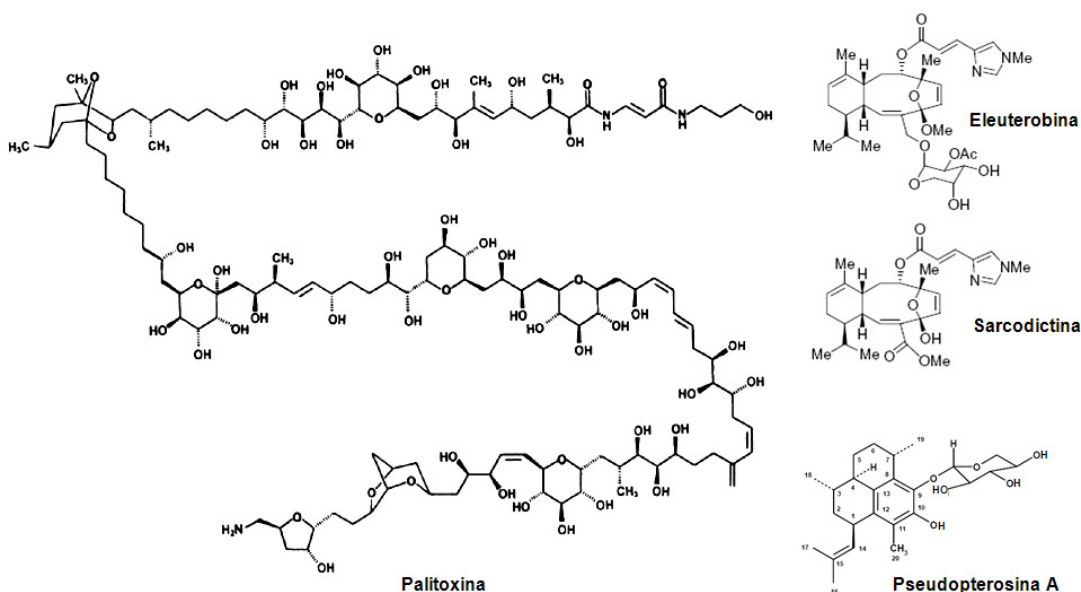


Figura 6 – Estruturas de compostos isolados de cnidários com diferentes atividades biológicas.

Han e colaboradores isolaram uma prostaglandina do zoantídeo *Palythoa kochii* que demonstrou perfil de atividade semelhante ao paclitaxel em modelo de neurite degenerativa e estabilização de microtúbulos, porém com potência inferior a este último (HAN *et al.*, 2006). Os compostos citotóxicos eleuterobina e a sarcodictina, obtidos inicialmente dos corais moles *Eleuterobia* sp. e *Bellonella albiflora* respectivamente, agem como agentes estabilizantes de microtúbulos semelhantemente ao paclitaxel e entraram para estudos clínicos como agentes alternativos a terapia de tumores resistentes ao paclitaxel (Fig. 6) (LONG *et al.*, 1998; NICOLAOU *et al.*, 2009).

Os primeiros relatos de compostos citotóxicos de animais marinhos da costa brasileira foram, aparentemente, de cnidários. Em 1986, Freitas & Sawaya demonstraram que a purina caissarona isolada da anêmona brasileira *Bunodosoma caissarum* inibiu a elevação da membrana de fecundação, levando à polispermia de ovos de ouriço do mar (DE FREITAS e SAWAYA, 1986). Alguns anos depois, Malpezzi & Freitas demonstraram a presença de atividade antimitótica relacionada a outros compostos do extrato da anêmona *B. caissarum* (MALPEZZI e FREITAS, 1990).

Com relação às macromoléculas de organismos marinhos, tem sido demonstrado que PS de algas e invertebrados possuem diversas atividades relacionadas a estimulação do sistema imune como antiviral, antiparasitária e antitumoral. Alguns PS sulfatados isolados de algas vermelhas como *Aghardhiella tenera* e *Nothogenia fastigiata* (DAMONTE *et al.*, 1994; KOLENDER *et al.*, 1995) apresentaram atividade contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*), o vírus da herpes simples (HSV, do inglês, *Herpes Simplex Virus*) tipo 1 e 2, bem como o vírus sincicial respiratório. A carragenina isolada da alga vermelha *Gigarina skottsbergii* demonstrou seu efeito antiviral *in vitro* bloqueando o HIV e outros vírus sexualmente transmissíveis, repercutindo até em um estudo clínico de fase III (ZEITLIN *et al.*, 1997; SPIELER, 2002).

Sasaki e colaboradores publicaram um trabalho de prospecção da atividade antitumoral em camundongos transplantados com Sarcoma 180 com macromoléculas de 25 espécies de animais marinhos. Neste trabalho foi demonstrado que moluscos, ascídias, cirripédios e equinodermos possuem substâncias antitumorais. (SASAKI *et al.*, 1985).

PS biologicamente ativos também têm sido obtidos de invertebrados marinhos brasileiros como equinodermos e ascídias. Em 1991, Paulo Mourão e seu grupo publicaram o isolamento do FucCS, um polissacarídeo com esqueleto parecido ao da condroitina sulfato

$[4-\beta\text{-D-GlcA-133-}\beta\text{-D-GalNAc-1}]_n$, mas com uma substituição na posição 3 dos resíduos do ácido $\beta\text{-D-glucurônico}$ com cadeias laterais $\alpha\text{-L-fucopiranosil}$ sulfatadas do pepino-do-mar *Ludwigothurea grisea* (MOURÃO *et al.*, 1996). O FucCS apresentou diferentes atividades, como anti-trombótica (MOURÃO *et al.*, 1998; MOURÃO *et al.*, 1996), pró-angiogênica (TAPON-BRETAUDIÈRE *et al.*, 2002) e inibição das moléculas de adesão P-selectina e L-selectina (BORSIG *et al.*, 2007), em todos os casos, relacionadas à presença dos grupos $\beta\text{-L-fucopiranosil}$ sulfatados. Os últimos achados também correlacionaram os efeitos angiogênico com o potencial cicatrizante e inibição de selectinas com os efeitos anti-metastático e antiinflamatório (BORSIG, 2007; TAPON-BRETAUDIÈRE *et al.*, 2002).

1.3 Potencial anticâncer de organismos marinhos do litoral cearense

O Brasil possui um litoral contínuo de aproximadamente 8.500 km de extensão com uma grande biodiversidade ainda pouco explorada (Fig. 7). Grande parte dos organismos detentores de substâncias bioativas interessantes habita as regiões tropicais e a região nordeste compreende a maior parte do litoral tropical brasileiro. O estado do Ceará, por sua vez, possui uma zona costeira com 573 km de extensão e conta com poucos trabalhos explorando o potencial farmacológico de suas espécies (JIMENEZ *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2007).

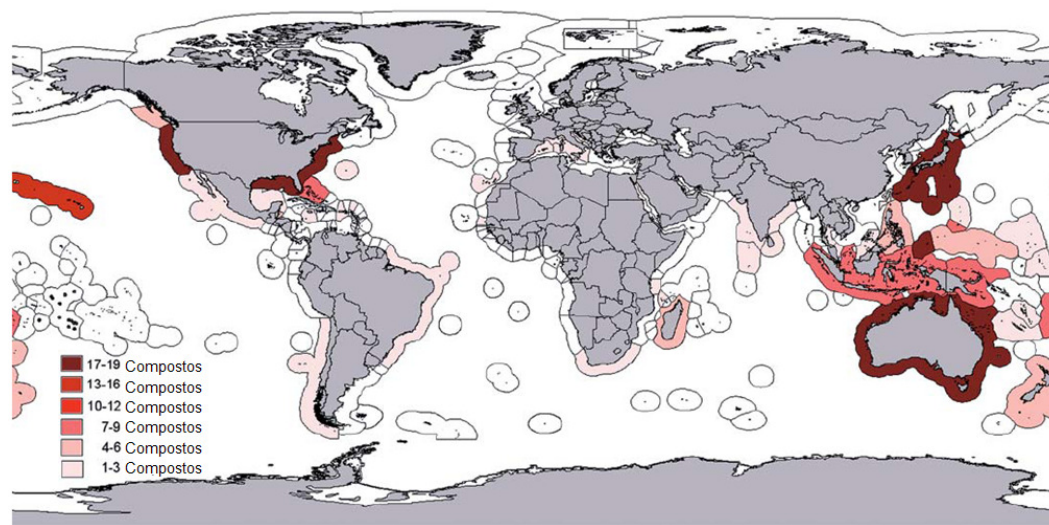


Figura 7 – Distribuição relativa da quantidade de novos compostos marinhos descobertos no mundo. As coleções marinhas estão concentradas apenas nos países que possuem arrecifes e/ou programas ativos de pesquisa em produtos naturais. Modificado de Hunt & Vicent, 2006.

Os estudos de prospecção de substâncias com potencial antitumoral de organismos marinhos habitantes da costa cearense vêm sendo conduzidos com pioneirismo por um grupo coordenado por Costa-Lotufo. O primeiro deles, publicado em 2003, consistiu na análise da atividade citotóxica do extrato bruto das espécies de ascídias mais abundantes do litoral cearense. Dentre as 10 espécies estudadas, 6 eram novas. Os resultados apontaram que os extratos das espécies *Eudistoma vannamei*, *Euherdmania* sp., *Didemnum psammatodes*, *Didemnum ligulum*, *Polysyncraton* sp. e de uma espécie ainda não descrita da família Holozoidae (gênero desconhecido) apresentaram resultados promissores (JIMENEZ *et al.*, 2003).

Posteriormente foram realizados fracionamentos químicos guiados pela atividade citotóxica com as espécies *E. vannamei* e *D. psammatodes*. Foi demonstrado que a citotoxicidade da fração mais purificada de *E. vannamei* estava relacionada com a indução de apoptose (JIMENEZ *et al.*, 2008). Também foram isoladas 14 substâncias da *D. psammatodes* das quais se demonstrou a indução tanto de apoptose quanto necrose e inibição da síntese de DNA (TAKEARA *et al.*, 2008).

Com esponjas, em 2004, foi publicada a avaliação das atividades citotóxica, hemolítica, antimitótica e antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de 8 espécies coletadas na praia de Flexeiras, município de Trairi. Esse estudo revelou que 7 das 8 espécies estudadas apresentaram bioatividade em algum ensaio, tendo a *Amphimedon* sp. apresentado maior potência (JIMENEZ *et al.*, 2004). Em outro estudo foi avaliado o potencial citotóxico de 22 espécies de esponjas encontradas no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio (Ceará) das quais 3 (*Geodia corticostylifera*, *Monanchora arbuscula* e *Amphimedon compressa*) apresentaram alta potência nos ensaios realizados (FERREIRA *et al.*, 2007).

Um estudo realizado com cnidários por Lima (2004) demonstrou uma potente atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células tumorais dos extratos hidroalcoólicos brutos dos zoantídeos dos gêneros *Protopalythoa* e *Palythoa* coletados na praia de Paracuru (LIMA, 2004).

Além de invertebrados marinhos, o potencial antitumoral de algas também foi investigado. Em 2007, De Sousa e colaboradores mostraram o efeito antitumoral por via oral de alginatos obtidos da alga parda *Sargassum vulgare* em sarcoma-180 transplantados em camundongos. Adicionalmente, foi observado um aumento do tamanho do baço, o que sugere propriedades imunomodulatórias desses alginatos (DE SOUSA *et al.*, 2007). PS sulfatados da

alga vermelha *Champia feldimani* também apresentaram atividade antitumoral *in vivo* em camundongos, sem citotoxicidade direta em células tumorais *in vitro*. Foi demonstrada ainda, a relação dos efeitos observados com estimulação do sistema imune e aumento da eficácia do quimioterápico 5-fluorouracil quando administrado concomitantemente com os PS (LINS *et al.*, 2009).

É importante ressaltar que estudos dessa natureza são considerados estratégicos pela sua contribuição na descoberta de substâncias bioativas promissoras para utilização terapêutica de doenças e por envolver o conhecimento da biodiversidade local pouco estudada em um sentido mais amplo.

1.4 *Protopalythoa variabilis*

Os zoantídeos são animais marinhos - filo Cnidaria ou Coelenterata, classe Anthozoa e ordem Zoanthidae - em grande parte tropicais, sendo alguns habitantes comuns de recifes (RUPPERT e BARNES, 1996). A espécie *Protopalythoa variabilis* Duerden, 1898 (Fig. 8), estudada neste trabalho, possui pólipos separados, apenas conectados por um fino cenênquima basal, colunas dos pólipos extensas (até 3,0 cm), coloração da coluna marrom-clara e do disco oral marrom-escuro ou esverdeado (DUERDEN, 1902).

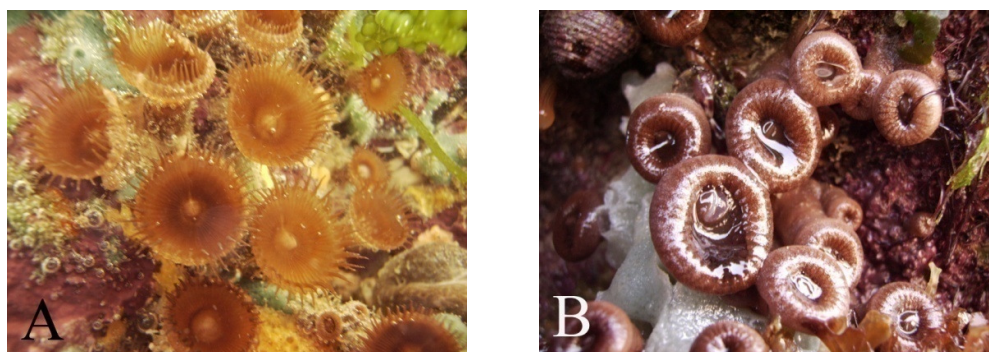


Figura 8 – Fotografias de colônias do zoantídeo *Protopalythoa variabilis* encontrados na costa cearense. A, colônia submersa com pólipos abertos e B, colônia exposta ao ar com pólipos fechados durante a maré baixa. Por Diego V. Wilke.

Como mostrado na figura 9, esse zoantídeo já foi encontrado em locais tão distintos como o mar do Caribe, grande barreira coralina da Austrália e na costa brasileira (DUERDEN, 1902; VARELA *et al.*, 2002; RYLAND e LANCASTER, 2003; BOSCOLO e

SILVEIRA, 2005; DEBEUS e CRISPIM, 2008). Contudo, além dos estudos de taxonomia, o único estudo com *P. variabilis* realizado antes do presente trabalho, abordou aspectos da biologia reprodutiva de exemplares encontrados na região sudeste, no estado de São Paulo (BOSCOLO e SILVEIRA, 2005).

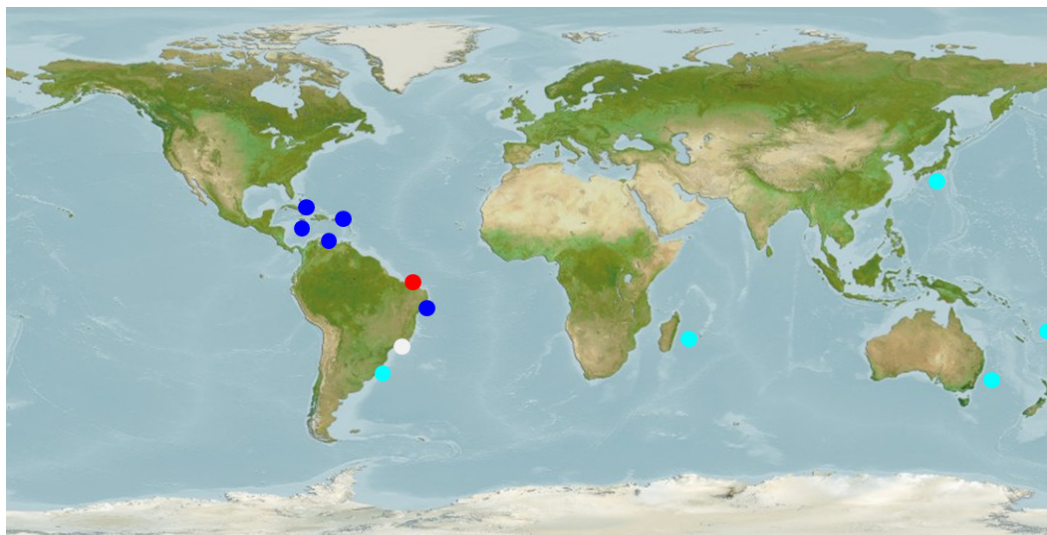


Figura 9 – Locais onde foram realizados estudos e/ou registros taxonômicos de *Protopalychia variabilis*. Pontos: azul-escuro, registros taxonômicos; azul-claro, indicação de achado, mas não registrado oficialmente; branco, estudo sobre a biologia reprodutiva; vermelho, estudo sobre o potencial antitumoral. Mapa obtido da homepage: <http://www.obis.org.au>. Fontes: Duerden, 1902; Varela, et al., 2002; Ryland & Lancaster, 2003; Boscolo & Silveira, 2005; Debeus & Crispim, 2008.

Tendo em vista a ausência de estudos farmacológicos com essa espécie e evidências da presença de substâncias citotóxicas (LIMA, 2004), o presente trabalho propôs uma investigação mais aprofundada do potencial farmacológico, com ênfase na atividade antitumoral, de compostos presentes no zoantídeo *Protopalychia variabilis* encontrado no litoral cearense. Para facilitar a compreensão e a discussão dos resultados, o texto foi dividido em dois capítulos, o primeiro abordando o estudo dos metabólitos secundários presentes no extrato orgânico incluindo purificação, caracterização química e estudo da atividade citotóxica e o segundo abordando o estudo anticâncer e imunomodulador de macromoléculas não citotóxicas obtidas a partir de extração aquosa do resíduo filtrado do extrato orgânico.

2 CAPÍTULO I

ESTUDO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS OBTIDOS DO ZOANTÍDEO *Protopalythoa variabilis*

2.1 Introdução

Os cnidários produzem compostos bioativos com uma grande variedade de efeitos como citotóxico (PETTIT *et al.*, 1982a; PETTIT *et al.*, 1982b), antiinflamatório (CARTÉ, 1996), antioxidante (DUNLAP e YAMAMOTO, 1995), supressor da osteoporose (KURAMOTO *et al.*, 2000) e anticolinesterásica (SEPCIC *et al.*, 1998). Novos esteróides e alcalóides, alguns com potente atividade biológica foram isolados de espécies da família Zoanthidae (SUKSAMRARN *et al.*, 2002; BEHENNA *et al.*, 2008; VILLAR *et al.*, 2003). Duas séries de peptídeos citotóxicos, as palistatinas 1-3 e A-D, foram isoladas do zoantídeo *Palythoa liscia*, encontrado no oceano Índico, através de fracionamentos guiados pela atividade citotóxica de extratos alcoólicos brutos contra a linhagem de células leucêmica murina P388 em 1982 por Pettit e colaboradores (PETTIT *et al.*, 1982a; PETTIT *et al.*, 1982b).

As zoantaminas pertencem a uma nova classe de alcalóides citotóxicos de potência variada, obtidas de zoantídeos do gênero *Zoanthus*. O grupo do Dr. Dasuke Uemura demonstrou o potencial antiosteoporose da norzoantamina, uma zoantamina com baixa citotoxicidade (Fig. 10). Os efeitos encontrados na modelagem e peso dos ossos de camundongos fêmeas ovariectomizadas foram semelhantes aos do tratamento com β -estradiol, porém sem aumentar o peso uterino como faz este último, sugerindo que a norzoantamina deve exercer seu efeitos supressores da osteoporose por um mecanismo diferente dos hormônios femininos (KURAMOTO *et al.*, 2000).

As parazoantoxantinas e pseudoparazoantoxantinas são pigmentos naturais da classe dos tetra-azaciclopentazulenos comumente encontrados em zoantídeos dos gêneros *Parazoanthus*, *Epizoanthus*, *Zoanthus* e *Palythoa* (TURK *et al.*, 1995). A partir de um fracionamento químico do extrato etanólico do zoantídeo mediterrâneo *Parazoanthus axinellae* foi isolada uma variante da pseudoparazoantoxantina (Fig. 10) com potente atividade anticolinesterásica *in vitro*. Essa molécula apresentou constante de inibição de 4 μ M e perfil de inibidor competitivo, tendo sua atividade neutralizada pela pré-incubação com atropina (TURK *et al.*, 1995). Em outros estudos foram demonstradas a atividade anticolinesterásica como inibidor competitivo da parazoantoxantina A, a capacidade de intercalação ao DNA e inibição de DNA polimerase (SEPCIC *et al.*, 1998; PASIC *et al.*, 2001).

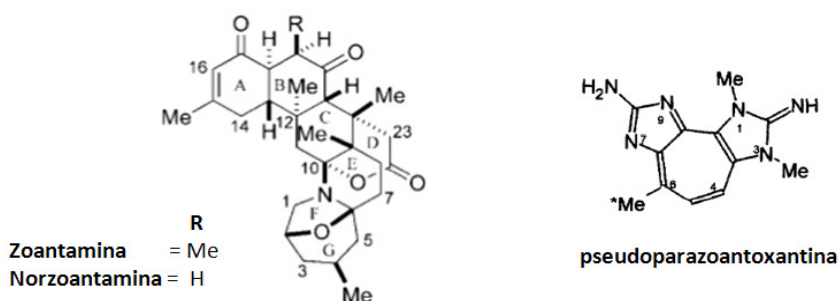


Figura 10 – Estrutura química de zoantaminas e da pseudozoantoxantina.

A PTX, já citada anteriormente (Fig. 6), encontrada em zoantídeos, sobretudo do gênero *Palythoa*, age ligando-se à bomba de Na^+/K^+ ATPase e transformando-a em um canal catiônico monovalente. Devido a esse mecanismo a PTX causa lise em hemácias após um período de latência de até 2 horas e provoca alterações em células excitáveis (FRELIN e VAN RENTERGHEM, 1995; TOSTESON *et al.*, 1991; HABERMANN *et al.*, 1981). A PTX tem sido bastante útil como ferramenta farmacológica em estudos onde envolvem o K^+ como segundo mensageiro (JHA e ZI-RONG, 2004).L

O potencial farmacológico dos zoantídeos, apesar de evidente, ainda não foi demonstrado satisfatoriamente nas espécies encontradas na costa cearense. O presente trabalho faz parte de um projeto mais ambicioso de prospecção de compostos com potencial anticâncer a partir de organismos marinhos encontrados no litoral do Ceará (Brasil) do Laboratório de Oncologia Experimental (FERREIRA *et al.*, 2007; JIMENEZ *et al.*, 2003; JIMENEZ *et al.*, 2004; JIMENEZ *et al.*, 2008; TAKEARA *et al.*, 2008; DE SOUSA *et al.*, 2007; LINS *et al.*, 2009). A escolha do zoantídeo *Protopalythoa variabilis*, um cnidário abundante na nossa costa e encontrado em diferentes partes do mundo, foi motivada por um trabalho preliminar que demonstrou potente atividade citotóxica em extratos alcoólicos de zoantídeos dos gêneros *Protopalythoa* e *Palythoa* da costa cearense (LIMA, 2004). Neste capítulo, foram descritos a purificação do extrato hidroalcoólico através de fracionamento químico guiado pela atividade citotóxica e os estudos da citotoxicidade dos compostos obtidos.

2.2 Objetivos

2.2.1 Geral

Realizar a busca de novas moléculas com potencial atividade anticâncer a partir do extrato hidroalcoólico do zoantídeo *Protopalythoa variabilis*.

2.2.2 Específicos

- Verificar a ocorrência de atividade citotóxica no extrato de colônias do zoantídeo *Protopalythoa variabilis* coletado no litoral do Estado do Ceará, na praia de Paracuru (Paracuru);

- Realizar fracionamento e purificação dos extratos brutos, biomonitorando a atividade antiproliferativa das frações obtidas em células tumorais *in vitro*;

- Caracterizar o perfil químico das frações ativas com ênfase ao isolamento e caracterização de metabólitos secundários com atividade biológica;

- Estudar a atividade citotóxica das frações mais purificadas e compostos isolados.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Materiais Utilizados

A especificação dos equipamentos, dos softwares de aquisição e análise dos dados, bem como o fabricante dos reagentes utilizados estão detalhadas junto à descrição dos métodos.

2.3.2 Coleta e identificação do zoantídeo *Protopalythoa variabilis*

Os exemplares da espécie *P. variabilis* (Fig. 8) foram coletados manualmente durante a maré baixa na praia de Paracuru, município de Paracuru (Fig. 11). O material foi inicialmente lavado em água do mar para redução da contaminação e as colônias foram ensacadas e em seguida transportadas, sob resfriamento em gelo, para o Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará para preparação do extrato. Parte do material coletado foi imerso em etanol 70% e enviado juntamente a fotografias do animal tiradas no local da coleta para o Departamento de Zoologia da Universidade de São Paulo para identificação pelo Dr. Antônio Carlos Marques. O *voucher* dos espécimes (nº 000975) encontra-se depositado no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MUZUSP).

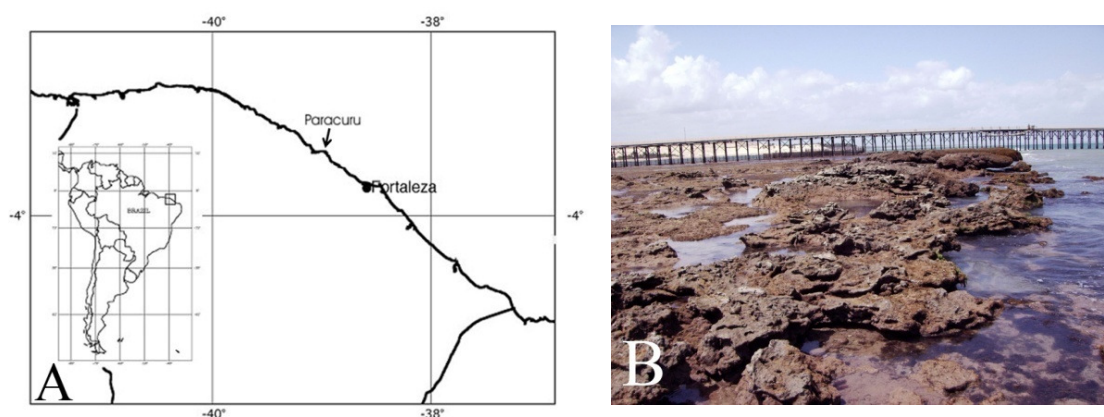


Figura 11 – Local de coleta. A, mapa indicando a posição do ponto de coleta, a praia de Paracuru no município de Paracuru relativa à capital, Fortaleza e B, fotografia do local de coleta durante a maré baixa. Por Diego V. Wilke.

2.3.3 Extração e partições

Inicialmente foi realizada a remoção manual do excesso de contaminantes, principalmente pequenas pedras e algas, seguida da trituração em pequenos volumes de metanol (MeOH) dos animais. O material foi pesado (11,3 kg), triturado e imerso em MeOH para extração (2 x 5 L) por 48 horas a 10°C. Após filtração em tecido de malha fina o extrato MeOH foi concentrado em evaporador rotativo (Buchi, Rotavapor® RII) a pressão reduzida (45°C) para aproximadamente 400 mL de uma suspensão aquosa denominada EHB, a qual foi adicionado um volume semelhante de MeOH e particionada (4 x 100 mL) com hexano (Hex) seguido de diclorometano (DCM) e por último acetato de etila (AcOEt). Após a evaporação do solvente obteve-se 1,6 g da fração Hex, 178,2 mg da fração DCM, 778 mg da fração AcOEt e 41,2 mg da fração MeOH/H₂O.

2.3.4 Fracionamento guiado pela atividade citotóxica da fração hexano

A fração Hex foi inicialmente escolhida para purificação por cromatografia líquida de alta eficiência [CLAE, Waters-1525, detector PDA Waters-2996 (265 nm), coluna XTerra RP-18 (4.6 × 250 mm, 5µm)] devido ao seu maior rendimento. Entretanto, esse procedimento não foi bem sucedido devido à baixa solubilidade desta fração em solventes orgânicos usuais. A extração da fração Hex com CH₃CN/H₂O (1:1) rendeu um precipitado inativo (548 mg), enquanto, a parte solúvel (fração Hex-S, 680 mg) potencializou a atividade citotóxica. Posteriormente, a fração Hex-S foi solubilizada em CH₃CN/H₂O (8:2), sendo que a mesma foi apenas parcialmente solúvel gerando um resíduo insolúvel (fração Hex-SII, 90 mg), o qual foi bastante ativo. Para obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN; Bruker Avance, modelo DRX-500) de ¹H e ¹³C, a solubilidade desta amostra foi investigada usando solventes deuterados, sendo a piridina-d₅ o melhor solvente. A análise dos espectros de RMN ¹H e de ¹³C indicou que a fração Hex-SIIS consistia de uma mistura de dois compostos (**1a** e **1b**), como confirmado por espectrometria de massa de alta resolução (Bruker Daltonics, UltrOTOFF-Q, MA) e dados espectroscópicos dos produtos formados nas reações de metilação e acetilação (WILKE *et al.*, 2009).

2.3.4.1 Caracterização estrutural dos α -aminoácidos lipídicos (**1a/1b**)

O tratamento cromatográfico da fração Hex resultou no isolamento de uma graxa marrom constituída de uma mistura binária de α -aminoácidos lipídicos, cujas estruturas foram elucidadas com base na análise de seus dados espectrais, como: infravermelho (IV; Perkin-Elmer, modelo FT-IR 1000, utilizando pastilhas de brometo de potássio) ν cm^{-1} : 3390, 2924, 2853, 1644, 1633, 1462, 1413; RMN ^1H : (piridina- d_5 , 500 MHz) 0,88 (sl, 3H-30/ 3H-31), 1,27 (sl, 2H-29 a 2H-3/2H-30 a 2H-3), 3,57 (sl, H-2); RMN ^{13}C : (piridina- d_5 , 125 MHz) 54,7 (CH-2); 32,5 (CH₂-28); 30,4 (CH₂-5/ CH₂-27); 29,9 (CH₂-3); 26,8 (CH₂-4); 23,3 (CH₂-29/ CH₂-30); 14,6 (CH₃-30/ CH₃-31); EMAR-ESI: **1a**, m/z 490,4566 [M + Na]⁺ (calculado para C₃₀H₆₁NO₂Na, 490,4599); e **1b**, m/z 504,4706 [M + Na]⁺ (calculado para C₃₁H₆₃NO₂Na, 504,4756).

Metilação de 1a/1b: Uma alíquota de **1a/1b** (4,0 mg) foi submetida a uma reação de metilação usando MeOH e HCl. A reação após tratamento usual, forneceu uma mistura dos respectivos ésteres metílicos **1a'/1b'** (4,2 mg). RMN ^1H : (piridina- d_5 , 500 MHz) 0,93 (t, J = 6,45 Hz, 3H-30/ 3H-31); 1,32 (sl, 2H-29 a 2H-3/2H-30 a 2H-3); 2,31 (NH₂), 3,65 (s, OCH₃). RMN ^{13}C : (piridina- d_5 , 125 MHz) 176,6 (C=O); 52,1 (CH-2); 33,2 (CH₂-28); 30,8-23,8 (CH₂-3/ CH₂-29); 14,6 (CH₃-30/ CH₃-31).

Acetilação de 1a'/1b': A mistura de ésteres metílicos acima mencionado foi submetida a reação de acetilação em anidrido acético/piridina 2:1, a temperatura ambiente. A mistura reacional, após tratamento convencional, resultou na mistura acetilada **1a''/1b''** (4,2 mg). RMN ^1H : (CDCl₃, 500 MHz) 0,89 (tl, 3H-30/ 3H-31); 1,27 (sl, 2H-29 a 2H-3/2H-30 a 2H-3); 2,19 (s, H-2); 3,68 (s, OCH₃).

2.3.5 Fracionamento guiado pela atividade citotóxica da fração acetato de etila

A fração AcOEt foi fracionada em um cartucho C₁₈ e eluída inicialmente com uma mistura de H₂O/CH₃CN 7:3 (4 x 10 mL) e posteriormente com CH₃CN da qual foram obtidas as frações AcOEt-C (753,5 mg) e AcOEt-P (15 mg), respectivamente. Verificou-se que a atividade citotóxica ficou concentrada apenas na fração AcOEt-P, que após CLAE, rendeu mais 5 frações, todas ativas (AcOEt-P-1, 5 mg; AcOEt-P-2, 1,2 mg; AcOEt-P-3, 1,6 mg; AcOEt-P-4, 2,2 mg e AcOEt-P-5, 2,4 mg).

2.3.5.1 Dados espectroscópicos das frações AcOEt-P-1-5

As frações AcOEt-P-1 a AcOEt-P-5 apresentaram espectros de RMN ^1H bastante semelhantes, sendo o perfil dos componentes majoritários compatível com a presença de esteróides.

Os métodos de obtenção das frações (Hex e AcOEt) bem como de isolamento dos compostos **1a** e **1b** e de caracterização dos mesmos foram realizados sob orientação da Dra. Oflíia Deusdênia Loiola Pessoa do LAFIPLAM, Universidade Federal do Ceará

2.3.6 Monitoramento da atividade biológica

O fracionamento químico das amostras obtidas foi guiado pela verificação da atividade citotóxica em células tumorais em cultura pelo ensaio do MTT (ver item 2.3.6.1.3 adiante.). Em uma análise quantitativa, as amostras diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) foram avaliadas quanto ao efeito antiproliferativo em 4 linhagens celulares tumorais em triplicatas de concentrações variando de 0,09 a 50 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato e partições e de 0,009 a 5 $\mu\text{g/mL}$ para frações mais purificadas. De acordo com o potencial antiproliferativo as frações foram selecionadas para prosseguir os estudos, sejam de análise química ou de atividade biológica. Concomitantemente, também foi realizado o teste de hemólise (ver item 2.3.6.2) para avaliar o potencial dos extratos e frações em causar danos na membrana celular, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

2.3.6.1 Atividade citotóxica

2.3.6.1.1 Linhagens tumorais

As linhagens celulares tumorais utilizadas: HL-60 (leucemia promielocítica), HCT-8 (câncer de cólon), SF-295 (sistema nervoso central) e MDA MB-435 (melanoma), foram cedidas pelo NCI-USA (*National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA*).

2.3.6.1.2 Cultivo das células

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 75 cm², volume de 250 mL); utilizando o meio de cultura Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI, Cultilab) complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) sempre manipuladas dentro de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe 12, classe II). O meio RPMI 1640 foi preparado a partir da diluição do conteúdo em pó do sachê em água tridestilada numa temperatura entre 15 e 20 °C sob agitação lenta e constante e suplementado com bicarbonato de sódio (5,6%), glutamina (0,2M) e HEPES (1M). O pH foi ajustado para 7,2 e o meio foi filtrado em membrana de nitrocelulose com poro de 0,22µm de diâmetro (Millipore) para esterilização. As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (NUAIRE, modelo TS Autoflow), seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão (Nikon, modelo Diaphot) a cada 24 horas. Quando necessário as células foram repicadas em meio de cultura. Para o desprendimento das células aderidas foi utilizado solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em tampão fosfato (BUTLER e DAWSON, 1992).

2.3.6.1.3 Método colorimétrico do MTT

2.3.6.1.3.1 Princípio do teste

Este ensaio foi utilizado para determinar citotoxicidade, proliferação e ativação celular. É uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT; Sigma), um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura, pelos metabólitos primários NADH₂, NADPH e Succinato (MOSMANN, 1983; BERRIDGE e TAN, 1993; TWENTYMAN *et al.*, 1989). A atividade do metabolismo celular é dependente do número de células e está diretamente relacionada com a quantidade de MTT metabolizada, permitindo a quantificação espectrofotométrica tanto da taxa de proliferação quanto de inibição das células da cultura (MOSMANN, 1983).

2.3.6.1.3.2 Procedimento experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram plaqueadas em multiplacas de 96 cavidades em uma densidade de 2×10^4 células/ 100 µL, para as células suspensas e $2 \times$

10^3 células/ 100 μL para as células aderidas utilizando o método automatizado oferecido pelo instrumento de *High Throughput Screening* (Beckman Coulter Inc., modelo Biomek 3000). Os extratos e frações foram incubados durante 72 horas juntamente com a suspensão de células em um volume final de 200 μL em estufa a 5% de CO_2 a 37°C . Ao término deste, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min; Eppendorf, modelo Centrifuge 5403) e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 μL da solução de MTT (0,5 mg/mL), e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 μL de DMSO em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880) utilizando o programa Multimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.) e filtro de 595 nm.

2.3.6.1.3.3 Análise dos resultados

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. Foi plotado um gráfico absorbância x concentração e determinada a sua concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI_{50}) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% ($\text{IC}_{95\%}$) realizado a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 4.0).

2.3.6.2 Atividade hemolítica

2.3.6.2.1 Eritrócitos de camundongos

Os eritrócitos utilizados foram obtidos do sangue de camundongos *Mus musculus swiss* retirados do plexo intra-orbital após leve anestesia em câmara de éter.

2.3.6.2.2 Princípio do teste

Este método permite avaliar o potencial da substância teste em causar danos na membrana celular, seja pela formação de poros ou pela ruptura total pela presença de hemoglobina em solução (JIMENEZ *et al.*, 2003).

2.3.6.2.3 Procedimento experimental

O sangue coletado foi diluído em aproximadamente 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm/3 minutos) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Os ensaios foram realizados em multiplacas com 96 cavidades. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo de diluição da substância teste, no caso, DMSO 10%. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 100 µL de solução salina e 100 µL das substâncias teste em solução. Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X – 100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 1,95 a 500 µg/mL. Em seguida, 100 µL da SE 2% foram adicionados em todos os poços. Após incubação de 1, 2 e 4 horas, sob agitação constante à temperatura ambiente (25 ± 1°C), as amostras foram centrifugadas (3000 rpm/3 min.) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para realização da leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 450 nm. A atividade hemolítica das amostras foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo.

2.3.6.2.4 Análise dos dados

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. As amostras foram testadas em diluição do tipo seriada. Foi plotado o gráfico absorbância x concentração e determinada a concentração efetiva média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CE₅₀) e seu respectivo intervalo de confiança (IC95%) para cada amostra a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism.

2.3.7 Estudo da citotoxicidade

Os estudos de caracterização do tipo de morte consistiram em avaliar eventos celulares desencadeados pelas amostras ativas obtidas de *P. variabilis* responsáveis pela

redução da proliferação celular em cultura. Os ensaios realizados com células HL-60 (3×10^5 células/mL) após 24 horas de incubação permitiram observar alterações na morfologia celular, integridade da membrana plasmática, integridade do DNA, potencial transmembrana mitocondrial e ciclo celular. A linhagem HL-60 está entre os modelos celulares de origem mielóide mais amplamente utilizados e com uma literatura extensa sobre suas características o que pode ajudar na interpretação dos resultados (COLLINS, 1987; COLLINS *et al.*, 1977; GALLAGHER *et al.*, 1979). A doxorubicina (Dox; Sigma), um quimioterápico de uso consagrado na clínica contra diversos tipos de tumores, foi utilizada como controle positivo em todos os experimentos a seguir.

2.3.7.1 Análise morfológica por microscopia óptica

As técnicas de coloração para análise das alterações morfológicas utilizadas permitiram a observação de algumas estruturas celulares importantes, sobretudo a membrana celular, citoplasma e núcleo através de microscopia óptica. A análise morfológica das células tratadas permite identificar alterações que possam estar ocorrendo e fornecer subsídios para sugerir o mecanismo de ação da amostra testada.

2.3.7.1.1 Coloração com hematoxilina e eosina

2.3.7.1.1.1 Princípio do teste

A técnica de coloração com hematoxilina e eosina (HE) permite diferenciar o citoplasma do núcleo, possibilitando, assim, a análise de algumas estruturas celulares. A hematoxilina é um corante basofílico que tem maior afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo uma cor lilás. A eosina, por sua vez, liga-se melhor aos componentes citoplasmáticos conferindo-lhe uma coloração rósea.

2.3.7.1.1.2 Procedimento experimental

Lâminas das células controle e tratadas com cada uma das frações foram preparadas em citocentrífuga (Shandon Southern Products Ltd., modelo Shandon Southern Cytospin), deixadas secar na bancada por aproximadamente 2 horas e fixadas com metanol 100% por 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada para remoção do fixador e coradas, inicialmente, com hematoxilina de Harris 0,1% (Newproo) por até

minuto. Após a lavagem com água destilada, as lâminas foram imersas em eosina 0,5% por mais 1 minuto e visualizadas ao microscópio. Para garantir a preservação do material, as lâminas foram montadas. Inicialmente as células foram desidratadas com gradientes crescentes de etanol:xilol, até xilol 100%, posteriormente, uma gota de bálsamo do Canadá foi pingada em cada lâmina e virada sobre uma lamínula e seca por 24 horas para posterior análise.

2.3.7.1.2 Coloração com May-Grüwald-Giemsa

2.3.7.1.2.1 Princípio do teste

A técnica de coloração com May-Grüwald-Giemsa também permite diferenciar o citoplasma do núcleo, possibilitando, assim, a análise de algumas estruturas celulares. O May-Grüwald-Giemsa possui derivados do azul de metileno que marcam de azul as estruturas mais ácidas do núcleo e a em vermelho as estruturas citoplasmáticas.

2.3.7.1.2.2 Procedimento experimental

Lâminas das células controle e tratadas com cada uma das frações foram preparadas em citocentrífuga, deixadas secar na bancada por aproximadamente 2 horas. Em seguida, as lâminas foram imersas por 10 segundos no fixador (MeOH), em seguida foram imersas por mais 10 segundos em May-Grüwald e finalmente foram imersas por 20 segundos em Giemsa e visualizadas ao microscópio. A montagem das lâminas para preservação foi semelhante a da coloração com HE já descrita no item 2.3.7.1.1.2.

2.3.7.1.2.3 Análise dos dados

As lâminas com células tratadas foram levadas ao microscópio (Olympus, modelo BX41) para a avaliação qualitativa de suas características morfológicas e comparadas às células do controle negativo. Posteriormente as células foram fotografadas (câmera Olympus, modelo C-7070) para o registro das alterações observadas.

2.3.7.2 Análise morfológica e contagem celular por citometria de fluxo

2.3.7.2.1 Princípio do teste

A citometria de fluxo (CF) é conveniente para estudar uma variedade de aspectos da morte celular incluindo a diferenciação de células viáveis, apoptóticas e necróticas devido

a sua vantagem de fornecer uma análise multiparamétrica de células em populações grandes (PREOBRAZHENSKY *et al.*, 2001). Dentre as aplicações a CF pode, por exemplo, distinguir eficientemente células vivas e mortas baseada no espalhamento da luz (WILLIAMS, 2004; PREOBRAZHENSKY *et al.*, 2001). As alterações morfológicas das células foram quantificadas por CF através da análise das alterações no espalhamento frontal ou *forward scatter* (FSC) que está relacionado ao tamanho relativo entre as células em conjunto com as alterações no espalhamento lateral ou *side scatter* (SSC) que está relacionado à complexidade interna, ou granulosidade relativa entre as células. As células com tamanho reduzido em relação ao grupo saudável estabelecido pela população sem tratamento são consideradas apoptóticas (WILLIAMS, 2004).

2.3.7.2.2 Procedimento experimental

Após a incubação, as células não tratadas (controle negativo) ou tratadas foram diluídas em PBS para a concentração de aproximadamente 300 células/ μL para serem adquiridas no citômetro (Guava Technologies, modelo EasyCyte Mini). A população predominante da cultura de HL-60 não tratada foi considerada sadia, sendo posicionada no gráfico de pontos (*dot plot*) em escala logarítmica em aproximadamente 10^2 tanto para o FSC quanto para o SSC em todos os experimentos. Cinco mil células foram contadas de cada replicata de cada grupo, sendo que os fragmentos celulares foram retirados da análise.

2.3.7.2.3 Análise dos dados

A concentração das células viáveis foi contada por uma região criada para delimitar a população de células predominantes no controle negativo usando o programa Cytosoft versão 4.1 (GuavaTechnologies). As porcentagens ocorrência de apoptose foi detectada usando o programa FCS express software (De novo software, Ontario, CAN) através de 3 regiões criadas para delimitar as células viáveis (R1), células com redução do volume celular (R2) e células com redução do volume celular e aumento da granulosidade (R3) atribuída, por exemplo, a fragmentação de DNA (Willians, 2004).

Os dados foram analisados a partir das médias e dos respectivos erros padrão das médias de 3 experimentos realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados em relação ao controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet com nível de significância máximo de 5% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism.

2.3.7.3 Determinação da integridade da membrana plasmática

2.3.7.3.1 Princípio do teste

As células em apoptose mantêm suas membranas íntegras durante quase todo o processo até a sua morte, diferentemente das necróticas que perdem a integridade logo no início do processo (WILLIAMS, 2004). Este ensaio se baseia na capacidade de o iodeto de propídeo (PI, do inglês, *Propidium Iodide*), hidrofílico, penetrar apenas nas células cuja membrana plasmática (MP) esteja rompida e emitir alta fluorescência vermelha quando excitado pelo laser de argônio (488nm) somente quando estiver ligado ao DNA. As células cuja membrana permanece íntegra emitem baixa fluorescência (VERMES *et al.*, 2000).

2.3.7.3.2 Procedimento experimental

Após a incubação, uma alíquota de 100µL de suspensão de células tratadas ou não tratadas foi incubada com 100µL de uma solução de PI a 50 µg/mL diluída em PBS. Após 5 minutos de incubação as amostras foram analisadas por CF. A população de células com baixa fluorescência vermelha foi posicionada em 10¹ num histograma com escala logarítmica (Log) utilizando-se o filtro de 680 nm. Cinco mil células foram contadas de cada replicata de cada grupo, com os fragmentos celulares omitidos da análise.

2.3.7.3.3 Análise dos dados

As porcentagens das populações de células com MP íntegra ou rompida foram analisadas usando-se respectivamente os marcadores M1 para baixa intensidade de fluorescência e M2 para alta fluorescência. Os dados de integridade de MP foram analisados a partir das médias e dos erros padrão das médias de 3 experimentos realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados em relação ao controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet com nível de significância máximo de 5% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism.

2.3.7.4 Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial

2.3.7.4.1 Princípio do teste

A mitocôndria está normalmente envolvida na apoptose induzida pela via intrínseca embora também possa participar na apoptose iniciada pela via extrínseca mais

tardamente através de ativação cruzada. A formação de poros na membrana externa da mitocôndria permite a saída de fatores pró-apoptóticos tais como o citocromo c ou o smac diablo. Através destes poros também ocorre um efluxo de íons H^+ , induzindo a alteração do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). A rodamina 123, um corante fluorescente lipofílico, é sequestrada dentro da mitocôndria em grandes quantidades quando esta apresenta seu $\Delta\psi_m$ normal. Dessa forma, as células viáveis emitem alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas enquanto que as mitocôndrias das células apoptóticas sobretudo se a via envolvida for a via intrínseca, terão menos afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão fluorescência de menor intensidade (WANG *et al.*, 2008).

2.3.7.4.2 Procedimento experimental

Após a incubação, 50 μ L das células do controle ou tratadas foram incubadas com 200 μ L de uma solução de rodamina 123 (Sigma) a 1 μ g/mL diluída em PBS, por 15 minutos em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 . Em seguida, as células foram centrifugadas em tubos plásticos pequenos (2000rpm/5 minutos, Kendro Laboratory Products, Sorvall Biofuge Fresco), o sobrenadante substituído por 200 μ L de PBS e incubadas por mais 30 minutos. A fluorescência média (filtro de 625 nm) das células do controle negativo foi ajustada em 10^2 em um histograma com escala Log. Cinco mil células foram contadas de cada replicata de cada grupo, com os fragmentos celulares omitidos da análise.

2.3.7.4.3 Análise dos dados

A porcentagem das células que perderam o $\Delta\psi_m$ foi obtida pelo marcador M1 posicionado entre 10^0 e aproximadamente 70 enquanto as células com $\Delta\psi_m$ normal foram marcadas de aproximadamente 70 a 10^3 . Os dados das porcentagens de despolarização do $\Delta\psi_m$ foram analisados a partir das médias e dos erros padrão das médias de 3 experimentos realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados em relação ao controle negativo por Teste t não pareado com nível de significância máximo de 5% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism.

2.3.7.5 Avaliação da fragmentação de DNA

2.3.7.5.1 Princípio do teste

A fragmentação internucleossomal do DNA em múltiplos de 180 a 200 pares de base é um dos principais eventos observados para detecção de morte por apoptose. Este teste utiliza-se da capacidade do PI se ligar ao DNA. Inicialmente a MP foi lisada para que o PI possa se ligar a todo o DNA das células. Células com o núcleo íntegro emitirão alta fluorescência; já núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado terão incorporado menor quantidade de PI, emitindo, assim, menor fluorescência (NICOLLETTI *et al.*, 1991).

2.3.7.5.2 Procedimento Experimental

Após o período de incubação, uma alíquota de 100µL de suspensão de células tratadas ou não tratadas foi adicionada 100µL de uma solução de PI a 50 µg/mL contendo triton X-100 a 0,1% e citrato a 0,1%. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente e no escuro, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies) com o filtro de 680 nm. Usando gráfico do tipo histograma em escala Log, o DNA celular foi ajustado em aproximadamente 10^3 enquanto que todo DNA sub-G0/G1 foi considerado fragmentado. Cinco mil células foram contadas de cada replicata de cada grupo, com os fragmentos celulares omitidos da análise.

2.3.7.5.3 Análise dos Dados

A porcentagem de fragmentação de DNA foi obtida através de um marcador M1 posicionado para localizar a população sub-G0/G1. Os dados de DNA sub-G0/G1 foram analisados a partir das médias e dos erros padrão das médias de 3 experimentos em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados em relação ao controle negativo Teste t não pareado com nível de significância máximo de 5% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism.

2.3.7.6 Análise de alterações no ciclo celular

2.3.7.6.1 Princípio do teste

Este teste, mais uma vez utiliza-se da capacidade do PI se ligar ao DNA. Inicialmente a MP será lisada para que o PI possa se ligar a todo o DNA das células. As células em G1, S ou G2 emitem uma intensidade de fluorescência diretamente proporcional ao seu conteúdo de DNA sendo possível fazer um perfil do ciclo celular da cultura de células não tratadas ou tratadas (NICOLLETTI *et al.*, 1991).

2.3.7.6.2. Procedimento experimental

Após o período de incubação, uma alíquota de 100 μ L de suspensão de células tratadas ou não tratadas foi adicionada 100 μ L de uma solução de PI a 50 μ g/mL contendo triton X-100 a 0,1% e citrato a 0,1%. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente e no escuro, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies) com o filtro de 680 nm. Usando gráfico do tipo histograma em escala linear o DNA celular foi ajustado de forma que G0/G1 ficou posicionado em aproximadamente 1000 e G2/M em aproximadamente 2000. Cinco mil células foram contadas de cada replicata de cada grupo, com os fragmentos celulares omitidos da análise.

2.3.7.6.3. Análise dos dados

Os dados foram analisados através de algoritmos desenvolvidos para análise de ciclo celular no programa ModFit LT (Verity Software House). Os dados das porcentagens de células em G0/G1, S e G2/M foram analisados a partir das médias e dos erros padrão das médias de 3 experimentos em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados em relação ao controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet com nível de significância máximo de 5% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism.

2.4 Resultados

2.4.1 Extração e partições

Os procedimentos de extração e partições realizados para obtenção do extrato bruto denominado EHB e frações Hex, DCM, AcOEt e MeOH/H₂O estão sintetizados na figura 12.

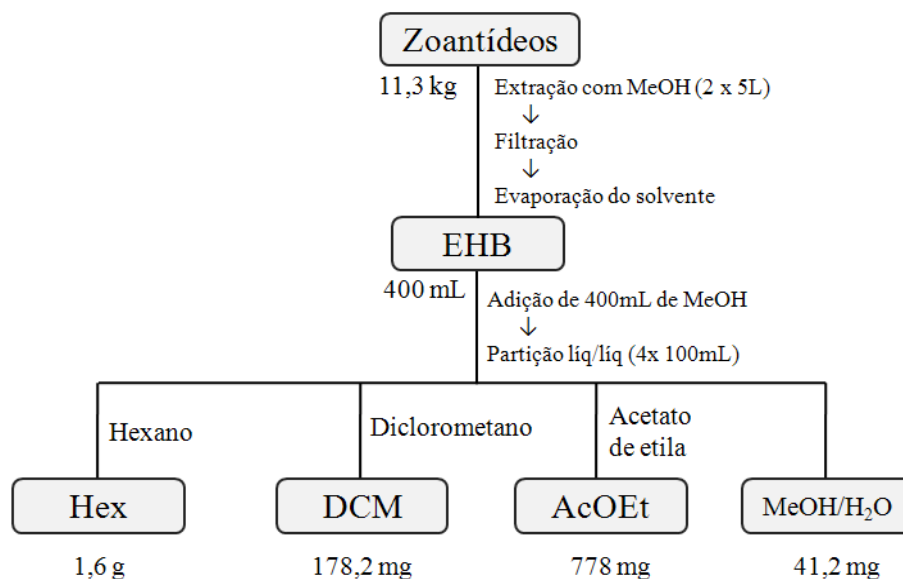


Figura 12 – Fluxograma esquemático dos processos de extração e partições do zoantídeo *Protospalythoa variabilis*. O extrato hidroalcoólico bruto (EHB) foi obtido após extração com metanol (MeOH) e evaporação do solvente. Em seguida, um volume de MeOH semelhante ao EHB foi adicionado para realização da partição com solventes orgânicos de polaridades crescentes: n-hexano, diclorometano e acetato de etila rendendo as frações Hex, DCM e AcOEt respectivamente, e a fração MeOH/H₂O relativa aos compostos mais polares que permaneceram na mistura hidroalcoólica.

O EHB exibiu potente citotoxicidade em todas as linhagens tumorais testadas e atividade hemolítica tempo dependente. Todas as frações derivadas do EHB também apresentaram atividade citotóxica com as Hex e MeOH/H₂O exibindo maior potência, sendo que dentre todas as frações, apenas a MeOH/H₂O reteve a atividade hemolítica observada no EHB (Tabela 1).

Tabela 1 – Avaliação da citotoxicidade e do potencial hemolítico do extrato hidroalcoólico bruto (EHB) e frações obtidas por partição líquido/líquido com solventes de polaridades crescentes: n-hexano (fração Hex), diclorometano (fração DCM) e acetato de etila (fração AcOEt) e fração hidroalcoólica contendo compostos mais polares (MeOH/H₂O). Estão apresentados os valores de concentração inibitória média no teste do MTT (72 horas) em 4 linhagens celulares tumorais (sistema nervoso, SF-295; leucemia, HL-60; cólon, HCT-8 e melanoma, MDA-MB-435) e concentração efetiva média teste de hemólise (1, 2 e 4 horas) em eritrócitos de camundongos (*Mus musculus swiss*) com seus respectivos intervalos de confiança de 95% em µg/mL. Os dados apresentados são relativos a 3 experimentos realizados em triplicata

Amostra	Ensaio						
	MTT				Hemólise		
	SF-295	HL-60	HCT-8	MDA-MB435	1 h	2 h	4 h
EHB	0,40	0,36	4,24	0,73	>500	>500	68,83
	0,27 - 0,59	0,09 - 1,38	3,25 - 5,52	0,48 - 1,09			38,86 - 121,9
Hex	0,29	0,43	0,24	0,38	> 500	> 500	> 500
	0,25 - 0,33	0,39 - 0,47	0,22 - 0,27	0,34 - 0,43			
DCM	2,95	5,43	2,67	2,82	> 500	> 500	> 500
	2,68 - 3,25	4,86 - 6,07	2,19 - 3,24	2,40 - 3,29			
AcOEt	1,85	2,94	2,25	1,42	> 500	> 500	> 500
	1,29 - 2,65	1,94 - 4,46	1,26 - 4,02	1,08 - 1,87			
MeOH/H₂O	0,49	0,76	0,40	0,085	> 500	213,3	116,9
	0,40 - 0,59	0,62 - 0,94	0,32 - 0,49	0,02 - 0,41		195,3 - 233,1	99,18 - 137,9

2.4.2 Fracionamento guiado pela atividade citotóxica da fração hexano

Uma graxa marrom denominada Hex-SII foi obtida da fração Hex através de sucessivas extrações com CH₃CN/H₂O em diferentes proporções, as quais renderam frações solúveis e insolúveis. Uma parte dessa graxa foi solúvel em piridina-d₅, que depois da evaporação do solvente, rendeu a fração denominada Hex-SIIS com atividade semelhante a Hex-SII. Um fluxograma sintetizando este fracionamento e os dados da atividade citotóxica estão apresentados nas figura 13 e tabela 2 respectivamente. O espectro de infravermelho apresentou bandas de absorção em 1633 e 1413 cm⁻¹ (-COO⁻) e 1644 e 1462 cm⁻¹ (-NH₃⁺), características de aminoácidos. O espectro de RMN ¹H da fração Hex-SIIS exibiu apenas um sinal em δ 3,57 (tl, H-2), característico de hidrogênio metínico ligado a nitrogênio, um sinal intenso e largo em δ 1,27, característico de grupos metilênicos em sobreposição e um tripleto largo em δ 0,88 típico de metila de cadeia alifática. O espectro de RMN ¹³C (CPD e DEPT 135) revelou um sinal em δ 54,7 (CH-2) inferido a carbono metínico ligado a nitrogênio, o

qual no espectro HMQC, exibiu correlação com o sinal de hidrogênio em δ 3,57 (H-2). Adicionalmente, foram observados sinais na faixa de δ 32,4 a 23,3, correspondentes a carbonos metilênicos e um sinal de carbono em δ 14,6, referente a grupo metila. Estes dados foram compatíveis com a presença de um α -aminoácido de cadeia longa.

Apesar da ausência de sinal de carbono referente a carboxila no espectro de RMN ^{13}C , os dados espectroscópicos acima mencionados juntamente com o teste positivo (corando de roxo) da fração Hex-SIIS frente a solução de ninhidrina (0,1 % em EtOH) sugeriram que os compostos da amostra eram α -aminoácidos de cadeia longa. Posteriormente foi obtido o espectro de massa de alta resolução (EMAR-ESI, modo positivo) dessa amostra o qual apresentou um pico íon molecular em m/z 490,4566 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ indicando a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{61}\text{NO}_2$ para **1a**, e m/z 504,4706 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{63}\text{NO}_2$ para **1b** (Fig. 14). Adicionalmente, as estruturas dos α -aminoácidos foram confirmadas através dos dados espectroscópicos dos ésteres metílicos **1a'**/**1b'** e de seus derivados acetilados **1a''**/**1b''**. O espectro HMBC mostrou claramente a correlação entre os hidrogênios aminados em δ 2,31 com a carboxila em δ 175,5, e carbonos metilênicos em δ 30,0 (CH_2 -3) e 26,2 (CH_2 -4), e também do grupo metoxila em δ 3,65 com a carboxila (δ 175,5). Além disso, as estruturas dos α -aminoácidos foram confirmadas através do sinal em δ 2,19 (CH_3) no espectro de RMN ^1H do derivado acetilado do éster metílico. Desta forma, as estruturas de **1a/1b** foram estabelecidas como sendo de fato α -aminoácidos de cadeia longa.

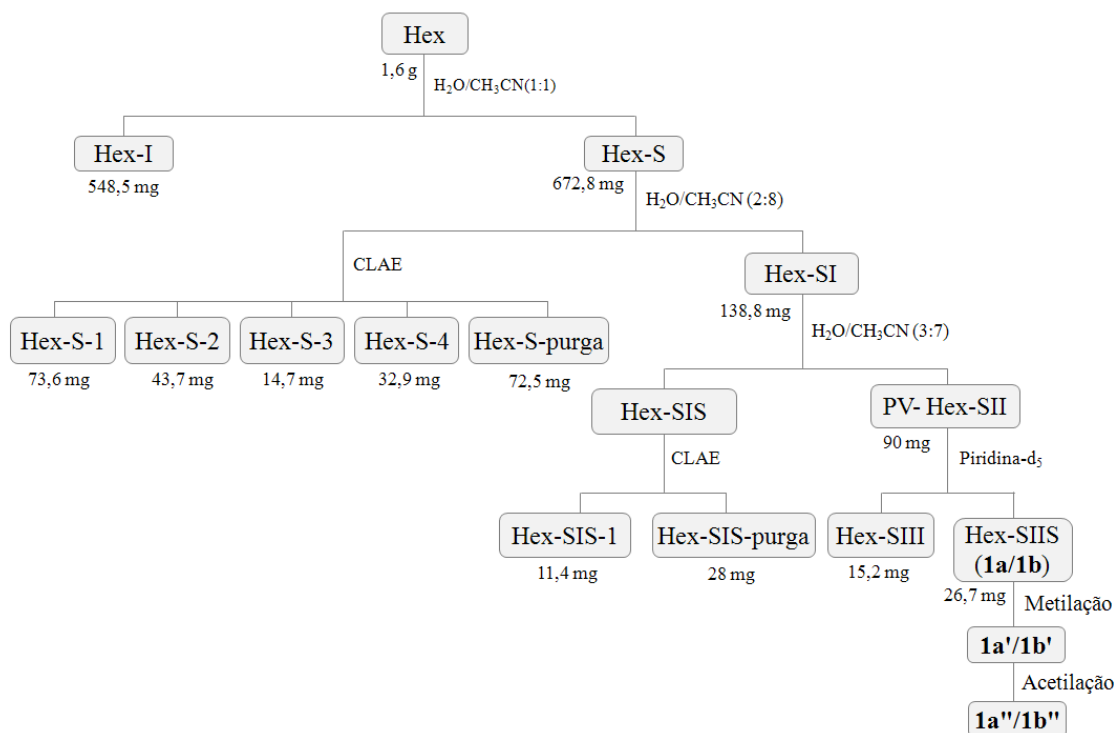


Figura 13 – Fluxograma esquemático dos procedimentos realizados para purificação da fração hexano (Hex) obtida através de partição líquido/líquido do extrato hidroalcoólico bruto do zoantídeo *Protospalythoa variabilis* (EHB). –S corresponde à fração solúvel e -I à fração insolúvel em mistura de H₂O/CH₃CN de proporções indicadas na figura. CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 2 – Avaliação da citotoxicidade das sub-frações da fração hexano (Hex) através do teste do MTT após 72 horas de incubação em 4 linhagens de células tumorais (sistema nervoso, SF-295; leucemia, HL-60; cólon, HCT-8 e melanoma, MDA-MB-435). Os resultados estão apresentados como valores de concentração inibitória média (CI₅₀) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) em µg/mL. Os dados correspondem a 3 experimentos realizados em triplicata. –S corresponde à fração solúvel e -I à fração insolúvel em mistura de H₂O/CH₃CN em diferentes proporções

Fração	CI ₅₀ IC 95%			
	HL-60	HCT-8	MDA-MB-435	SF-295
Hex-I	>50	>50	>50	>50
Hex-S	0,32 0,19-0,55	0,60 0,40-0,89	0,76 0,58-0,99	n.t.
Hex-SI	0,94 0,61-1,45	0,49 0,40-0,60	1,27 1,08-1,50	0,96 0,49-1,88
Hex-S-1	3,24 0,61-16,99	1,46 1,03-2,06	4,69 2,36-9,32	2,59 1,84-3,65
Hex-S-2	1,69 0,52-5,48	0,61 0,51-0,72	1,66 1,42-1,95	1,32 1,08-1,61
Hex-S-3	> 5	> 5	> 5	> 5
Hex-S-4	> 5	> 5	> 5	> 5
Hex-S-purga	1,27 0,75-2,14	0,33 0,26-0,42	1,06 0,80-1,40	1,01 0,45-2,29
Hex-SIS	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Hex-SIS-1	1,94 1,01-3,73	0,63 0,54-0,73	1,95 1,39-2,74	0,99 0,80-1,22
Hex-SIS-purga	4,29 1,70-10,80	0,95 0,84-1,09	2,00 1,65-2,44	2,20 1,90-2,56
Hex-SII	0,056 0,037-0,084	0,054 0,045-0,067	0,054 0,049-0,060	0,058 0,051-0,066
Hex-SIII	> 5	3,07 0,69-13,55	n.t.	3,26 2,95-3,61
Hex-SIIS (1a/1b)	0,13 0,12-0,14	0,055 0,051-0,059	n.t.	0,070 0,066-0,075

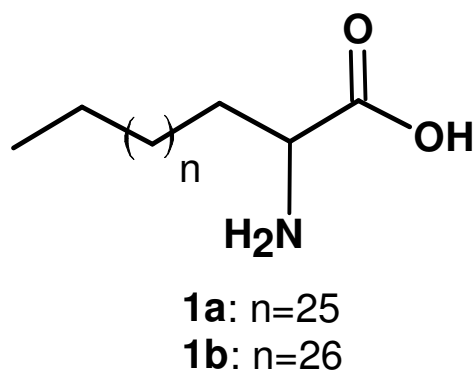


Figura 14 – Estrutura química dos α -aminoácidos lipídicos **1a** e **1b** isolados do zoantídeo *Protospalythoa variabilis*.

Todos os dados químicos utilizados para elucidação da estrutura química de **1a/1b** inclusive os espectros obtidos das reações de metilação e acetilação estão apresentados no Anexo I (WILKE *et al.*, 2009).

2.4.3 Fracionamento guiado pela atividade citotóxica da fração acetato de etila

Foram obtidas 5 frações com potente citotoxicidade após um fracionamento inicial com cartucho C18 seguido de CLAE. Os procedimentos seguidos para purificação estão sumarizados nas figuras 15 e 16 e os resultados da atividade citotóxica encontram-se na tabela 3.

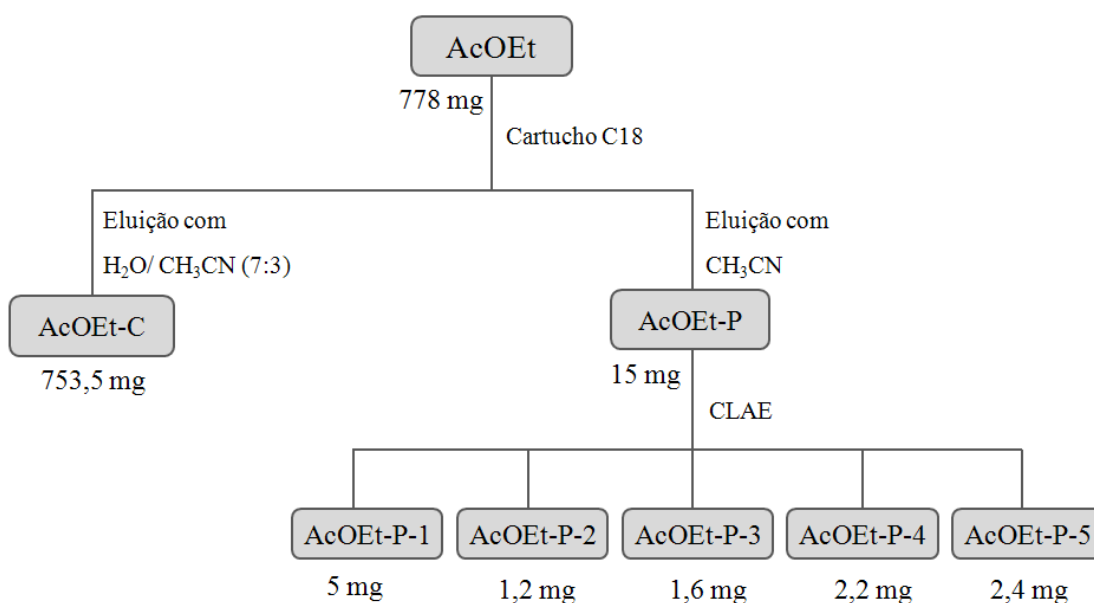


Figura 15 – Fluxograma esquemático dos procedimentos realizados para purificação da fração acetato de etila (AcOEt) obtida através de partição líquido/líquido do extrato hidroalcoólico bruto do zoantídeo *Protopalychoa variabilis* (EHB). CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência.

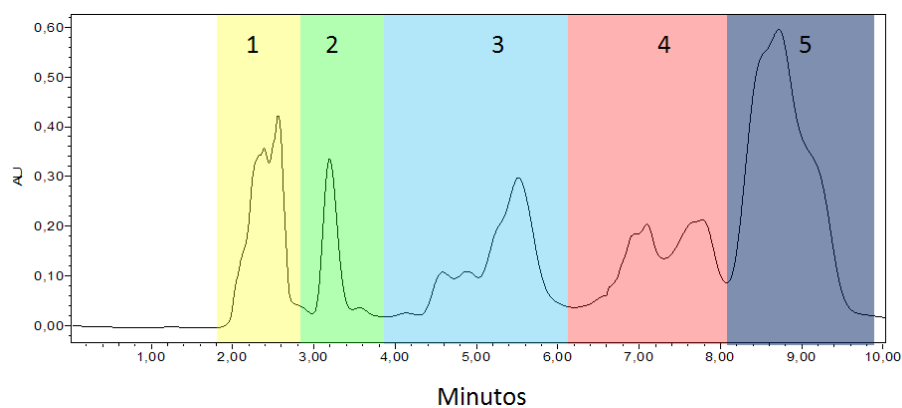


Figura 16 – Cromatograma da fração acetato de etila AcOEt-P. Eluição sob um fluxo de 4,72mL/min a 35°C, isocrático de H2O/CH3CN (75.25 v/v) por 10 minutos, em uma coluna XTerra RP18 4,6 x 250 mm, 5 µm. $\lambda = 254\text{nm}$.

Tabela 3 – Avaliação da citotoxicidade das sub-frações obtidas a partir da fração acetato de etila (AcOEt) através do teste do MTT após 72 horas de incubação em 4 linhagens de células tumorais (sistema nervoso, SF-295; leucemia, HL-60; cólon, HCT-8 e melanoma, MDA-MB-435). Os resultados estão apresentados como valores de concentração inibitória média (CI₅₀) e intervalo de confiança de 95% (IC95%) em µg/mL. Os dados correspondem a 3 experimentos realizados em triplicata

Fração	IC ₅₀ IC 95% (µg/ mL)			
	HL-60	HCT-8	MDA MB-435	SF 295
AcOEt-C	>50	>50	>50	>50
AcOEt-P	0,085 0,028 – 0,253	0,079 0,005 – 1,21	0,109 0,097 – 0,123	0,049 0,036 – 0,069
AcOEt-P-1	2,56 2,15 – 3,04	1,54 1,32 – 1,80	2,44 1,92 – 3,09	3,60 2,78 – 4,67
AcOEt-P-2	0,58 0,49 – 0,67	0,39 0,35 – 0,44	0,61 0,45 – 0,82	0,908 0,72 – 1,13
AcOEt-P-3	1,53 1,16 – 2,03	0,56 0,46 – 0,68	0,82 0,65 – 1,04	1,45 1,10 – 1,91
AcOEt-P-4	0,13 0,11 – 0,16	0,07 0,06 – 0,09	0,13 0,12 – 0,14	0,14 0,11 – 0,17
AcOEt-P-5	0,44 0,38 – 0,49	0,78 0,59 – 1,03	0,74 0,49 – 1,13	0,37 0,27 – 0,51

Devido a reduzida quantidade das frações AcOEt-P-1 a AcOEt-P-5, foram obtidos apenas os espectros de RMN ¹H os quais apresentaram sinais compatíveis com compostos esteroidais. Os espectros de RMN ¹H das frações acima estão apresentados no Anexo II.

2.4.4 Estudo da citotoxicidade dos α-aminoácidos lipídicos **1a/1b** em células HL-60 após 24 horas de incubação

O estudo da citotoxicidade dos α-aminoácidos lipídicos **1a/1b** em células HL-60 consistiu em uma série de ensaios que permitiram analisar os seguintes efeitos: alterações morfológicas e na viabilidade, despolarização do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), fragmentação de DNA e alterações do ciclo celular. As concentrações escolhidas (100, 250 e 500 ng/mL) foram relativas a aproximadamente 0,2; 0,5 e 1,0 vezes o valor da CI₅₀

(530 ng/mL, IC_{95%} 480-600 ng/mL) destes compostos obtida no ensaio do MTT após 24 horas de incubação.

2.4.4.1 Alterações na morfologia e viabilidade celular

Foram evidenciadas importantes alterações morfológicas nas células HL-60 coradas com May-Grünwald-Giemsa após 24 horas de tratamento (Fig. 17). As células não tratadas apresentaram em sua maioria, núcleo homogêneo e volumoso, membrana plasmática regular e íntegra e pequenos vacúolos citoplasmáticos. A maior parte das células tratadas com Dox estava com volume reduzido e núcleo fragmentado. O tratamento com **1a/1b** induziu uma condensação periférica da cromatina ao longo da carioteca inteira ou em formas de meia-lua e *blebbings* na membrana plasmática. Todas estas alterações observadas tanto no tratamento com Dox quanto com **1a/1b** são compatíveis com morte celular por apoptose.

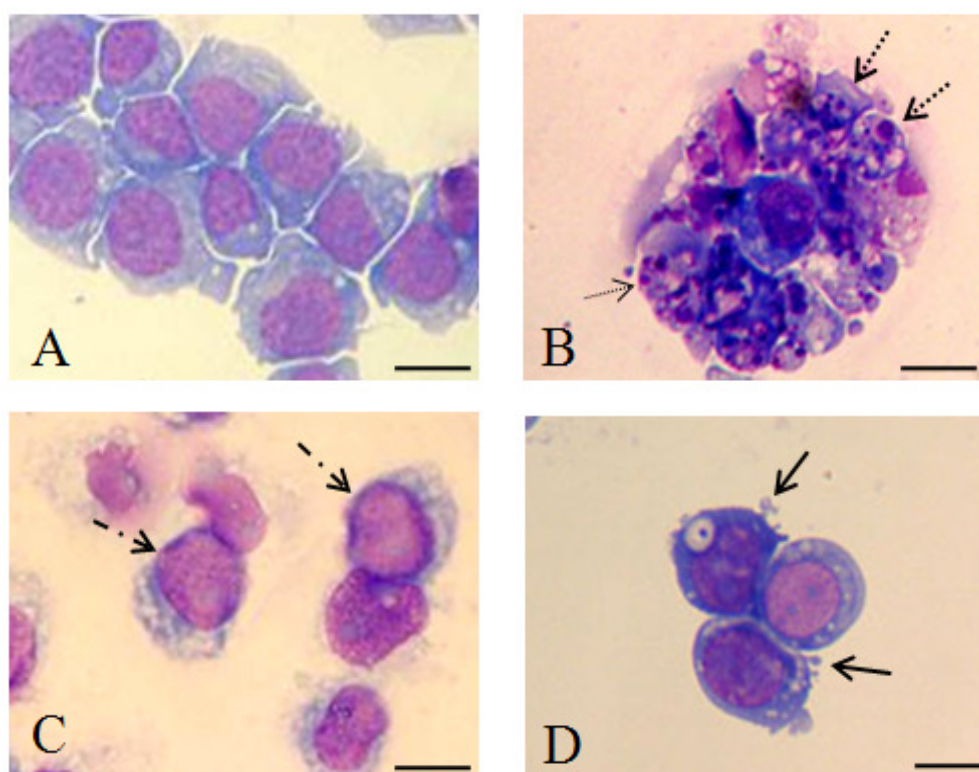


Figura 17 – Alterações morfológicas em células HL-60 sem tratamento (A) ou tratadas com 300 ng/mL de doxorrubicina (B), ou com 100 e 250 ng/mL de 1a/1b (C e D respectivamente), após 24 horas de incubação. Setas: pontilhada, fragmentação de DNA; traço e ponto, condensação periférica da cromatina; inteira, blebbing. Coloração com May-Grünwald-Giemsa. Aumento: 400X. Escala: 30 µM.

Os tratamentos de 24 horas das células HL-60 com Dox e **1a/1b** também alteraram as características de espalhamento da luz na CF (Fig. 18). Foi observado um aumento da porcentagem de células com volume reduzido na região R2 tanto para a Dox quanto para as células tratadas com **1a/1b** a partir de 250 ng/mL (Fig. 19). Com 250 ng/mL de **1a/b** quase 30% das células estavam com o volume reduzido, e com 500 ng/mL de **1a/1b** e 300ng/mL de Dox, aproximadamente 70% das células tinham reduzido de volume.

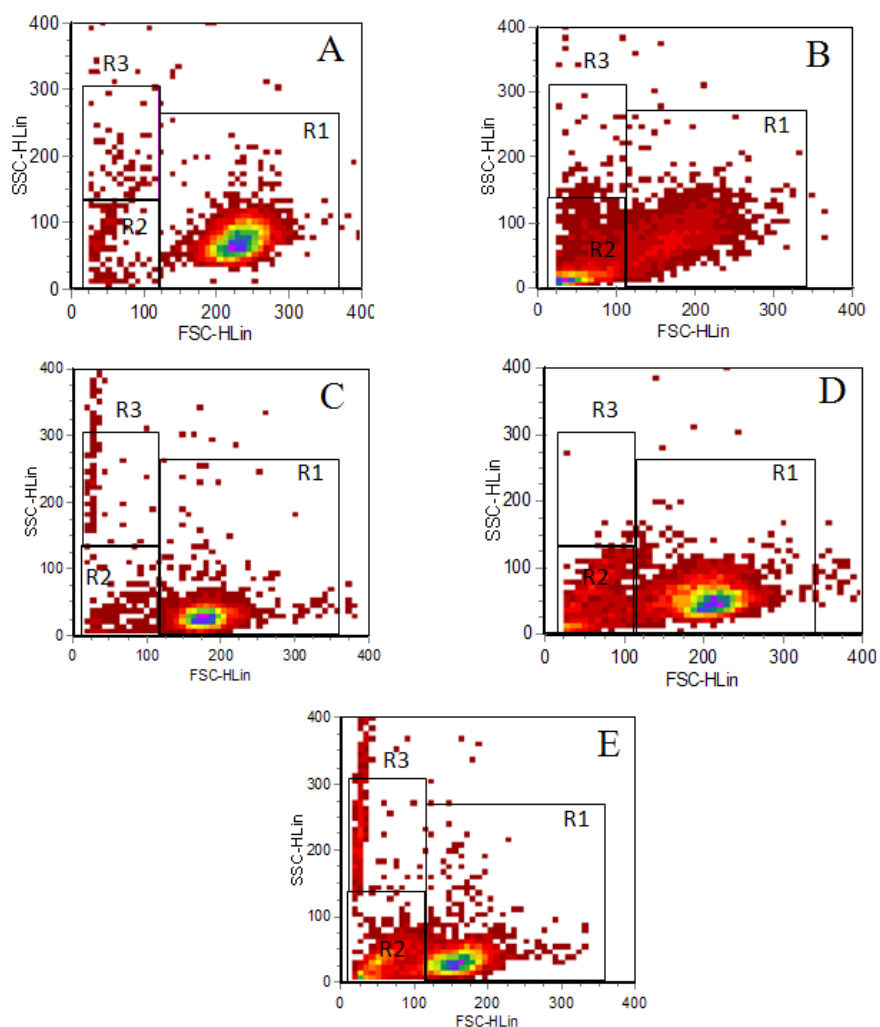


Figura 18 – Espalhamento frontal da luz (FSC-Linear) e lateral (SSC-Linear) de células HL-60 sem tratamento (A) ou tratadas com 300 ng/mL de doxorrubicina (B), ou com 100, 250 e 500 ng/mL de **1a/1b** (C, D e E respectivamente), após 24 horas de incubação. R1, região correspondente a células com tamanho normal; R2, região de células com volume reduzido e R3, região de células com condensação da cromatina. Os gráficos apresentados são representativos dos resultados de triplicata de 3 experimentos.

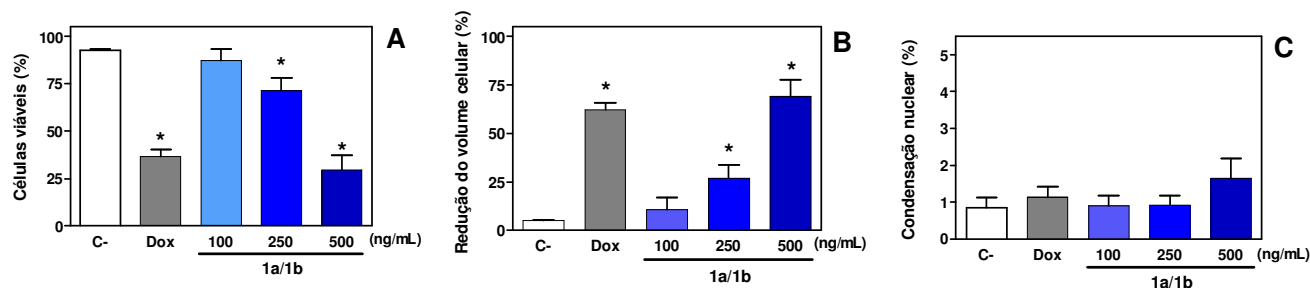


Figura 19 – Alterações morfológicas das células HL-60 sem tratamento (C-) ou tratadas com 300 ng/mL de doxorubicina (Dox) ou com 100, 250 e 500 ng/mL de 1a/1b analisadas por citometria de fluxo após 24 horas de incubação. A, porcentagem de células com tamanho normal contada em R1, B, porcentagem de células com volume reduzido contada em R2 e C, porcentagem de células com condensação nuclear contada em R3. Cinco mil eventos/replicata foram obtidos de 3 experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de Dunnet.

A concentração de células também diminuiu nos tratamentos com **1a/1b** a partir de 250 ng/mL e com 300 ng/mL de Dox (Fig. 20A). A concentração de células sem tratamento aumentou 2,4 vezes em relação à concentração inicial de plaqueamento de 3×10^5 para aproximadamente 7×10^5 células/mL. A concentração das células tratadas com 100ng/mL de **1a/1b** também aumentou 2,2 vezes ($6,8 \times 10^5$ células/mL). A inibição da proliferação das células começou a ser observada com 250 ng/mL de **1a/1b** ($5,6 \times 10^5$ células/mL) sendo que no tratamento de 500 ng/mL, a concentração encontrada foi menor que a inicial ($2,3 \times 10^6$ células/mL). A Dox também diminuiu a concentração de células para $2,6 \times 10^5$ células/mL.

A membrana celular estava intacta tanto no tratamento com Dox quanto com **1a/1b** até 250 ng/mL. Com 500 ng/mL de **1a/1b**, aproximadamente 30% das células apresentaram rompimento de membrana (Fig. 20B).

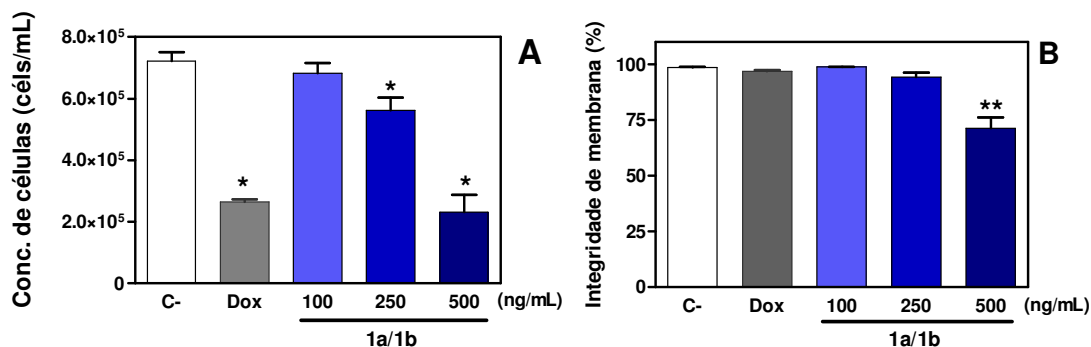


Figura 20 – Viabilidade celular. Alterações da concentração de células viáveis (A) ou da integridade da membrana plasmática (B) das células HL-60 sem tratamento (C-) ou tratadas com 300 ng/mL de doxorubicina (Dox) ou com 100, 250 e 500 ng/mL **1a/1b** analisadas por citometria de fluxo após 24 horas de incubação. Cinco mil eventos/replicata foram obtidos de 3 experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de Dunnett.

2.4.4.2 Despolarização do potencial transmembrana mitocondrial

O potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) das células HL-60 foi alterado pelo tratamento com **1a/1b** após 24 horas (Fig. 21). Foi considerado $\Delta\psi_m$ despolarizado para as células que emitiram baixa fluorescência verde. A porcentagem de células com o $\Delta\psi_m$ despolarizado aumentou de 9% do controle negativo para 22% já no tratamento com a menor concentração de **1a/1b** e aumentou ainda mais para quase 30 e 50% nos tratamentos com 250 e 500 ng/mL respectivamente. A Dox aumentou a despolarização do $\Delta\psi_m$ para aproximadamente 60%.

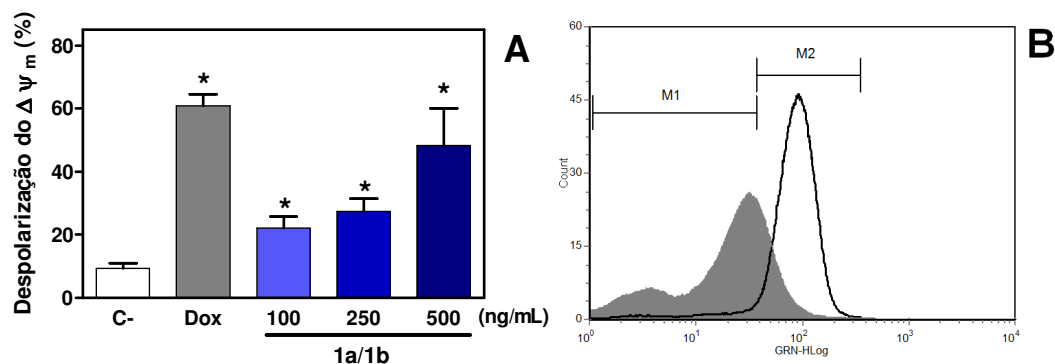


Figura 21 – Potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). **A**, porcentagem de despolarização de células HL-60 sem tratamento (C-) ou tratadas com doxorrubicina a 300 ng/mL (Dox) ou com **1a/1b** a 100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ analisadas por citometria de fluxo após 24 horas de incubação. **B**, histograma (fluorescência verde em escala logarítima) ilustrativo comparando o $\Delta\Psi_m$ do C- (linha) e do tratamento de 500 ng/mL do 1a/1b (cinza). Cinco mil eventos/replicata foram obtidos de 3 experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por Teste t não pareado.

2.4.4.3 Fragmentação de DNA

A fragmentação de DNA também foi avaliada por CF. Os eventos equivalentes a DNA sub-G0/G1 foram considerados fragmentação (os fragmentos celulares não foram contados). Como apresentado na figura 22, o tratamento com **1a/1b** induziu fragmentação de DNA. A partir de 250 ng/mL (10%) foi observado aumento da fragmentação de DNA que aumentou consideravelmente na maior concentração (35%). A Dox também induziu fragmentação de aproximadamente 50% das células.

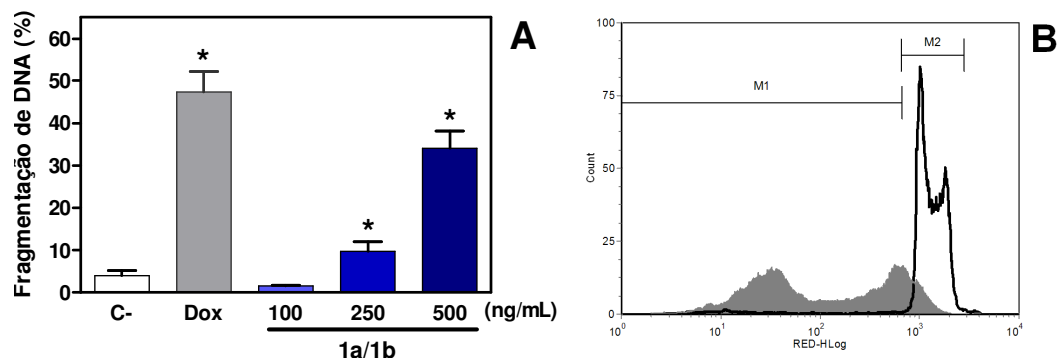


Figura 22 – Fragmentação de DNA. A, porcentagem de DNA sub-G0/G1 das células HL-60 sem tratamento (C-) ou tratadas com 300 ng/mL de doxorubicina (Dox) ou com 100, 250 e 500 ng/mL de **1a/1b** analisadas por citometria de fluxo após 24 horas de incubação. B, histograma (fluorescência vermelha em escala logarítmica) representativo dos experimentos comparando o conteúdo de DNA fragmentado do C- (linha) e do tratamento de 500 ng/mL do **1a/1b** (cinza). Cinco mil eventos/replicata foram obtidos de 3 experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por Teste t não pareado.

2.4.4.4 Análise do ciclo celular

A análise do ciclo celular revelou não haver alteração em nenhuma das fases: G0/G1, S ou G2/M (dados não apresentados).

2.4.4.5 Resumo dos resultados

Os resultados obtidos no estudo da citotoxicidade dos α -aminoácidos lipídicos **1a/1b** nas concentrações de 100, 250 e 500 ng/mL em células HL-60 após 24 horas de incubação estão resumidos da figura 23. Quando os dados são tomados para análise simultaneamente, observa-se que as células apresentaram características compatíveis com apoptose e uma grande importância da via intrínseca neste evento.

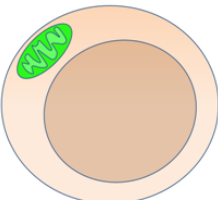
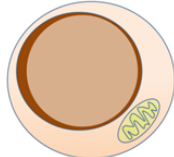
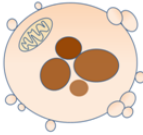

Características das células	Controle negativo	1a/1b		
		100 ng/mL	250 ng/mL	500 ng/mL
Membrana rompida	-	-	-	+
<i>Blebbings</i>	-	-	+	+
Redução do volume celular	-	-	+	+
$\Delta\psi_m$ despolarizado	-	+	+	+
DNA fragmentado	-	-	+	+
Representação das características celulares estudadas				

Figura 23 – Resumo das alterações induzidas pelos α -aminoácidos lipídicos (1a/1b) nas células HL-60 após 24 horas de incubação. As figuras das células são representativas da reunião das características encontradas na análise de alterações morfológica e diferentes ensaios por citometria de fluxo. As células tratadas com **1a/1b** começam a apresentar características de morte por apoptose desde a menor concentração testada (100 ng/mL) que se intensificam com o aumento da concentração (250 e 500 ng/mL).

2.4.5 Estudo da citotoxicidade da fração acetato de etila-4

O estudo da citotoxicidade da fração AcOEt-P-4 em células HL-60 consistiu em uma série de ensaios que permitiram analisar os seguintes efeitos: alterações morfológicas e na viabilidade, despolarização do potencial transmembrana mitocondrial, fragmentação de DNA e alterações do ciclo celular. As concentrações escolhidas (50 e 100 ng/mL) foram relativas a aproximadamente 0,5 e 1 vez o valor da CI_{50} (130 ng/mL, $IC_{95\%}$ 110-160 ng/mL) desta fração obtida no ensaio do MTT após 72 horas.

2.4.5.1 Alterações na morfologia e viabilidade

Foram evidenciadas importantes alterações morfológicas nas células HL-60 coradas com HE após 24 horas de tratamento. As células não tratadas apresentaram em sua maioria normais com núcleos homogêneos e volumosos, membrana plasmática regular e íntegra e pequenos vacúolos presentes no citoplasma (Fig. 24A). A maior parte das células tratadas com Dox estava com volume reduzido e núcleo fragmentado (Fig. 24B). O tratamento com a fração AcOEt-P-4 induziu *blebbings* na membrana plasmática, redução do volume celular e fragmentação de DNA (Fig. 24C e D), alterações compatíveis com as de morte por apoptose.

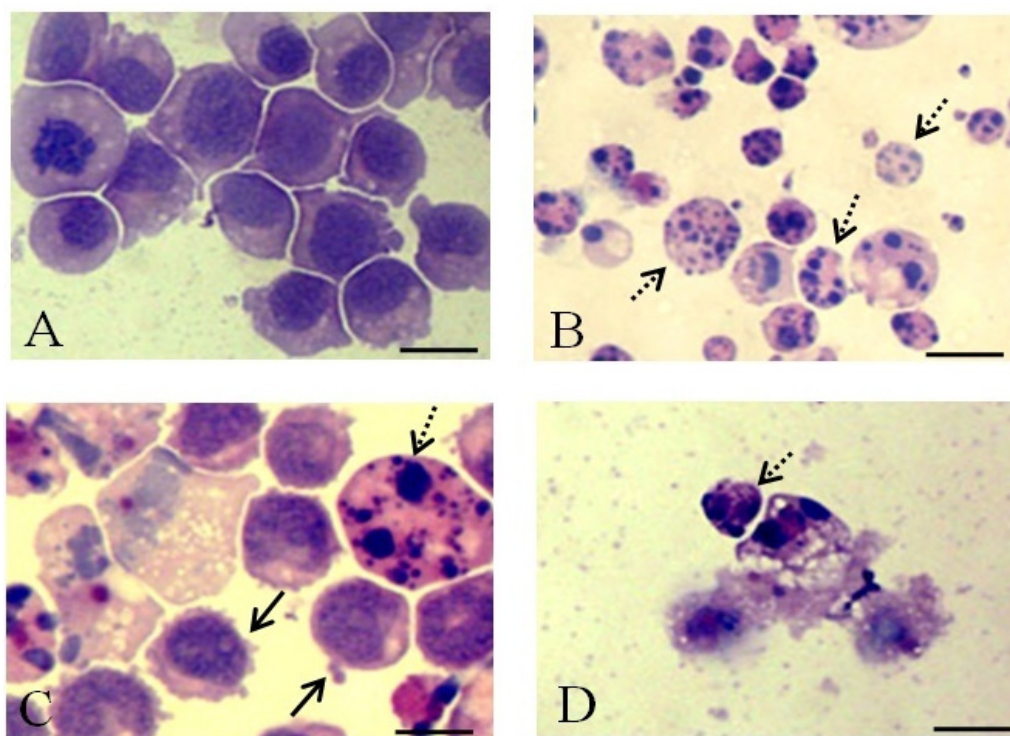


Figura 24. Alterações morfológicas em células HL-60 sem tratamento (A) ou tratadas com 300 ng/mL de doxorubicina (B), ou com 50 e 100 ng/mL da fração AcOEt-P-4 (C e D respectivamente), após 24 horas de incubação. Setas: pontilhada, fragmentação de DNA; inteira, *blebbing* na membrana plasmática. Coloração com hematoxilina e eosina. Aumento: 400X. Escala: 30 μ M.

Os tratamentos de 24 horas das células HL-60 com Dox e a fração AcOEt-P-4 também alteraram as características de espalhamento da luz na citometria de fluxo (Fig. 25). A Dox e a fração AcOEt-P-4 aumentaram a porcentagem de células com volume reduzido na

região R2. Com 50 ng/mL, a fração AcOEt-P-4 aumentou de 7% (sem tratamento) para aproximadamente 25% o número de células com redução do volume e para 65% com o tratamentos de 100 ng/mL desta fração ou da Dox a 300 ng/mL (Fig. 26).

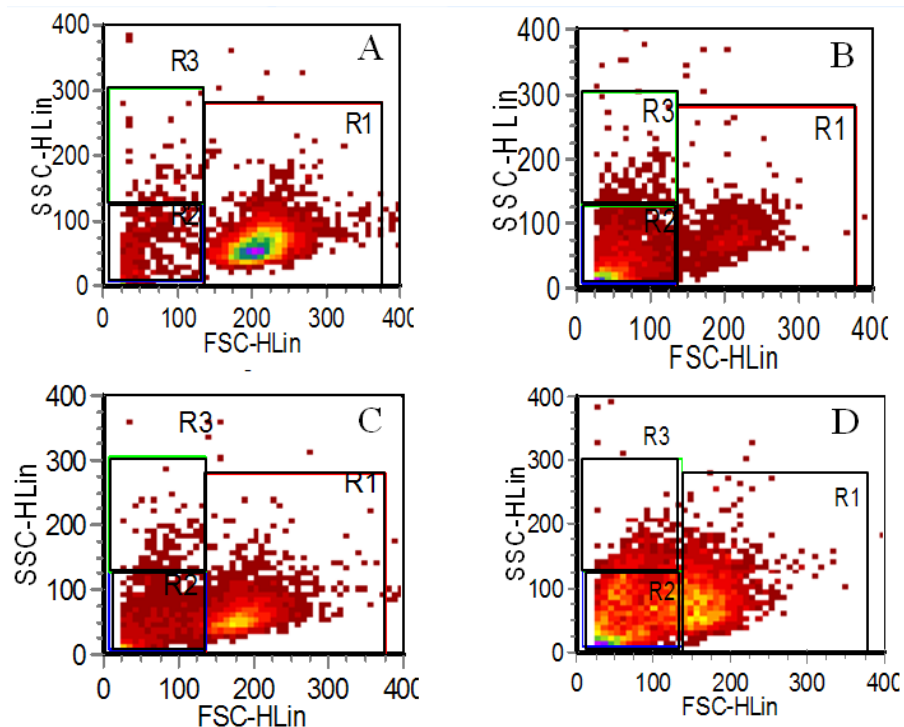


Figura 25 – Espalhamento frontal da luz (FSC-Linear) e lateral (SSC-Linear) de células HL-60 sem tratamento (A) ou tratadas com 300 ng/mL de doxorubicina (B), ou com 50 e 100 ng/mL da fração AcOEt-P-4 (C e D respectivamente), após 24 horas de incubação. R1, região correspondente a células com tamanho normal; R2, região de células com volume reduzido e R3, região de células com condensação da cromatina. Os gráficos apresentados são representativos dos resultados.

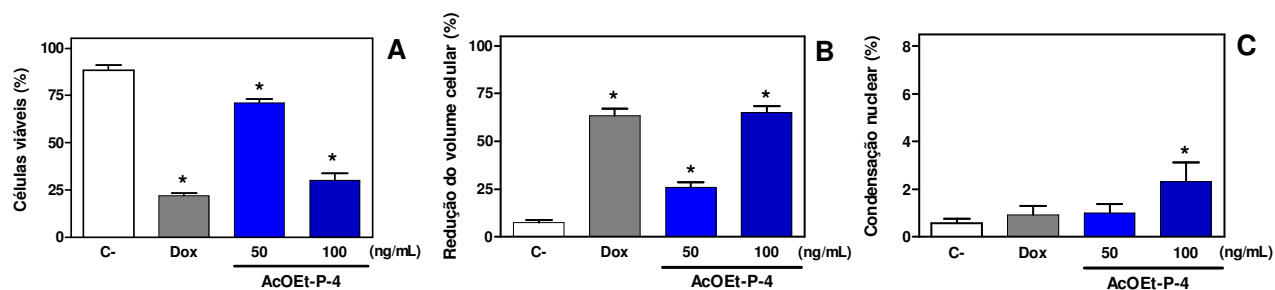


Figura 26 – Alterações morfológicas das células HL-60 sem tratamento (C-) ou tratadas com 300 ng/mL de doxorubicina (Dox) ou com 50 e 100 ng/mL da fração AcOEt-P-4 analisadas por citometria de fluxo após 24 horas de incubação. A, porcentagem de células com tamanho normal contada em R1, B, porcentagem de células com volume reduzido contada em R2 e C, porcentagem de células com condensação nuclear contada em R3. Cinco mil eventos/replicata foram obtidos de 3 experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,01$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de Dunnet.

Como apresentado na figura 27A, a fração AcOEt-P-4 diminuiu a concentração das células em nas concentrações testadas (50 e 100 ng/mL). A doxorubicina a 300 ng/mL também reduziu a contagem das células. A fração AcOEt-P-4 não alterou significativamente a integridade da membrana celular 50 ng/mL, mas aproximadamente 30% das células tratadas com 100 ng/mL perderam a integridade da membrana (Fig. 27B). A Dox não alterou a porcentagem de células com a membrana íntegra.

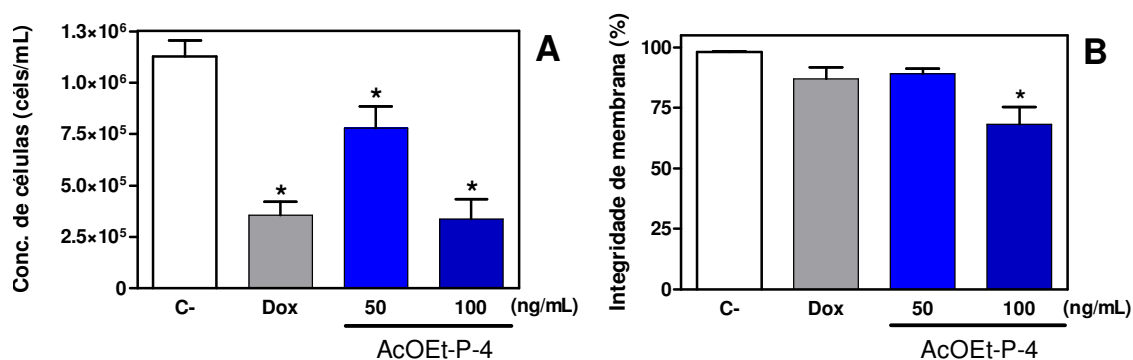


Figura 27 – Viabilidade celular. Alterações da concentração de células viáveis (A) ou da integridade da membrana plasmática (B) das células HL-60 sem tratamento (C-) ou tratadas com 300 ng/mL de doxorubicina (Dox) ou com a 50 e 100 ng/mL da fração AcOEt-P-4 analisadas por citometria de fluxo após 24 horas de incubação. Cinco mil eventos/replicata foram obtidos de 3 experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,01$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de Dunnet.

2.4.5.2 Despolarização do potencial transmembrana mitocondrial

O tratamento com a fração AcOEt-P-4 diminuiu significativamente o $\Delta\Psi_m$ das células HL-60 (Fig. 28). A porcentagem de células com o $\Delta\Psi_m$ despolarizado aumentou de 7,5% do controle negativo para aproximadamente 35 e 45 % nas concentrações de 50 e 100 ng/mL respectivamente. A Dox aumentou a despolarização do $\Delta\Psi_m$ para aproximadamente 60%.

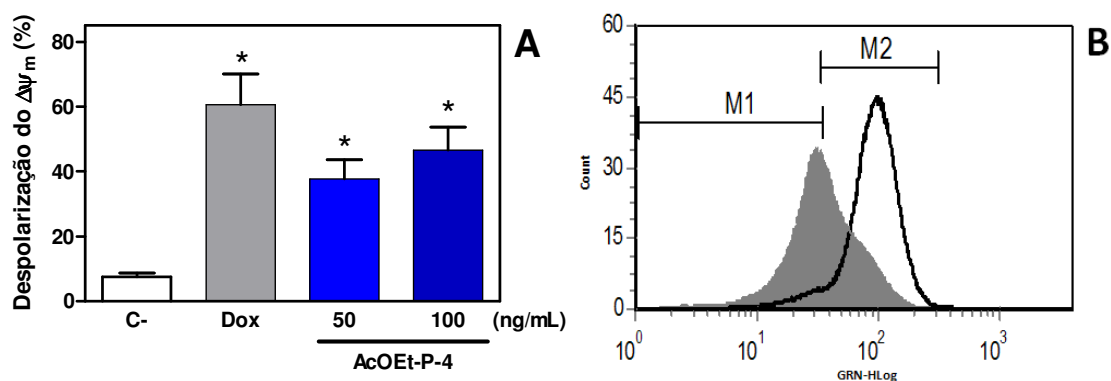


Figura 28 – Potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). **A**, porcentagem de despolarização de células HL-60 sem tratamento (C-) ou tratadas com doxorrubicina a 300 ng/mL (Dox) ou com 50 e 100 ng/mL da fração AcOEt-P-4 analisadas por citometria de fluxo após 24 horas de incubação. **B**, histograma (fluorescência verde em escala logarítmica) representativo dos experimentos comparando o $\Delta\Psi_m$ do C- (linha) e do tratamento de 100 ng/mL da fração AcOEt-P-4 (cinza). Cinco mil eventos/replicata foram obtidos de 3 experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,01$ comparado com o controle negativo por Teste t não pareado.

2.4.5.3 Fragmentação de DNA

A fração AcOEt-P-4 causou fragmentação do DNA quando avaliada por CF após 24 horas (Fig. 29). A porcentagem de DNA sub-G0/G1, considerado fragmentado, aumentou de 2% do controle negativo para aproximadamente 15 e 50% nas concentrações de 50 e 100 ng/mL. A Dox aumentou a fragmentação do DNA para quase 60%.

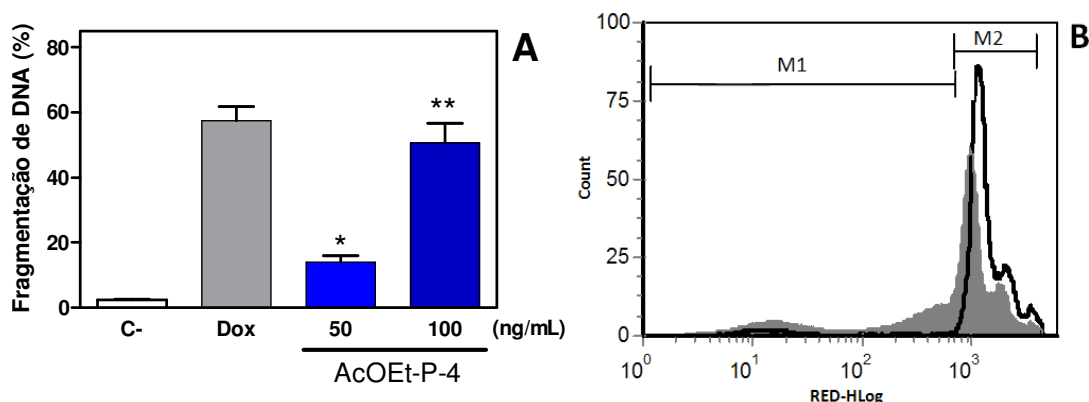


Figura 29 – Fragmentação de DNA. **A**, porcentagem de DNA sub-G0/G1 das células HL-60 sem tratamento (C-) ou tratadas com 300 ng/mL de doxorubicina (Dox) ou com 50 e 100 ng/mL da fração AcOEt-P-4 analisadas por citometria de fluxo após 24 horas de incubação. **B**, histograma (fluorescência vermelha em escala logarítima) representativo dos experimentos comparando o conteúdo de DNA fragmentado do C- (linha) e do tratamento de 100 ng/mL da AcOEt-P-4 (cinza). Cinco mil eventos/replicata foram obtidos de 3 experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ comparado com o controle negativo por Teste t não pareado.

2.4.5.4 Análise do ciclo celular

A análise do ciclo celular revelou não haver alteração em nenhuma das fases: G0/G1, S ou G2/M (dados não apresentados).

2.4.5.5 Resumo dos resultados

Os resultados obtidos no estudo da citotoxicidade da fração AcOEt-P-4 nas concentrações de 50 e 100 ng/mL em células HL-60 após 24 horas de incubação estão resumidos da figura 30. Quando os resultados são analisados simultaneamente, observa-se que as células apresentaram diversas características compatíveis com apoptose incluindo a participação da via intrínseca no processo.

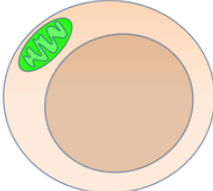


Características das células	Controle negativo	AcOEt-P-4	
		50 ng/mL	100 ng/mL
Membrana rompida	-	-	+
<i>Blebbings</i>	-	+	+
Redução do volume celular	-	+	+
$\Delta\psi_m$ despolarizado	-	+	+
DNA fragmentado	-	+	+
Representação das características celulares estudadas			

Figura 30 – Resumo das alterações induzidas pela fração AcOEt-P-4 em células HL-60 após 24 horas de incubação. As figuras das células são representativas da reunião das características encontradas na análise de alterações morfológica e diferentes ensaios por citometria de fluxo. As células tratadas com a fração AcOEt-P-4 apresentaram características de morte por apoptose nas duas concentrações testadas (50 e 100 ng/mL).

2.5. Discussão

O desenho experimental do presente trabalho incluiu uma etapa inicial de avaliação da atividade citotóxica do extrato hidroalcoólico do zoantídeo *Protopalpythoa variabilis* e suas partições para averiguação da possível presença de substâncias antitumorais, seguida do fracionamento bioguiado das frações ativas e estudo da citotoxicidade. De acordo com vários autores, esse tipo de abordagem maximiza e acelera o processo de isolamento e caracterização de novos protótipos com atividade biológica interessante (BUGNI *et al.*, 2008a; BUGNI *et al.*, 2008b; HARVEY, 2008). O NCI-USA possui o maior programa de triagem de amostras para o potencial anticâncer do mundo e considera ativos os extratos com CI_{50} de até 30 $\mu\text{g/mL}$ (SUFFNESS e PEZZUTO, 1991). Para substâncias puras, esse valor de referência cai para 4 $\mu\text{g/mL}$ (FÁVARO *et al.*, 2004). O EHB exibiu valores de CI_{50} variando de aproximadamente 0,4 a 4 $\mu\text{g/mL}$ nas linhagens tumorais testadas (Tabela 1) e, portanto pode ser considerado bastante promissor para prosseguir os estudos de purificação de compostos citotóxicos com potencial anticâncer.

A partição líquido/líquido do EHB adicionado de MeOH com solventes orgânicos em crescentes de polaridade rendeu 4 frações batizadas de acordo com o solvente em que foram solúveis: Hex, DCM, AcOEt e MeOH/H₂O. Todas as frações obtidas da partição foram citotóxicas e apresentaram valores de CI_{50} médios nas linhagens testadas de 0,34; 3,46; 2,12 e 0,43 $\mu\text{g/mL}$ para as frações Hex, DCM, AcOEt e MeOH/H₂O respectivamente (Tabela 1), ressaltando a presença de substâncias ativas com diferentes polaridades.

O potencial hemolítico do EHB e sub-frações foi avaliado após 1 hora para saber se a atividade citotóxica estava relacionada à danos diretos a membrana plasmática e observou-se que nenhuma das amostras lisou as hemácias de camundongos até 500 $\mu\text{g/mL}$ nesse tempo de incubação. Os zoantídeos são o grupo de animais onde mais comumente se encontra PTX, portanto tempos maiores de incubação de 2 e 4 horas foram utilizados posteriormente para investigar a presença de PTX ou compostos relacionados, visto que essa toxina exhibe um perfil de hemólise característico sendo deflagrada após um período de latência de pelo menos 2 horas (HABERMANN *et al.*, 1981; MOORE e SCHEUER, 1971; ONUMA *et al.*, 1999).

O EHB apresentou CE_{50} de 68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ após 4 horas, e dentre as frações, apenas a fração MeOH/H₂O exibiu CE_{50} de 213 e 117 $\mu\text{g}/\text{mL}$ após 2 e 4 horas de incubação respectivamente. A PTX é uma molécula de alta polaridade, portanto é compreensível que a esse perfil de atividade hemolítica tenha sido encontrado apenas na fração mais polar (MeOH/H₂O). Embora altamente citotóxica, perdeu-se o interesse em purificar a fração MeOH/H₂O devido a suposta presença de PTX nessa fração, pois esta toxina já foi exaustivamente estudada em modelos biológicos inclusive utilizando células tumorais e teve seu mecanismo de ação esclarecido (FRELIN e VAN RENTERGHEM, 1995; HABERMANN *et al.*, 1981; ISHIDA *et al.*, 1983; KAN *et al.*, 2001; OKU *et al.*, 2004; TOSTESON *et al.*, 1991; JHA e ZI-RONG, 2004).

Por outro lado, a fração Hex foi a mais citotóxica das frações, não causou hemólise e ainda apresentou o maior rendimento. Sozinha a Hex respondeu por 61,5 % do rendimento de todas as frações, contra apenas 1,5 % da MeOH/H₂O, a segunda fração mais potente, mas com forte sugestão da presença de PTX o que explica, pelo menos em parte, sua alta potência. A AcOEt também apresentou alto rendimento, equivalente a 30% da soma das massas das frações e uma média de valores de CI_{50} mais baixa que a DCM. As frações Hex e AcOEt foram escolhidas para continuar a purificação guiada pela citotoxicidade devido a soma de fatores favoráveis apresentados: ausência de atividade hemolítica e altos rendimento e citotoxicidade. Os resultados de citotoxicidade nas linhagens tumorais utilizando o ensaio do MTT passaram a ser deste momento em diante o único critério para decidir com quais frações continuar a purificação.

Do fracionamento da fração Hex chegou-se ao isolamento de 2 α -aminoácidos lipídicos (**1a/1b**) em mistura. Na literatura os α -aminoácidos lipídicos (AALs) são descritos como aminoácidos não naturais de cadeia alifática longa saturada ou insaturada, que, embora lipofílicos possuem comportamento polar característico de aminoácidos e peptídeos (ROBERTS e VELLACCIO, 1983; KOKOTOS *et al.*, 1996b). Os compostos **1a/1b** são o primeiro relato de AALs encontrados a partir de uma fonte natural e também possuem cadeia lateral alifática maior que os AALs sintéticos. Enquanto os AALs descritos possuem de 8 a 24 átomos de carbono na molécula, os **1a/1b** possuem 30 e 31 átomos de carbono (KOKOTOS *et al.*, 1996b).

Os AALs têm utilização diversa na indústria desde lubrificantes e polidores a cosméticos (TAKINO *et al.*, 1987; KITAMURA *et al.*, 1987; SAGAWA e TAKEHARA,

1987b; SAGAWA e TAKEHARA, 1987a). Eles também são biologicamente ativos. Em estudos estrutura-atividade, foi sugerido o potencial antiinflamatório de diversos análogos desses compostos devido a sua capacidade de inibição da fosfolipase A₂ (KOKOTOS *et al.*, 1996a; NICOLAOU *et al.*, 1995; NOULA *et al.*, 1996; NICOLAOU *et al.*, 1997). Tem sido mostrado que os AALs e seus oligômeros servem como sistemas de *drug delivery* e sistemas lipídico-peptídicos como adjuvantes e em sistemas carreadores de vacinas (TOTH, 1994; TOTH *et al.*, 1993).

Alguns estudos demonstraram que os AALs são biologicamente úteis, porém a natureza tóxica desses compostos nunca foi investigada (KOKOTOS *et al.*, 1996a; NICOLAOU *et al.*, 1997; NICOLAOU *et al.*, 1995; NOULA *et al.*, 1996; TOTH, 1994; TOTH *et al.*, 1993). Levando em consideração a potente atividade citotóxica de **1a/1b**, com CI₅₀ média de aproximadamente 85 ng/mL em células tumorais, considerou-se de grande relevância estudar os efeitos citotóxicos desses compostos. A linhagem HL-60 foi escolhida para realização dos experimentos seguintes em concentrações relativas à 0,2; 0,5 e 1 vez o valor da CI₅₀ destes compostos obtida pelo ensaio do MTT após 24 horas. O modelo para investigação da citotoxicidade dos **1a/1b** consistiu em uma série de ensaios que permitiram analisar alterações morfológicas, viabilidade, potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), fragmentação de DNA e alterações do ciclo celular.

Em estudos *in vitro*, observa-se que a membrana celular permanece intacta nos estágios iniciais até intermediários da apoptose, sofrendo ruptura apenas em estágio avançado chamado apoptose tardia. Por outro lado, a membrana das células necróticas se rompe logo no início do processo (LOS *et al.*, 2003). Para avaliar o dano à membrana plasmática, dois ensaios foram realizados. Um deles serviu para avaliar se a citotoxicidade estava relacionada à um dano inespecífico na membrana utilizando uma célula mais simples, sem núcleo, por um tempo curto (1-4 horas) e altas concentrações (1,56- 200 µg/mL). O outro permitiu observar células morrendo por necrose ou apoptose tardia. Para este segundo teste, utilizou-se a linhagem leucêmica HL-60 tratada por 24 horas com concentrações escolhidas para a série de ensaios citotóxicos (100, 250 e 500 ng/mL).

A apoptose é um processo fisiológico essencial para manter a homeostase em organismos multicelulares e a sua evasão é um importante fator relacionado ao crescimento tumoral. A morte por apoptose é considerada a melhor forma de eliminar células indesejadas e a sua indução é uma estratégia bastante importante na quimioterapia do câncer (KRESSEL

e GROSCURTH, 1994). As células em apoptose apresentam alterações morfológicas características tais como redução do volume celular devido à desidratação e alterações na membrana, chamados *blebbings* devido ao colapso do citoesqueleto. Outras características marcantes são observadas no núcleo como a condensação periférica da cromatina em estágios iniciais e a fragmentação internucleossomal do DNA em múltiplos de 180 a 200 pares de bases mais tardiamente (KERR, 2002; KRESSEL e GROSCURTH, 1994).

O tratamento com **1a/1b** diminuiu a concentração de células de forma dose-dependente, diferindo das células do controle ($p < 0,05$) nas concentrações intermediária e mais alta (250 e 500 ng/mL). As células HL-60 tratadas com 100 e 250 ng/mL de **1a/1b** apresentaram condensação periférica regular da cromatina em forma de meia-lua ou anel bem como *blebbings*. Na concentração de 500 ng/mL a quantidade de células nas lâminas era pequena, mas foi possível observar que a maioria estava com a membrana rompida e núcleo fragmentado. De forma complementar, as alterações morfológicas foram quantificadas por CF onde foi possível observar um aumento ($p < 0,05$) da porcentagem de células com volume reduzido em detrimento da diminuição das células com morfologia normal.

A mitocôndria desempenha um papel central na sobrevivência celular e morte por apoptose. Os processos são finamente regulados por proteínas da família Bcl-2 pró e anti-apoptóticas (MAYER e OBERBAUER, 2003). O ponto sem retorno da apoptose é marcado pela dissipação do $\Delta\psi_m$, uma é consequência do aumento da permeabilidade da membrana externa devido à formação de poros que por sua vez permitem a saída de fatores chave (p. ex. citocromo c e smac diablo) para indução de apoptose. Notadamente a redução do $\Delta\psi_m$ é um dos eventos mais iniciais na apoptose induzida pela via intrínseca (RAVAGNAN *et al.*, 2002). Foi observado que em todos os tratamentos com **1a/1b** houve aumento da porcentagem de células com $\Delta\psi_m$ despolarizado.

A quantificação da fragmentação de DNA foi a última característica de apoptose avaliada. Esse fenômeno é consequência da atividade endonuclease de caspases (p. ex caspases 3 e 7) que clivam a dupla-fita de DNA ou de outras nucleases, como a endonuclease G, que agem na apoptose caspase independente (JÄNICKE *et al.*, 1998; KRESSEL e GROSCURTH, 1994). As células do controle negativo e tratadas com 100 ng/mL de **1a/1b** apresentaram fragmentação de DNA mínima, enquanto os tratamentos com 250 e 500 ng/mL de **1a/1b** induziu aumento da porcentagem de fragmentação de DNA.

As concentrações crescentes de tratamento (100, 250 e 500 ng/mL) com **1a/1b** permitiu observar características de apoptose de diferentes estágios. Na menor concentração, características típicas de apoptose inicial como condensação periférica da cromatina e despolarização do $\Delta\psi_m$; na concentração intermediária, a manifestação adicional de mais outras diversas características de apoptose como redução do volume celular, fragmentação de DNA e *blebbing* e na maior concentração, além da intensificação de todas as características citadas, também se pode observar perda da integridade da membrana que, nesse contexto, indica ser relativo a apoptose tardia.

Dada a ausência de estudos prévios acerca da citotoxicidade de AALs fica impraticável comparar esses achados com outros da mesma classe química. Entretanto, como demonstrado na figura 31, os AALs compartilham características estruturais importantes com os esfingolípídeos, uma classe de lipídeos que contêm um grupo amida ligado a uma longa cadeia alifática. Os esfingolípídeos são componentes estruturais das membranas celulares, mas também têm importante função de sinalizadores de respostas como morte celular, diferenciação e certos tipos de inflamação (HUWILER e ZANGEMEISTER-WITTKKE, 2007).

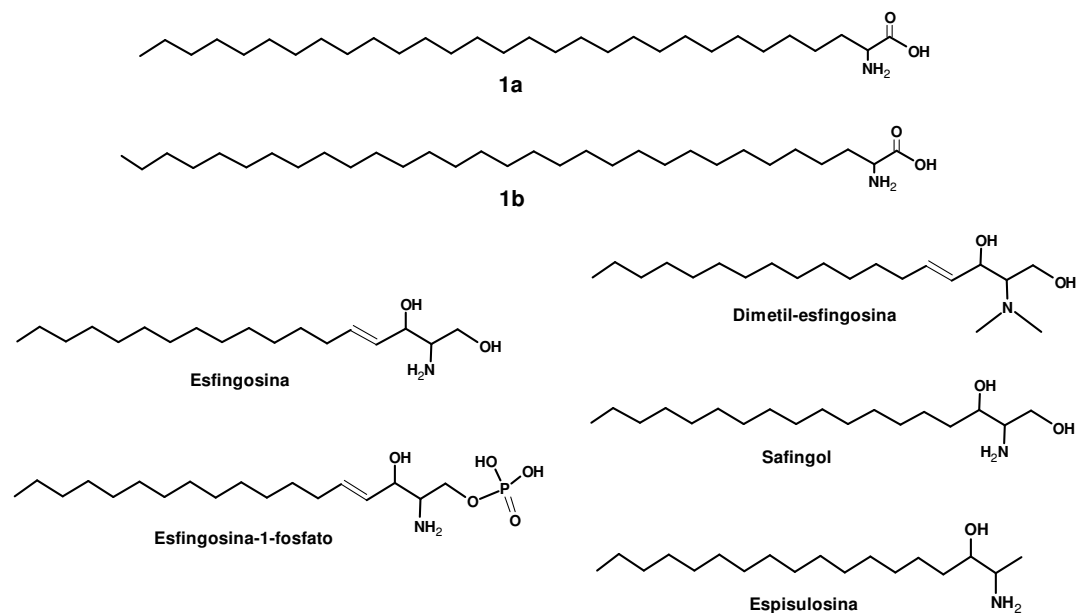


Figura 31 – Estruturas químicas dos aminoácidos lipídicos 1a e 1b isolados de *P. variabilis*, dos esfingolípídeos esfingosina e esfingosina-1-fosfato e dos inibidores da esfingosina quinase safingol, dimetil-esfingosina e episulosina.

Estudos revelaram que o balanço entre as concentrações intracelulares de esfingosina (EF) e esfingosina-1-fosfato (EF1P) é de fundamental importância para sobrevivência e proliferação celular. De fato o balanço favorável à EF1P estimula a sobrevivência e proliferação celular e resistência de tumores a quimio e radioterapia, enquanto que as concentrações discretamente aumentadas de EF iniciam apoptose (HUWILER e ZANGEMEISTER-WITTKE, 2007). A esfingosina quinase (EFQ) é responsável pela conversão de EF a EF1P e sua inibição tem como consequência o acúmulo de EF. Recentemente foi encontrado que as células de vários tipos de tumores apresentam a expressão aumentada de mRNA da EFQ em relação às células saudáveis (FRENCH *et al.*, 2003). Em 2003 Cuvillier e Leva-de reuniram em uma revisão relatos da citotoxicidade de inibidores de EFQ como a dimetil-esfingosina, dihidro-esfingosina e trimetil-esfingosina contra um grande número de linhagens tumorais (CUVILLIER e LEVADE, 2003). Devido a essas descobertas, vem crescendo o interesse de se estudar o impacto dos inibidores de EFQ como intervenção adjuvante no tratamento de cânceres resistentes (HUWILER e ZANGEMEISTER-WITTKE, 2007).

Ohta e colaboradores demonstraram que altos níveis de EF induz apoptose em células HL-60 através da regulação negativa do *c-myc* (uma proteína relacionada à via intrínseca) seguida da fragmentação de DNA (OHTA *et al.*, 1995). Em 1996, Sakakura e colaboradores também demonstraram em HL-60 que a apoptose induzida por EF está relacionada à supressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (SAKAKURA *et al.*, 1996). A EF também afeta a ativação de caspases da via intrínseca através da diminuição da expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, favorecendo à clivagem proteolítica das proteínas pró-apoptóticas Bid e Bax, ou suprimindo a Akt quinase (NAVA *et al.*, 2000; CUVILLIER *et al.*, 2000; CUVILLIER e LEVADE, 2001).

Outros lisofosfolídeos alifáticos, chamados de derivados da esfingosina, como o safingol ou o composto marinho episulosina também possuem estrutura parecida com a dos AALs e da EF (Fig. 31). A episulosina está em fase 1 de estudos clínicos para o câncer sob investimento da PharmaMar (PHARMAMAR, 2008). Ela age no metabolismo dos esfingolipídeos, porém por uma via apoptótica atípica quando comparada às vias dependentes de EF, possivelmente como antagonista do ácido lisofosfatídico e ativando a proteína quinase C ζ (SALCEDO *et al.*, 2006; SÁNCHEZ *et al.*, 2008).

Tendo em vista a similaridade da estrutura dos AALs com os esfingolipídeos e importante participação da mitocôndria na indução da apoptose, estudos adicionais para investigar se os **1a/1b** agem inibindo o metabolismo dos esfingolipídeos, parece ser uma boa escolha para esclarecer a via da apoptose induzida por **1a/1b** aqui descrita.

Um grande problema enfrentado no estudo de produtos naturais marinhos além da toxicidade é o suprimento de quantidades suficientes para prosseguir os estudos. O baixo rendimento dos compostos ativos e dificuldade em sintetizá-los devido à complexidade estrutural é um importante gargalo da progressão dos estudos de muitos compostos promissores. Extratos brutos de vários kilogramas com rendimentos de poucos miligramas de moléculas bioativas são bastante comuns (HUNT e VINCENT, 2006; NEWMAN e CRAGG, 2004).

Esse problema pode ser representado pelo caso dramático da briostatina 1. Atualmente já se contam mais de 80 estudos clínicos para tratamento do câncer com essa molécula sendo obtida diretamente do briozoário *Bugula neritina*. Para a realização dos estudos clínicos, foram coletadas 13 Ton do animal que renderam apenas 18 g de briostatina 1 (NEWMAN e CRAGG, 2004; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009). Obviamente esse composto não terá como ser comercializado a partir da fonte natural e essa também não é a estratégia adequada para utilização sustentável de nenhum produto natural marinho. Para este e outros casos, diversos esforços vêm sendo feitos para contornar o fator limitante da quantidade de molécula como simplificação estrutural visando a obtenção de análogos de potência semelhante, porém de síntese viável, cultivo do organismo para não depender das espécies selvagens e ainda investigação da possibilidade de obtenção dos compostos a partir de microorganismos simbioses (WENDER *et al.*, 2004; DAVIDSON e HAYGOOD, 1999; MENDOLA, 2003)

O presente trabalho também ilustra a dificuldade de obtenção dos compostos em quantidade apreciável. A partir de 11 kg de colônias dos zoantídeos foram obtidos apenas 26,7 mg de **1a/1b** da fração Hex e 2,2 mg da fração AcOEt-P-4 da fração AcOEt onde não foi possível identificar as estruturas presentes devido à quantidade deveras pequena. É pertinente expor estes problemas para ressaltar claramente um ponto bastante favorável para a utilização futura, em estudos *in vivo* ou mesmo em estudos clínicos, de forma viável dos compostos **1a** e/ou **1b**. O ponto crucial é que o descobrimento do potencial citotóxico desses compostos se deu posteriormente a solução do seu suprimento através da síntese química.

Embora **1a/1b** sejam inéditos, a síntese de AALs e análogos com cadeia alifática menor, já são bem estabelecidas o que facilita sua obtenção em maior quantidade (ROBERTS e VELLACCIO, 1983). Finalmente, a descrição de indução de apoptose dos **1a/1b** com participação da mitocôndria somada à semelhança dos AALs com os inibidores de esfingosina quinase, desperta o interesse para investigação potencial dos AALs como moduladores do metabolismo dos esfingolípídeos.

O fracionamento da fração AcOEt rendeu 5 frações citotóxicas (AcOEt-P-1 a AcOEt-5) com perfil espectral compatível com compostos esteroidais. De fato, os invertebrados marinhos são considerados uma rica fonte de esteróides complexos (BLUNT *et al.*, 2007). Como exemplo, o fracionamento guiado pela citotoxicidade do coral mole *Nephthea erecta* rendeu o isolamento de 6 esteróides citotóxicos, sendo dois inéditos (24-metil-colesta-5,24(28)-dieno-3 β -15 β ,19-triol e 24-metil-colesta-5,24(28)-dieno-3 β -19-diol-7-ona) e quatro de estruturas conhecidas porém que a citotoxicidade não havia sido investigada (DUH *et al.*, 1998).

Esteróides são compostos comuns em zoantídeos, alguns exemplos são o palisterol isolado do zoantídeo *Palythoa mammilosa*, os 24 β -metilcolesta-5,22-dien-3 β -ol, colest-5-en-3 β -ol, 24-metil-colest-5-en-3 β -ol e colesta-5,24-metileno(28)-dien-3 β -ol do *Zoanthus confertus* e os 24 β -metilcolest-5-en-3 β -ol, 24 β -metilcolesta-5, 22-dien-3 β -ol, e 24-etilcolest-5-en-3 β -ol das espécies *Palythoa tuberculosa* e *P. mammilosa* (BERGMANN *et al.*, 1951; GUPTA e SCHEUER, 1968). O 24-metileno colesterol foi encontrado majoritariamente no *Protopalythoa variabilis*, assim como o kalinasterol o foi no *Zoanthus proteus* e os campesterol e di-hidrobrassicasterol foram em *Palythoa dartevellei*, *Palythoa monodi* e *Palythoa senegalensis* (DIOP *et al.*, 1986).

Tem-se demonstrado uma variedade de atividades farmacológicas como, anti-inflamatória, antimicrobiana, ictiotóxica, anti-incrustante e citotóxica de esteróides obtidos de organismos marinhos (BLUNT *et al.*, 2007; MARINLIT, 2009). Ionannou e colaboradores isolaram doze 5- α ,8 α -epidioxiesteróis a partir da gorgônia *eunicella cavolini* e da ascídia *Trididemnum inarmatum* que, segundo os autores, a dedicação para isolamento desses esteróides foi motivada pelo perfil de esteróides complexos encontrados nos espectro de RMN dos extratos brutos que adicionalmente apresentaram atividade citotóxica contra quatro linhagens de células tumorais (IOANNOU *et al.*, 2009).

O modelo de estudo da citotoxicidade da fração AcOEt-P-4 foi semelhante ao realizado para a Hex, porém com concentrações relativas a aproximadamente 0,5 e 1 vez (50 e 100 ng/mL) o valor da CI_{50} em HL-60 obtida pelo MTT após 72 horas de incubação (Tabela 3). Assim como observado com **1a/1b**, as células HL-60 tratadas com a fração AcOEt-P-4 também apresentaram características compatíveis com apoptose.

A coloração com HE permitiu observar *blebbings* na membrana, redução do volume celular e fragmentação nuclear nas duas concentrações testadas, sendo que na concentração de 100 ng/mL de AcOEt a redução do volume celular foi mais acentuada e a quantidade de células encontrada foi menor. A quantificação das alterações morfológicas por CF demonstrou haver redução do volume celular significativamente diferente do controle negativo desde a menor concentração (25%) e aumentou bastante na maior concentração testada (65%).

A membrana das células tratadas com a fração AcOEt-P-4 permaneceu íntegra na quase totalidade das células na concentração de 50 ng/mL enquanto 30% romperam a membrana no tratamento de 100 ng/mL. Mais uma vez o rompimento da membrana na maior concentração foi compatível com células em apoptose tardia, visto que, já na menor concentração verificou-se aumento na despolarização do $\Delta\psi_m$ e fragmentação do DNA (Fig. 29). Notavelmente a porcentagem de células sofrendo despolarização do $\Delta\psi_m$ (35%) das células tratadas com 50 ng/mL foi bem superior àquela encontrada na fragmentação de DNA (15%), sugerindo um importante envolvimento da mitocôndria na apoptose induzida pela fração AcOEt-P-4. Na concentração de 100 ng/mL esses valores foram semelhantes.

Diversos esteróides com atividade citotóxica foram isolados de organismos marinhos incluindo cnidários, ascídias e algas marinhas, mas a maioria deles foi obtida de esponjas (DUH *et al.*, 1998; IOANNOU *et al.*, 2009; SHEU *et al.*, 1999; SHEU *et al.*, 1997; KTARI e GUYOT, 1999; XU *et al.*, 2008; SANTAFE *et al.*, 2002; MANSOOR *et al.*, 2006; MANSOOR *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2007; FUNEL *et al.*, 2004; BOONLARPPRADAB e FAULKNER, 2007). Apesar do considerável número de estruturas elucidadas, os trabalhos existentes com esteróides de fontes marinhas se limitam ao estudo do potencial citotóxico em células tumorais através de ensaios antiproliferativos e não aprofundam a caracterização da citotoxicidade ou mecanismo de ação dos mesmos.

2.6 Conclusões

- O zoantídeo *Protopalythoa variabilis* da costa cearense é fonte de compostos citotóxicos;
- O fracionamento guiado pela atividade citotóxica da fração Hex rendeu o isolamento de dois α -aminoácidos lipídicos (**1a/1b**) em mistura com estruturas inéditas;
- O fracionamento guiado pela citotoxicidade da fração AcOEt resultou em cinco frações muito potentes com estruturas dos compostos majoritários semelhantes à esteróides;
- O estudo da atividade biológica dos compostos **1a/1b** e da fração AcOEt-P-4 revelou que a citotoxicidade é devida a indução de apoptose onde a via intrínseca mitocondrial tem grande importância.

3 CAPÍTULO II

ESTUDO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO ZOANTÍDEO *Protopalythoa variabilis*

3.1 Introdução

Os agentes modificadores da resposta biológica podem estimular ou inibir a resposta imune, sendo então chamados imunopotenciadores ou imunossuppressores respectivamente (RIHOVA, 2002). A imunopotenciação é um processo que pode estimular a maturação, diferenciação ou proliferação das células envolvidas diretamente nos mecanismos de defesa. Extratos biológicos brutos ou semi-purificados, substâncias de origem natural, citocinas e imunoglobulinas com um alto perfil de purificação têm sido utilizados como agentes imunopotencializadores (RIHOVA, 2002). As principais células efetoras do sistema imune que eliminam potencialmente células perigosas, infectadas e neoplásicas, são M ϕ ativados, células assassinas naturais (NK, do inglês *natural killers*), linfócitos T citotóxicos (CTL, do inglês *Cytotoxic T Lymphocytes*) e *killers* ativados por linfocinas (LAK, do inglês *Lymphokine-Activated Killers*) (RIHOVA, 2002).

Os polissacarídeos (PS) naturais são, reconhecidamente, uma fonte de agentes modificadores da resposta biológica e têm atraído considerável atenção, sobretudo, dos pesquisadores da área de saúde devido às suas propriedades terapêuticas aliadas a uma baixa toxicidade (LEUNG *et al.*, 2006; SCHEPETKIN e QUINN, 2006). Diversos estudos de caracterização dos efeitos imunomoduladores, antitumorais, antimetastáticos, anticoagulantes, relação estrutura-atividade têm sido feitos com PS isolados de bactérias, fungos, plantas, algas e invertebrados marinhos (TZIANABOS, 2000; POMIN e MOURÃO, 2008; LEUNG *et al.*, 2006; VLIEGENTHART, 2006).

As propriedades terapêuticas dos PS incluem atividades antiviral, antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antitumoral (LEUNG *et al.*, 2006). As propriedades antitumorais são aqui de particular importância e, nessa área, os PS vêm sendo estudados intensamente em modelos *in vivo* e *in vitro* e utilizados em associação na quimioterapia para aumentar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais (FRANZ, 1995; AKRAMIENE *et al.*, 2007; WASSER, 2002; KATOH e OOSHIRO, 2007).

Como exemplos utilizados na clínica oncológica têm-se a lentinana, a esquizofilana e a krestina (PSK, β -glucana ligada a peptídeos), isolados no Japão dos fungos *Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune* e o *Coriolus versicolor* respectivamente. O polissacaropeptídeo (PSP), isolado também do *C. versicolor* vem sendo amplamente utilizado na China como agente anticâncer e imunomodulador (OOI e LIU, 2000). A utilização desses

compostos aplica-se à radioterapia, quimioterapia, radioquimioterapia e terapia endócrina em tumores de diversas origens como mamário, cervical, colon-retal, gastrointestinal, pulmonar e prostático (LEUNG *et al.*, 2006).

Os PS são classicamente considerados antígenos independentes de células T e não induzem respostas celulares adquiridas. Os efeitos na modulação do sistema imunológico são creditados, principalmente, à ativação de M ϕ e do sistema complemento sem desenvolvimento de memória imunológica (Fig. 32) (TZIANABOS, 2000; LEUNG *et al.*, 2006). Os estudos a cerca do mecanismo de ação apontam que os PS funcionam como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) que são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRR, do inglês, *Pattern Recognition Receptors*). Os PRR potencialmente utilizados pelos PS são os receptores *toll-like* (TLR), receptores *scavenger* (SR), receptor do complemento 3 (CR3), receptor de manose (MR) e dectina-1 (SCHEPETKIN e QUINN, 2006).

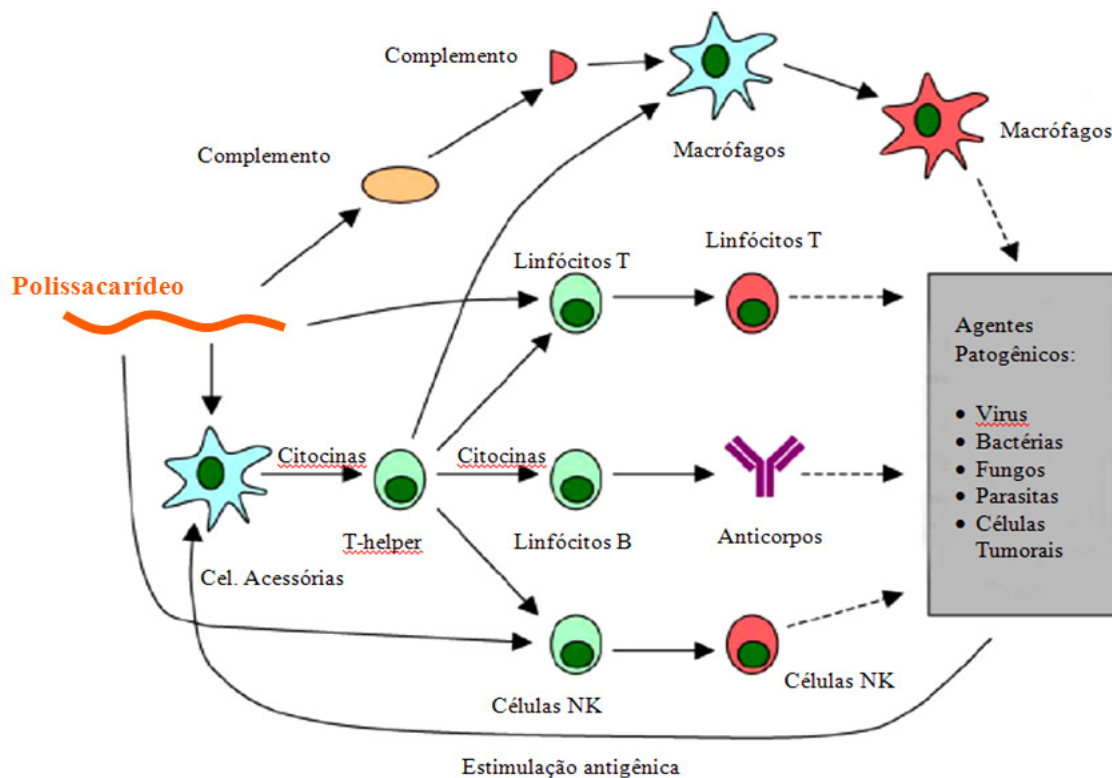


Figura 32 – Ilustração esquemática do mecanismo proposto para ativação de células imunes por polissacarídeos modificadores da resposta biológica. Modificado de Leung *et al.*, 2006.

Particularmente, esses compostos aumentam a citotoxicidade dos M ϕ contra tumores e microorganismos induzindo ativação da atividade fagocítica, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) e aumentando a produção de citocinas como: quimiocinas, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e IL-1 β , IL-6, e IL-12 e interferon- γ e - β 2 (IFN- γ e IFN- β 2) (SCHEPETKIN e QUINN, 2006).

Os efeitos imunomoduladores dos PS obtidos de microorganismos, fungos, plantas e algas foram os mais extensamente estudados, sendo que os PS derivados de fontes naturais que não as bactérias ou mesmo os PS sintéticos, são normalmente não tóxicos e, portanto mais interessantes para uso medicinal (OVODOV, 1998; SCHEPETKIN e QUINN, 2006).

Dentre os invertebrados marinhos, os equinodermos, tunicados e moluscos compõem, em número, um modesto, embora promissor grupo com estudos sobre a atividade biológica dos seus PS (POMIN e MOURÃO, 2008). Como já mencionado na introdução geral, o potencial antitumoral, antimetastático e anticoagulante de PS dos grupos tunicata e equinodermata já foram demonstrados (MOURÃO *et al.*, 1996; PAVÃO *et al.*, 1998; TAPON-BRETAUDIERE *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2007).

Na medicina tradicional chinesa, utilizam-se as gônadas de ouriço-do-mar na alimentação com o objetivo de melhorar a imunidade e prevenir doenças cardio-vasculares (LIU *et al.*, 2007). Os pepinos-do-mar foram categorizados como tônicos medicinais em vários livros antigos da medicina tradicional chinesa nas Dinastias Ming (1368 a 1644) e Qing (1644 a 1912). Também foi relatado que médicos da medicina tradicional chinesa receitaram pepinos-do-mar na alimentação como forma de tratamento de câncer, anemia aplástica e diabetes com bons resultados (LU e WANG, 2009).

Os estudos mencionados evidenciam o potencial terapêutico dos PS naturais e os ressaltam como profícua fonte para descobrimento e desenvolvimento de novos compostos com valor medicinal. Contudo nenhum estudo demonstrando os efeitos biológicos de PS obtidos de zoantídeos foi documentado, o que faz desse trabalho o pioneiro na investigação do potencial biológico dos PS desse grupo. Neste capítulo foram descritos os estudos sobre a proliferação celular, atividade antitumoral e efeitos imunomoduladores realizados com os PS isolados a partir do resíduo do EHB do zoantídeo *P. variabilis*.

3.2 Objetivos

3.2.1 Geral

- Estudar o potencial antitumoral e imunestimulante de polissacarídeos obtidos a partir do resíduo do extrato hidroalcoólico bruto do zoantídeo *Protopalythoa variabilis*.

3.2.2 Específicos

- Extrair e isolar os polissacarídeos do resíduo do extrato hidroalcoólico bruto de *P. variabilis*;

- Fazer uma caracterização química dos polissacarídeos obtidos;

- Avaliar o efeito dos polissacarídeos sobre a proliferação de linhagens de células tumorais e de cultura primária de linfócitos e macrófagos *in vitro*;

- Avaliar o potencial antitumoral dos polissacarídeos *in vivo*;

- Avaliar a toxicidade dos polissacarídeos *in vivo*;

- Avaliar o efeito dos polissacarídeos na ativação de macrófagos peritoneais de camundongos.

3.3 Métodos

3.3.1 Extração e caracterização dos polissacarídeos

Uma parte do resíduo sólido restante da extração hidroalcoólica do *P. variabilis* foi devidamente seco, triturado novamente, pesado (400 g) e submetido à extração 1:5 (massa:volume) de água (1,6 L) a 85°C por 5 horas. Após este período, a suspensão foi centrifugada e em seguida filtrada em papel para remoção do resíduo, obtendo-se um extrato límpido. O extrato foi neutralizado com solução diluída de NaOH e, em seguida, adicionou-se o extrato lentamente a etanol (EtOH) na proporção 1:5 (v/v) extrato/EtOH, sob agitação moderada, para promover a precipitação dos polissacarídeos. Por centrifugação, o precipitado foi separado do meio etanólico, lavado com acetona e em seguida seco em banho de areia a 40 °C por aproximadamente 2 horas para obtenção dos PS isolados de *P. variabilis* (PPV).

Para a caracterização química do PPV utilizou-se diferentes técnicas como Espectroscopia de absorção na região do infravermelho, RMN de ^{13}C e ^1H , Cromatografia de Permeação em Gel e análise elementar (Carlo Erba, EA1108 elemental analyser) e métodos colorimétricos como Fenol- H_2SO_4 e de Hartree. Todos os ensaios de caracterização química e interpretação dos resultados foram realizados pelas profas Dras. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo e Otília Deusdênia Loiola Pessoa do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

3.3.2 Avaliação da atividade citotóxica

O PPV foi testado em uma série de concentrações que variaram de 0,09 a 50 $\mu\text{g/mL}$ por 72 horas pelo teste do MTT como descrito no item 2.3.6 do capítulo I. Foram utilizadas cinco linhagens de células tumorais, sendo que destas, quatro linhagens humanas foram as mesmas utilizadas no fracionamento do capítulo I (HL-60, SF-295, MDA-MB-435 e HCT-8) e mais um melanoma murino (B-16). Além das linhagens, também foi investigado o efeito sobre a proliferação de $\text{M}\phi$ peritoneais nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ após 18 horas.

3.3.3 Avaliação do efeito antitumoral *in vivo* em camundongos

3.3.3.1 Manejo dos animais

A avaliação do efeito antitumoral do PPV foi realizada no modelo de melanoma B-16 em camundongos *Mus musculus* C57BL/6 machos com idade entre 6 e 8 semanas oriundos do biotério do USP de Ribeirão Preto e mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia com água e ração apropriada *ad libitum* em estante ventilada (Alesco) com ciclo claro/escuro de 12 horas. O manejo dos animais seguiu princípios éticos para amenizar ao máximo o sofrimento dos animais e o número do protocolo da Comissão de Ética em Pesquisa Animal do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC relativo a todos os procedimentos *in vivo* deste trabalho é 71/09.

3.3.3.2 Manutenção do tumor e preparação das células

A linhagem de melanoma murino B-16 (cedida pelo NCI-USA, *Bethesda, MD, USA*) utilizada neste modelo foi cultivada *in vitro* como descrito no item 2.3.6. No dia do experimento, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, se adicionou 1 mL de tripsina (0,5% contendo 0,01% de EDTA) e elas foram mantidas por 5 minutos em estufa incubadora (37°C, atmosfera de 5% de CO₂) para favorecer a soltura do plástico. Quando verificado ao microscópio óptico que todas as células estavam soltas, adicionou-se 5 mL de meio completo para inativar a tripsina e maximizar o número de células viáveis. As células foram então contadas e ressuspensas em PBS na concentração final de 2×10^6 células/mL.

3.3.3.3 Procedimento experimental

Nos animais receptores, foram injetados 2×10^6 células/0,5 mL do melanoma B-16 subcutâneo na axila esquerda. O tratamento dos animais iniciou-se 24 horas após a inoculação do tumor e foi realizado 10 dias consecutivos. Diferentes grupos de animais foram tratados com 200 µL de solução salina via intraperitoneal (IP) como controle negativo ou de PPV (25 mg/kg/animal/dia) diluído em solução salina e filtrado (22 µm) pelas vias IP ou oral (VO). Um grupo de animais saudáveis (controle normal) das duas linhagens também recebeu 200 µL de solução salina IP nos mesmos dias de tratamento que os animais com os tumores.

Para calcular os volumes, o tumor dos animais foi medido 11, 13 e 15 dias após o transplante. No 15º dia os animais foram sacrificados para retirada do tumor, rins, fígado e baço para pesagem e análise histopatológica. O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula: $IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$, sendo **A** a média dos pesos dos tumores do grupo controle negativo e **B** a média dos pesos dos tumores nos animais tratados com PPV. O grupo de animais saudáveis tratado com 200 µL de salina IP por 10 dias consecutivos foram sacrificados no mesmo dia que os animais transplantados com o tumor para comparação histopatológica dos órgãos retirados e dos parâmetros bioquímicos.

3.3.3.4 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de *n* animais. Para verificação de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por ANOVA seguida do teste Dunnet no programa GraphPad Prism. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes com o nível de significância de até 5%.

3.3.4 Análise da toxicidade

3.3.4.1 Análise histopatológica dos órgãos e tumores

3.3.4.1.1 Princípio do teste

A análise morfológica e histopatológica de tecidos dos animais tratadas permitem identificar alterações que possam estar ocorrendo e fornecer subsídios para sugerir os efeitos tóxicos causados pelo composto administrado. A técnica de coloração com HE foi utilizada novamente (descrita no item 2.3.7.1.1.) por permitir diferenciar o citoplasma do núcleo, o que possibilita a análise de algumas estruturas celulares.

3.3.4.1.2 Procedimento experimental

Os tumores e órgãos retirados foram pesados e em seguida fixados com formaldeído 10%. Para preparação das lâminas, pequenos pedaços foram seccionados com bisturi, emblocados em parafina e os blocos cortados em micrótomo. Os tecidos foram

desparafinizados em xilol e desidratados em concentrações crescentes de álcool e finalmente lavados em água destilada para remoção do álcool e coloração com HE.

3.3.4.1.3 Análise dos dados

As lâminas contendo os tecidos corados foram analisadas em microscópio óptico para avaliação das características morfológicas das células comparadas ao controle negativo. O estudo histopatológico do PPV foi realizado no Laboratório de Patológica Bucal da Universidade Federal do Ceará, sob a orientação da professora Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

3.3.4.2 Análise dos parâmetros bioquímicos

3.3.4.2.1 Princípios dos testes

Os parâmetros bioquímicos avaliados no sangue periférico permitiram observar a ocorrência ou não de dano hepático e a função renal. A alanina transaminase (ALT), também chamada transaminase glutâmica pirúvica sérica (SGPT ou TGP) ou alanina aminotransferase (ALAT), é uma enzima presente nos hepatócitos (células do fígado). A ALT é detectada no sangue quando as células hepáticas sofrem danos e aumenta drasticamente em lesões hepáticas agudas. A aspartato transaminase (AST), também chamada de transaminase glutâmica oxalacética sérica (SGOT ou TGO) ou aspartato aminotransferase (ASAT), é similar à ALT e também está associada às células parenquimais do fígado. A AST aumenta no sangue quando há lesão hepática aguda, mas também está presente nas hemácias e músculos esqueléticos e cardíacos (GAW *et al.*, 2004).

A concentração plasmática de uréia foi avaliada como parâmetro da função renal. A uréia é uma substância que provém dos alimentos que contém proteínas como, por exemplo, os alimentos de origem animal, e que deve ser quase totalmente eliminada do organismo através da urina. Quando os rins estão com a sua função de filtração prejudicada, a uréia fica acumulada no sangue, provocando alterações em vários órgãos, estabelecendo a uremia (GAW *et al.*, 2004).

Nos testes bioquímicos foram avaliados as funções renais e hepáticas. Para a função renal, utilizou-se como marcador sérico a uréia e para o dano no hepatócito, avaliou-

se a atividade da ALT e da AST no soro dos animais visto que estas são enzimas intracelulares que participam do metabolismo dos AAs no hepatócito. Quando o hepatócito morre, as enzimas caem no plasma o indicando dano hepático.

3.3.4.2.2 Procedimento experimental

Para avaliar os parâmetros bioquímicos, o sangue periférico foi coletado através do plexo orbital, em tubos capilares heparinizados imediatamente antes do sacrifício. O plasma foi utilizado para avaliar a função renal e danos hepáticos. Para investigar se houve ou não dano hepático foram determinados os níveis séricos das transaminases: AST e ALT utilizando-se kits da LABTEST® sistemas para diagnostico, seguindo o método descrito pelo fabricante. A função renal foi avaliada pelo parâmetro sérico clássico da integridade renal: a uréia. Para este, também se utilizou o kit da LABTEST® sistemas para diagnostico, seguindo-se novamente o método descrito pelo fabricante.

3.3.4.2.3 Análise dos dados

Para verificação de diferenças significativas entre os grupos (n de 5 a 8) do controle negativo e animais saudáveis e tratados com PPV, os dados foram comparados por ANOVA seguida do teste Bonferroni no programa GraphPad Prism. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando o nível de significância foi no máximo 5%.

3.3.4.3. Avaliação dos parâmetros hematológicos

3.3.4.3.1 Princípio do teste

A análise dos parâmetros hematológicos consiste em uma série de provas que possibilitam a detecção de anormalidades apresentadas em certos fenômenos fisiopatológicos importantes em animais, inclusive nos homens, e que se refletem no sangue (LORENZI, 2006). Foram realizadas as seguintes provas hematológicas: dosagem de hemoglobina, contagem de plaquetas e leucócitos. A contagem diferencial leucocitária também foi realizada e foram determinados valores relativos e absolutos de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e basófilos.

3.3.4.3.2 Procedimento experimental

Imediatamente antes do sacrifício, o sangue dos animais foi coletado através do plexo orbital com capilar de vidro. Em seguida, foram adicionados 20 μL de sangue a 380 μL de solução de Turk para contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Para a contagem diferencial de leucócitos, foram lâminas feitas lâminas de esfregaço de sangue também contadas em microscópio óptico.

3.3.4.3.3 Análise dos dados

Para verificação de diferenças significativas entre os grupos (n de 5 a 8) do controle negativo e animais saudáveis e tratados com PPV, os dados foram comparados por ANOVA seguida do teste Bonferroni no programa GraphPad Prism. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando o nível de significância foi no máximo 5%.

Os estudos dos parâmetros bioquímicos e hematológicos do PPV foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Bioquímica da UFC, sob a orientação da professora Dra. Nylane Maria Nunes Alencar.

3.3.5 Estudo da atividade imunoestimulatória

Os estudos de imunoestimulação consistiram em ensaios *in vivo* em *in vitro* para demonstrar o potencial modificador da resposta imune do PPV. O ensaio de migração de neutrófilos possibilita observar o potencial imunoestimulante de um composto partindo do fundamento que a migração destas células está relacionada à liberação de citocinas e quimiocinas produzidas por outras células, sobretudo os M ϕ residentes da cavidade peritoneal quando ativadas por um antígeno. A ativação de M ϕ peritoneais foi verificada pela detecção de diferentes substâncias liberadas no meio por estas células quando ativadas, a saber, a produção de NO e das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12.

3.3.5.1 Avaliação da migração de neutrófilos *in vivo* em camundongos

3.3.5.1.1 Procedimento experimental

Em camundongos C57BL/6 entre 6 e 8 semanas foram administradas IP em 200 μ L, PPV nas doses de 5 e 25 mg/kg, 200 ng de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) como controle positivo ou apenas solução salina nos animais controle negativo. Após 4 horas os animais foram sedados e sacrificados por asfixia com éter etílico e tiveram a cavidade peritoneal lavada com 2 mL de solução salina heparinizada (5 IU). O lavado peritoneal foi recuperado com pipeta Pasteur para realização das contagens total e diferencial.

Para a contagem total, 20 μ L do lavado foi diluído em 380 μ L de uma solução de Turk (1:20 v/v) e todos os leucócitos contados em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial, as lâminas foram preparadas a partir de um volume entre 35 e 50 μ L do líquido lavado do peritônio por centrifugação (1000rpm/5minutos) e, após secagem por 1 hora a temperatura ambiente, as células foram coradas com May-Grünwald-Giemsa (descrito no item 2.3.7.1.2). Foram contadas 100 células de cada lâmina em microscópio óptico

3.3.5.1.2 Análise dos dados

A concentração total de neutrófilos foi calculada levando em consideração as porcentagens de neutrófilos em relação ao número total de leucócitos pela fórmula:

$$\frac{\bar{X} \% \text{ de neutrófilos} \times \bar{X} \text{ da concentração de leucócitos totais} \times 20}{2} = n^{\circ} \text{ de neutrófilos} \times 10^4 / \text{mL}$$

As médias e os respectivos erros padrão das médias dos números de neutrófilos foram calculadas e comparadas por ANOVA seguida do teste de Dunnet no programa GraphPad Prism. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando o nível de significância foi no máximo 5%.

3.3.5.2 Avaliação da ativação in vitro de macrófagos peritoneais de camundongos

3.3.5.2.1 Obtenção dos macrófagos peritoneais

Camundongos C57BL/6 receberam 2 mL de tioglicolato 3% envelhecido IP para estimular os M ϕ periféricos. Após três dias os animais foram sedados e sacrificados por asfixia com éter etílico, imersos em etanol 70% por 10 segundos e levados imediatamente para o fluxo laminar para evitar a contaminação após a retirada dos M ϕ . Os M ϕ foram obtidos após injeção IP de 5 mL de meio completo, massagem do abdômen e coleta do líquido com seringa. As células foram então centrifugadas (1500 rpm/5 minutos), o sobrenadante retirado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de meio completo.

3.3.5.2.2 Manuseio dos macrófagos in vitro

Para preparação da monocamada de M ϕ , as células foram contadas em câmara de Neubauer, diluídas para 1×10^6 células/mL e adicionado um volume de 1 mL por poço dessa suspensão. Após incubação em estufa incubadora por um período de 2 a 3 horas para permitir a adesão dos M ϕ , foram feitas, cuidadosamente, duas lavagens com PBS para remoção das células que não aderiram, repôs-se o meio completo M ϕ que permaneceram aderidos no plástico e foram incubados *overnight* para permitir a adesão total.

3.3.5.2.3 Ativação dos macrófagos

À cultura primária de M ϕ foram adicionados LPS (10 μ g/mL) no controle positivo e o PPV (10 e 100 μ g/mL) ou ainda apenas meio completo no controle negativo. As células permaneceram incubadas por 18 horas e, ao final desse tempo, o sobrenadante de cada replicata foi aliquotado para utilização imediata para a dosagem de NO ou congelado a -80°C para utilização posterior para detecção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6.

3.3.5.2.4 *Produção de NO*

3.3.5.2.4.1 *Princípio do teste*

O NO é um mediador produzido por M ϕ constitutivamente em baixas concentrações pela óxido nítrico sintase (NOS, do inglês *Nitric Oxide Synthase*). A produção de NO em M ϕ ativados está relacionada com a expressão de um tipo diferente de NOS, a iNOS (NOS induzida) (KRONCKE *et al.*, 1995). As grandes quantidades de NO produzidas pela iNOS têm efeitos citotóxicos devido a indução da perda de ferro, inativando diversas enzimas do ciclo do ácido cítrico e da cadeia transportadora de elétrons, liberação de Zinco, culminando em inibição da transcrição pelos fatores de transcrição dependentes de Zinco” (tradução de *zinc finger type transcription*) e pela perda do $\Delta\psi_m$ devido a alteração na função de canais iônicos (KLIMP *et al.*, 2002).

O tempo de meia vida do NO é muito reduzido, por isso a determinação da produção deste radical pelos M ϕ foi mensurada indiretamente pela detecção de um produto estável da sua degradação, o nitrito (NO^{2-}). A dosagem de NO^{2-} foi realizada com reagente de Griess. Inicialmente, o NO^{2-} se transforma em um sal de diazônio em meio ácido contendo sulfanilamida e em seguida este sal forma um composto azo estável de cor lilás pela reação com N-naftil-etilenodiamina que pode ser quantificado colorimetricamente ($\lambda = 540$) (GREEN *et al.*, 1981; GREEN *et al.*, 1982).

3.3.5.2.4.2 *Procedimento experimental*

O reagente de Griess foi preparado imediatamente antes do uso pela mistura 1:1 das soluções preparadas em ácido fosfórico 5% (v/v) contendo N-Naftiletlenodiamino 0,1% (p/v) e sulfonamida 1% (p/v) (GREEN *et al.*, 1982). Em uma placa de 96 poços foram colocados 100 μL do sobrenadante dos M ϕ incubados com PPV, LPS ou sem tratamento e em seguida adicionou-se em cada poço mais 100 μL de reagente de Griess. Após dez minutos de incubação a temperatura ambiente no escuro, a absorbância foi medida em 540 nm e comparada com uma curva padrão de NaNO_2 (0,78-50 μM).

3.3.5.2.4.3 *Análise dos resultados*

Os dados de absorvância foram plotados em um gráfico e a concentração de NO^2 das amostras foi estimada através de regressão não-linear no programa GraphPad Prism. Os valores das médias e erros padrão foram comparados com o controle negativo por ANOVA seguida de Dunnet. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando o nível de significância foi no máximo 5%.

3.3.5.2.5 *Detecção de citocinas*

3.3.5.2.5.1 *Princípio do teste*

O teste de ELISA (do inglês *Enzyme linked Immunoabsorbant Assay*) permite detectar eficientemente diversas moléculas como anticorpos e citocinas usando anticorpos específicos e quantificá-los colorimetricamente devido à reação da avidina-peroxidase revelada com tetrametilbenzidina.

3.3.5.2.5.2 *Procedimento experimental*

Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante do kit (BD OpTEIA™). Cada placa foi sensibilizada com 100 μL do anticorpo de captura anti-citocina de interesse (TNF- α , IL-1 β ou IL-6) *overnight* (2-4°C), e então lavada 3 vezes com uma solução de Tween 20 0,05% diluída em tampão fosfato pH 7,4. Posteriormente, as placas foram bloqueadas com 200 μL de SFB a 10% em tampão fosfato por 1 hora a temperatura ambiente e lavadas 3 vezes. Alíquotas dos sobrenadantes obtidos dos M ϕ e os padrões das citocinas (para obtenção de uma curva padrão) foram descongelados e 100 μL /poço incubados por 2 horas. As placas foram então lavadas 5 vezes e incubadas com anticorpo biotínido contra a citocina de interesse juntamente com avidina-peroxidase por 1 hora e em seguida lavadas mais 7 vezes para revelação com tetrametilbenzidina como substrato e peróxido de hidrogênio por 30 minutos. A reação foi parada com 50 μL /poço de H_2SO_4 1M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas com filtro de 450 nm.

3.3.5.2.5.2 Análise dos dados

Os resultados das absorvâncias foram expressos em pg/mL através de regressão linear da curva padrão no programa GraphPad Prism. Os valores das médias e erros padrão foram comparados com o controle negativo por ANOVA seguida de Dunnet. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando o nível de significância foi no máximo 5%.

3.4. Resultados

3.4.1 Extração, purificação e caracterização dos polissacarídeos isolados de *Protopalyythoa variabilis*

Os procedimentos de extração e isolamento dos PS a partir do resíduo do EHB do *P. variabilis* (PPV) estão esquematizados abaixo na figura 33. Os procedimentos de extração e purificação apresentaram alto rendimento, a saber, de 400 g de resíduo seco e triturado utilizado obteve-se 1 g de PPV.

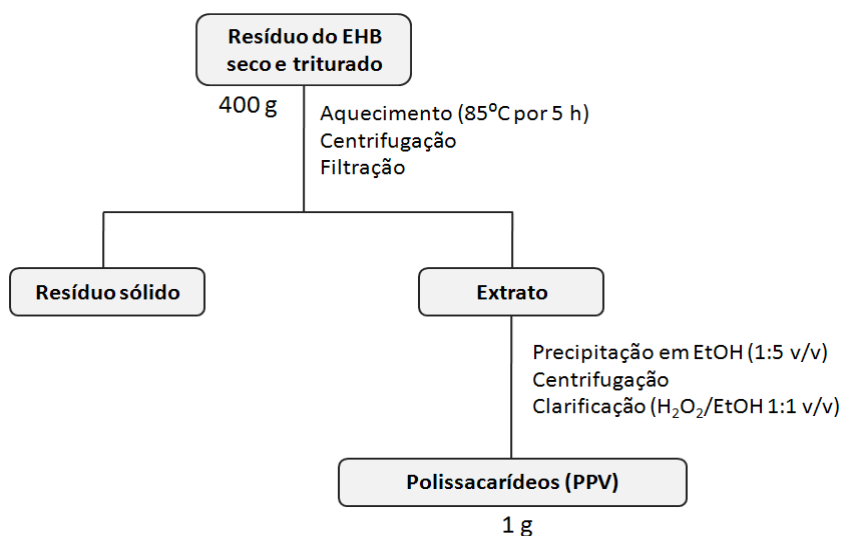


Figura 33 – Fluxograma esquemático dos processos de extração dos polissacarídeos de zoantídeo *Protopalyythoa variabilis* a partir do resíduo do extrato hidroalcoólico bruto (EHB).

O estudo químico confirmou que o PPV contém PS sulfatados que podem estar ligados à proteínas ou ainda a parte protéica ser contaminante. O espectro de IV apresentou sinais de hidroxila, carbonila e sulfato enquanto os espectros de RMN (¹H, ¹³C e DEPT) exibiram sinais compatíveis com a presença de aminoácidos e carboidratos. A partir da análise elementar, estimou-se o que o teor de proteínas ligadas ao PPV é de 51% e o teor de enxofre de 4,66%. Os aminoácidos (AAs) também foram identificados e seqüenciados: Gly-Asp-Gln-Gly-Gln-Gln-Gly-Arg-Thr-Gly-Ser-Arg-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp-Ala-Gly correspondendo a 47,3% de AAs alifáticos, 26,4% de AAs neutros, 10,5% de AAs ácidos e 15,8% de AAs básicos. Adicionalmente, a massa foi estimada em 10⁶ g/mol pelo método de

permeação em gel. Os dados referentes às análises utilizadas para caracterização química estão apresentados no Anexo III.

3.4.2 Efeitos sobre a proliferação *in vitro*

O potencial citotóxico do PPV foi avaliado através do teste do MTT após 72 horas de incubação sendo que estes PS não inibiram a proliferação das células tumorais testadas (HL-60, MDA-MB-435, SF-295, HCT-8 e B-16) até a concentração máxima de 50 $\mu\text{g/mL}$. Também não houve alteração da viabilidade dos M ϕ após 18 horas de incubação nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

3.4.3 Estudo da atividade antitumoral *in vivo*

A atividade antitumoral *in vivo* foi avaliada utilizando o modelo experimental de melanoma B-16 em camundongos C57BL/6. O volume tumoral foi medido nos dias 11, 13 e 15. Foi observada inibição do crescimento tumoral apenas para o grupo tratado com PPV IP no 15º dia (Fig. 34). Nos 11º e 13º dias não foi observado diferença entre os volumes dos tumores dos animais tratados com salina ou com PPV IP ou PPV VO. No 15º dia observou-se uma inibição do volume tumoral no tratamento com PPV IP (49%), mas não no VO.

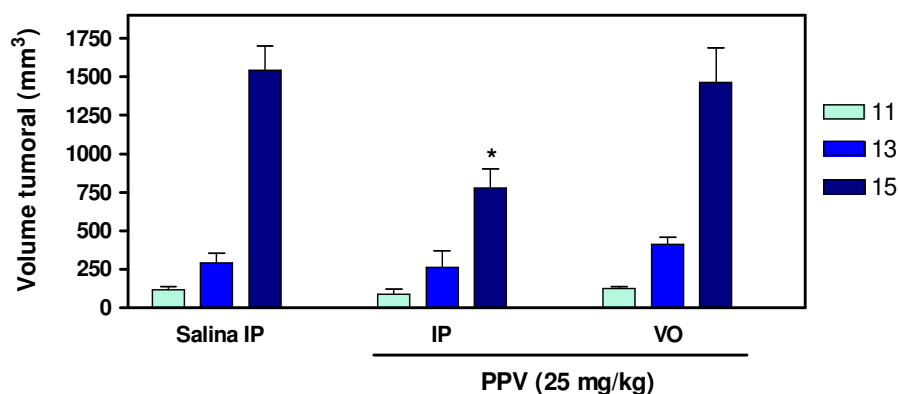


Figura 34 – Efeito dos polissacarídeos sulfatados ligados a proteínas de *Protospalythoa variabilis* (PPV) sobre o volume tumoral de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 transplantedados com melanoma B-16 subcutâneo. Os animais foram tratados após 24 horas da inoculação do tumor solução salina ou 25 mg/kg de PPV (IP ou VO) por 10 dias consecutivos e sacrificados no 15º dia. O volume do tumor de cada animal foi medido 11, 13 e 15 dias após a inoculação do tumor. Os dados

apresentados são relativos às médias e erros padrão das médias de $n= 5$ a 8 animais por grupo. * $p<0,05$ comparado ao grupo salina por ANOVA seguida de Dunnet.

O PPV administrado IP apresentou um percentual de inibição tumoral de 52% ($p<0,05$) em relação ao controle negativo (Fig. 35). A massa úmida dos tumores dos animais tratados com salina apresentou uma média de $3,75\text{ g} \pm 0,67\text{ g}$. Os animais tratados com PPV IP apresentaram massas de $1,80\text{ g} \pm 1,06\text{ g}$ enquanto os animais tratados com PPV VO apresentaram média das massas de $4,06\text{ g} \pm 1,02\text{ g}$.

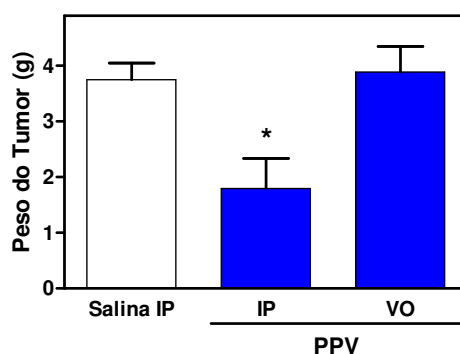


Figura 35 – Efeito do polissacarídeo isolado de *Protopolythoa variabilis* (PPV) sobre a massa tumoral de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 transplantados com melanoma B-16 subcutâneo. Os animais foram tratados após 24 horas da inoculação do tumor com solução salina intraperitonealmente (IP) ou 25 mg/kg de PPV IP ou por via oral (VO) por 10 dias consecutivos e sacrificados no 15º dia. Os dados apresentados são relativos às médias e erros padrão das médias de $n= 5$ a 8 animais por grupo. * $p<0,05$ comparado ao grupo salina por ANOVA seguida de Dunnet.

3.4.4 Análise da toxicidade

3.4.4.1 Análise histopatológica

A análise macroscópica revelou não haver lesões dos órgãos (fígado, baço e rins) dos animais saudáveis ou com melanoma tratados com solução salina ou tratados com 25 mg/kg/dia de PPV IP ou VO. A massa do fígado não sofreu alteração entre os grupos de animais saudáveis e com tumor, nem entre os tratamentos com PPV e os primeiros. O PPV IP aumentou a massa do baço ($p<0,05$) em relação aos animais saudáveis e aos animais com tumor tratados com salina (Fig 36). Todos os animais transplantados com o melanoma B-16 tiveram a massa dos rins diminuída em relação aos animais saudáveis.

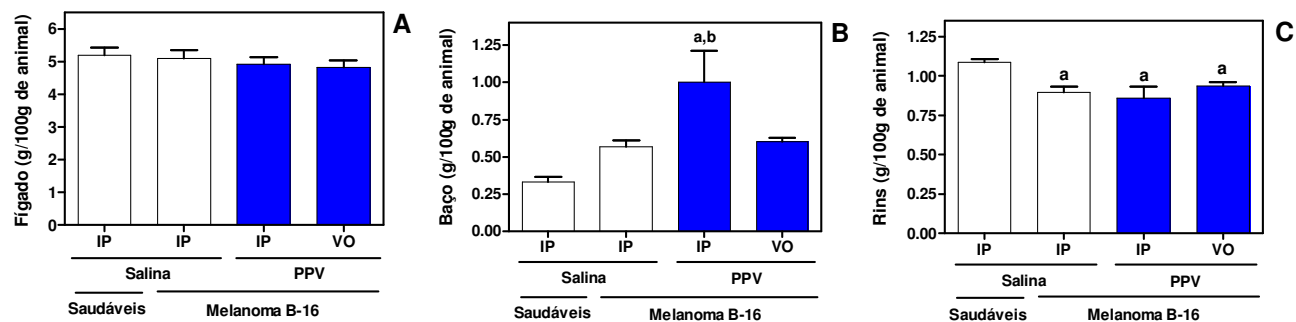


Figura 36 – Efeito dos polissacarídeos isolados de *Protopalythoa variabilis* (PPV) sobre a massa de órgãos de camundongos *Mus musculus* C57BL/6. Os animais foram tratados após 24 horas da inoculação do tumor com solução salina ou 25 mg/kg/animal/dia de PPV intraperitonealmente (IP) ou por via oral (VO) por 10 dias consecutivos e sacrificados no 15º dia. Os valores das massas foram normalizados e estão apresentados como g/100 g de animal para o fígado (A), baço (B) e rins (C). Os dados apresentados são relativos às médias e erros padrão das médias de n= 5 a 8 animais por grupo. ^ap<0,05 comparado aos animais saudáveis e ^bp<0,05 comparado ao grupo de animais transplantados com tumor e tratados com salina por ANOVA seguida de Newman-Keuls.

A análise histopatológica revelou não haver diferenças microscópicas consideráveis entre os órgãos (fígado, baço e rins) dos grupos tratados com salina com e sem transplante do tumor tipo melanoma (B-16). O fígado, baço e rins dos animais tratados com PPV (25 mg/kg/dia) IP e VO também estavam bem semelhantes aos dos animais dos controles não tendo sido detectados indícios de toxicidade nesta análise.

A análise das lâminas dos fígados permitiu observar hiperplasia das células de Kupffer, tumefação celular de hepatócitos comum a todos os grupos tanto tratados com salina com ou sem tumor, quanto naqueles tratados com PPV IP ou VO (Fig. 37). Nos animais tratados com PPV também foi observada a presença de foco inflamatório. Também foi observada degeneração hidrópica dos hepatócitos.

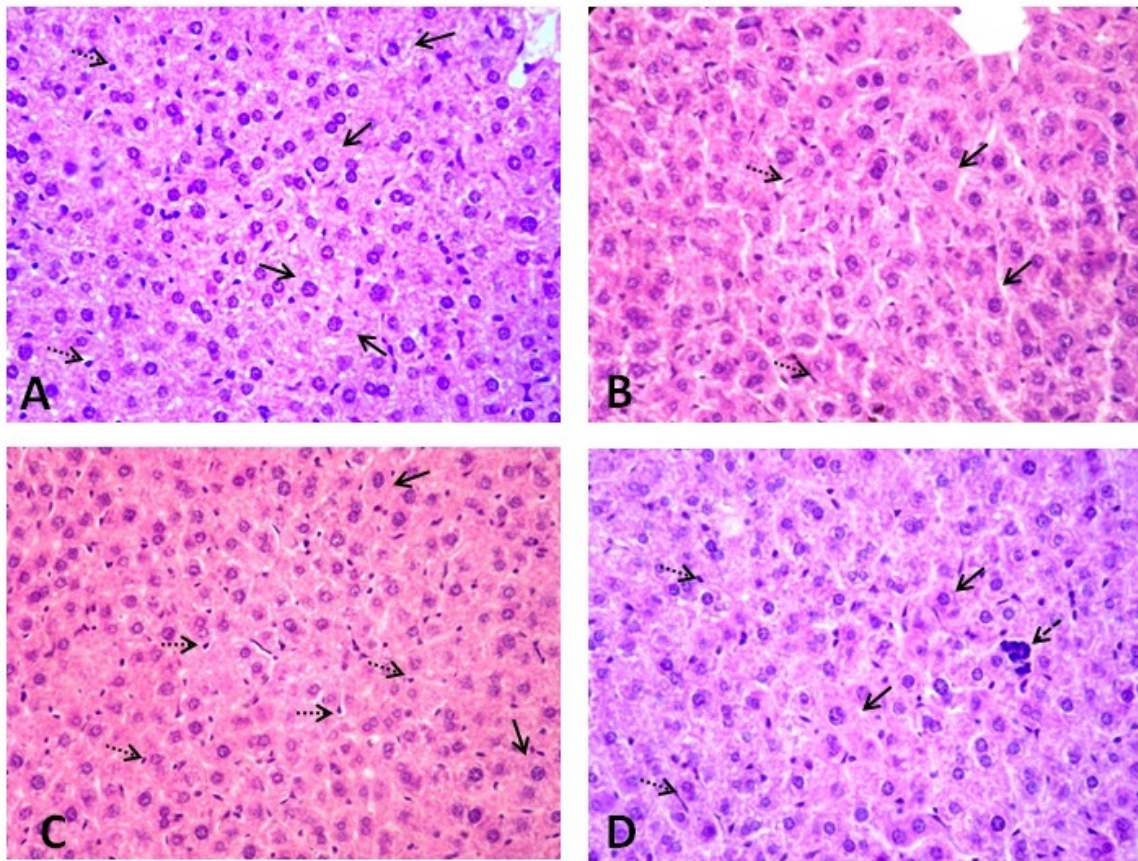


Figura 37 – Fotomicrografias de fígados de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 tratados com salina intraperitonealmente sem transplante do tumor (A) ou transplantados com melanoma B-16 (B) e tratados com polissacarídeos de *Protospalythoa variabilis* (25 mg/kg/dia) por via intraperitoneal (C) ou oral (D). Setas: linha inteira, tumefação celular; linha tracejada, foco inflamatório e linha pontilhada, células de Kupffer. Coloração com hematoxilina e eosina. Aumento 400X.

A análise das lâminas com baços exibiu folículos linfóides circunscritos, áreas de hemorragia e pigmentos de hemossiderina comum a todos os grupos (Fig. 38). Nos grupos com tumor tratados com salina ou PPV (IP e VO) observou-se uma amplitude maior da polpa vermelha e da sua congestão.

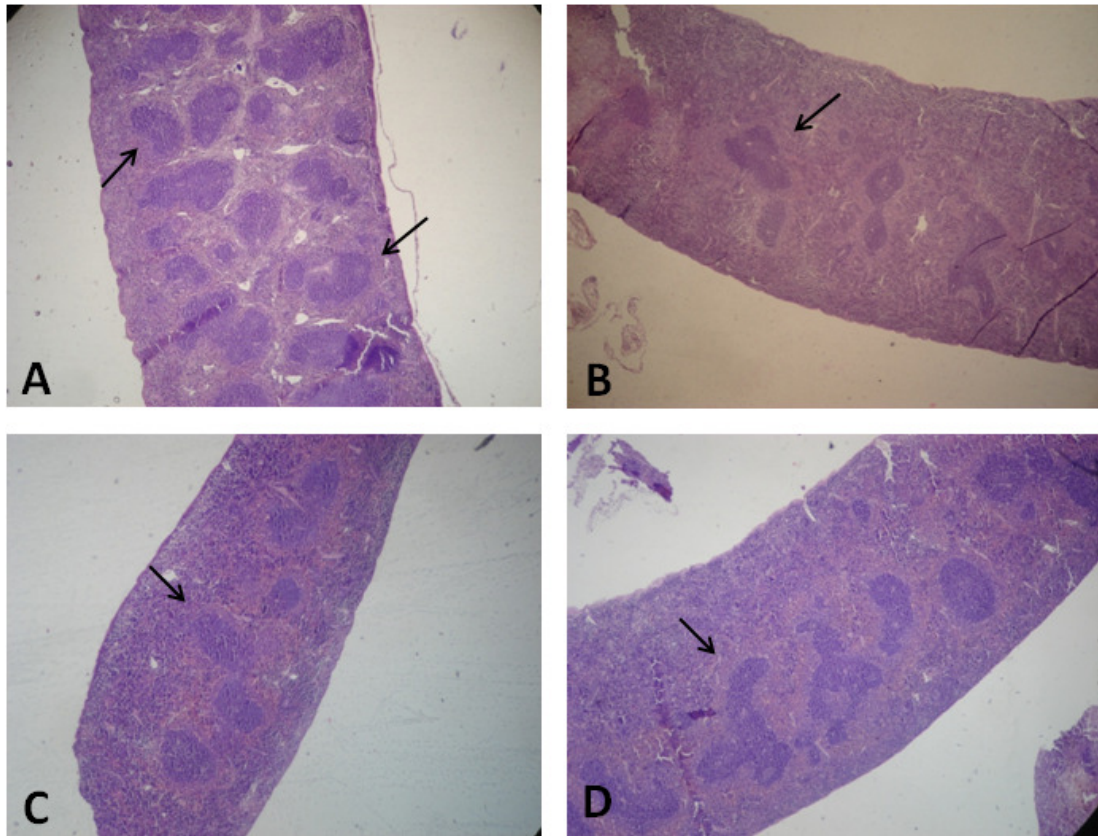


Figura 38 – Fotomicrografias de baços de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 tratados com salina intraperitonealmente sem transplante do tumor (A) ou transplantados com melanoma B-16 (B) e tratados com polissacarídeos de *Protospalythoa variabilis* (25 mg/kg/dia) por via intraperitoneal (C) ou oral (D). Coloração com hematoxilina e eosina. Aumento 40X. Setas: folículo linfóide.

As lâminas dos rins dos animais de todos dos grupos com e sem tumor e tratados com salina ou PPV (IP ou VO) apresentaram glomérulos preservados, raros cilindrohialino, discreta tumefação celular do epitélio tubular e hemorragia intersticial (Fig. 39).

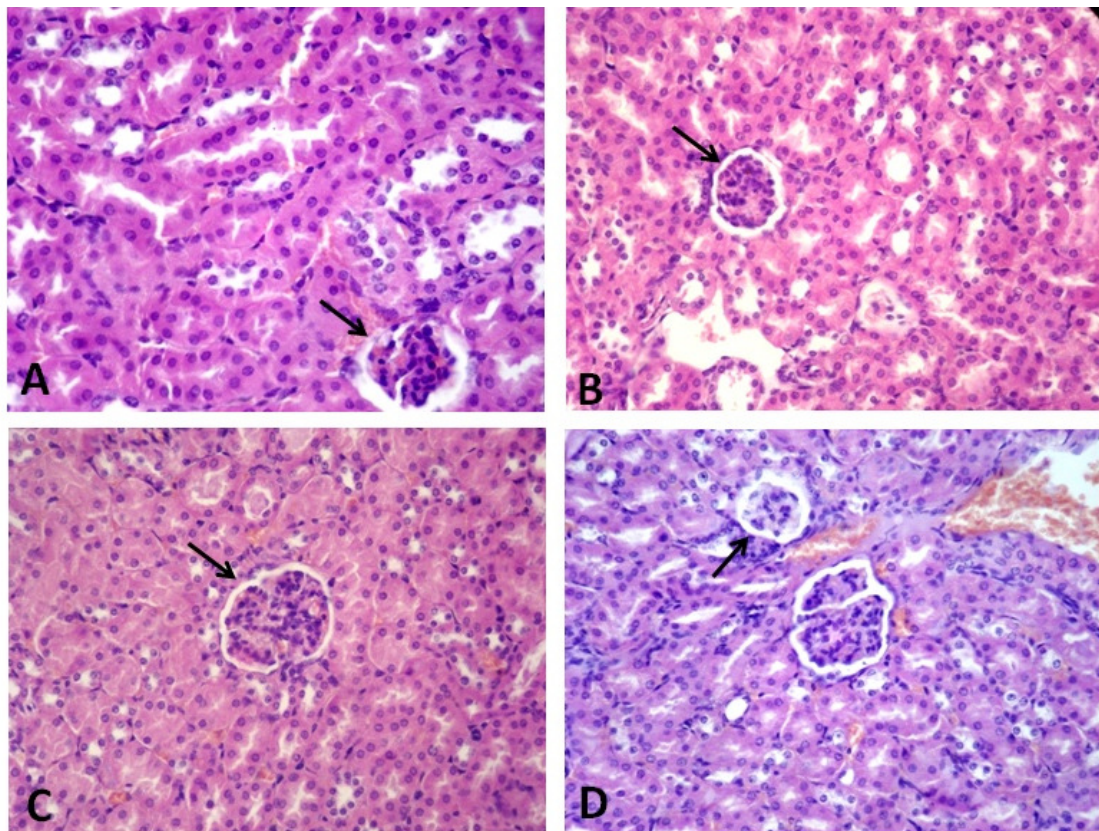


Figura 39 – Fotomicrografias de rins de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 tratados com salina intraperitonealmente sem transplante do tumor (A) ou transplantados com melanoma B-16 (B) e tratados com polissacarídeos de *Protospalythoa variabilis* (25 mg/kg/dia) por via intraperitoneal (C) ou oral (D). Coloração com hematoxilina e eosina. Aumento 400X. Setas: glomérulos.

Na análise dos cortes histológicos dos tumores também foram encontrados padrões teciduais semelhantes entre os animais tratados com salina ou PPV. O tumor foi caracterizado como uma neoplasia maligna mesenquimal composta por células poligonais com escasso citoplasma, pleomorfismo celular e nuclear, anisocariose, elevado índice mitótico, incontinência pigmentar, área de necrose de coagulação e escasso estroma (Fig. 40).

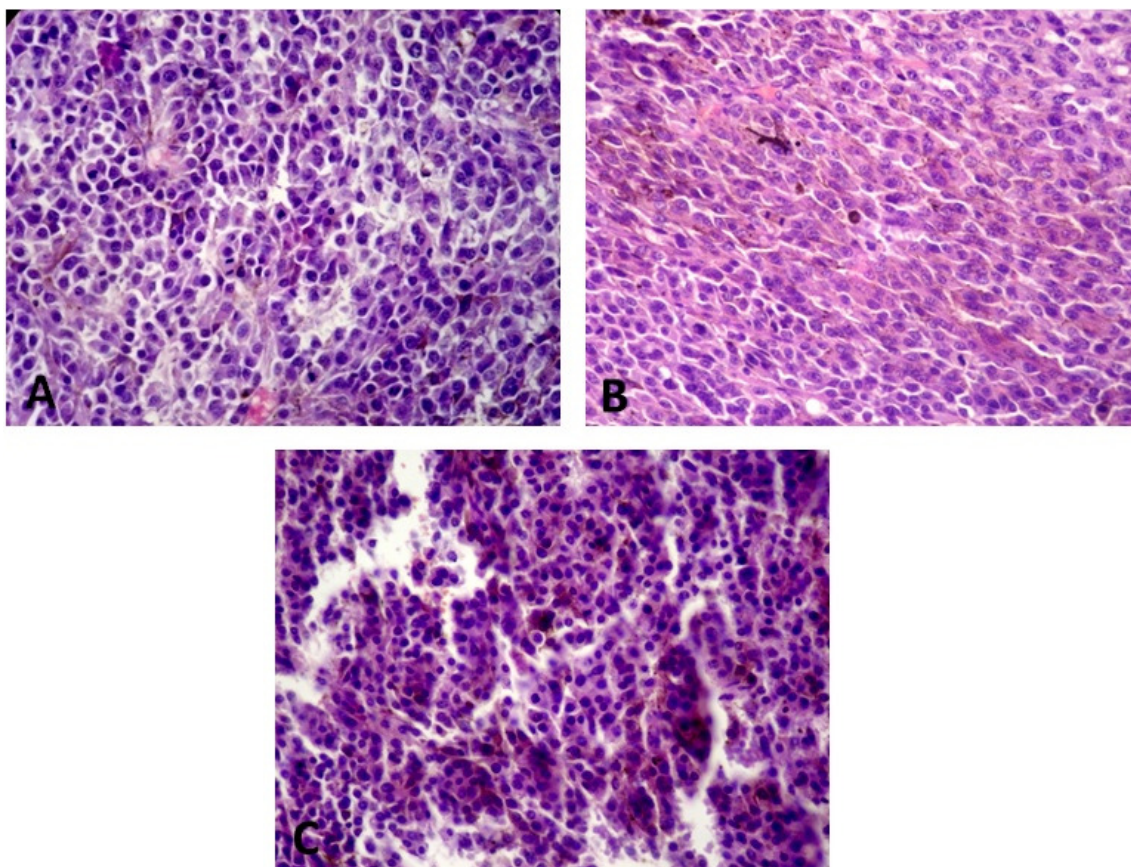


Figura 40 – Fotomicrografias de melanoma B-16 transplantados sub-cutâneamente em camundongos *Mus musculus* C57BL/6 tratados com salina intraperitonealmente (A) tratados com polissacarídeos de *Protospalythoa variabilis* (25 mg/kg/dia) por via intraperitoneal (B) ou oral (C). Coloração com hematoxilina e eosina. Aumento 400X.

3.4.4.2. Análise dos parâmetros bioquímicos

O sangue dos animais utilizados no experimento antitumoral inclusive aqueles saudáveis foi coletado imediatamente antes do sacrifício para análise bioquímica e hematológica. Os parâmetros bioquímicos avaliados demonstraram que o tratamento com

PPV não causou efeitos tóxicos no fígado através da dosagem sérica de ALT e AST ou alteração na função renal através da dosagem de uréia (Fig. 41). A ALT e a uréia não diferiram entre o controle negativo e os animais saudáveis e o tratamento com PPV pela via IP e VO também não foram diferentes destes primeiros ($p>0,05$). Contudo os animais do controle negativo aumentaram (333,2 UI/mL) a concentração de AST ($p<0,001$) em relação aos saudáveis (70 UI/mL). O tratamento com PPV pela via IP (353,6 UI/mL) ou VO (332,3 UI/mL) não alterou a concentração de AST em relação aos animais do controle negativo ($p>0,05$), mas todos estes aumentaram a concentração de AST em relação aos animais saudáveis.

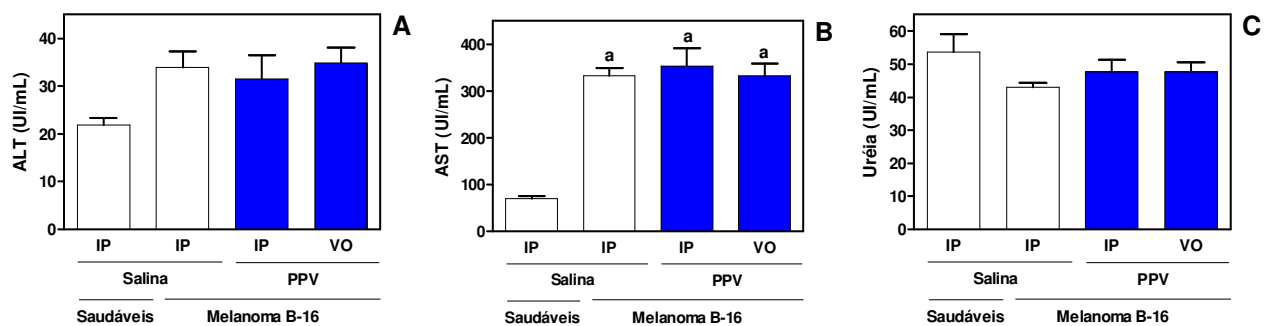


Figura 41 – Dosagem de alanina transaminase (ALT, A), aspartato transaminase (AST, B) e uréia (C) em sangue de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 saudáveis e com melanoma B-16 tratados com solução salina intraperitonealmente (IP) ou tratados com os polissacarídeos de *Protospalythoa variabilis* (PPV, 25mg/kg/dia) IP ou por via oral (VO). Um dia após o transplante tumoral, os animais de todos os grupos foram tratados diariamente por 10 dias e o sangue retirado após 15 dias. Os dados ($n= 5$ a 8) foram analisados por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. ^a $p<0,001$ comparados com o grupo de animais saudáveis.

3.4.4.3 Análise dos parâmetros hematológicos

Não houve diferenças significativas ($p>0,05$) na contagem de leucócitos totais entre os grupos (Fig. 42). Todavia puderam-se observar alterações na contagem diferencial na concentração de linfócitos, monócitos e neutrófilos dos animais tratados com PPV pela via IP ou VO em relação aos grupos de animais saudáveis ou do controle negativo (Fig. 42). Não houve diferenças nas contagens de plaquetas, eosinófilos e basófilos dos animais tratados com solução salina saudáveis ou com melanoma e tratados com PPV pela via IP ou VO (dados não apresentados).

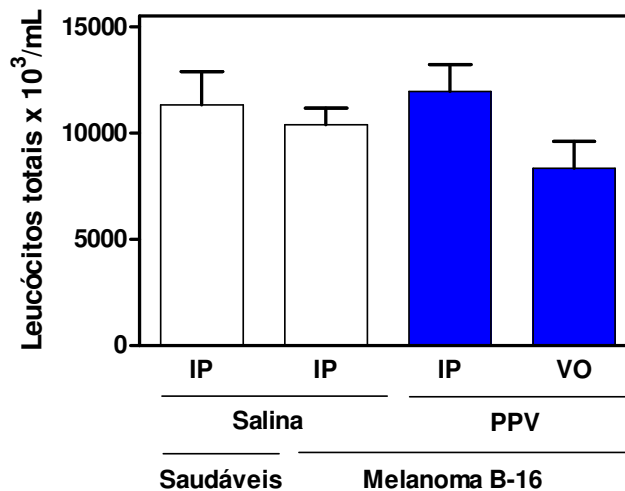


Figura 42 – Contagem de leucócitos totais de sangue de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 saudáveis ou transplantados com melanoma B-16 tratados com solução salina intraperitoneal (IP) ou tratados com os polissacarídeos de *Protospalythoa variabilis* (PPV, 25mg/kg/dia) IP ou por via oral (VO). Um dia após o implante tumoral, os animais de todos os grupos foram tratados diariamente por 10 dias e o sangue retirado após 15 dias. As diferenças entre os grupos (n= 5 a 8) foram analisadas por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. A comparação entre todos os grupos apresentou valor de $p > 0,05$.

A contagem de linfócitos (Fig. 43A) não foi diferente entre nenhum dos grupos comparados. Desta forma, os grupos tratados com PPV IP ou VO não apresentaram diferenças na contagem de linfócitos ($7,4 \times 10^6$ e $5,1 \times 10^6$ céls./mL respectivamente) em relação aos grupos de animais saudáveis ($7,7 \times 10^6$ céls./mL) ou do controle negativo com melanoma ($6,8 \times 10^6$ céls./mL). Os grupos dos animais saudáveis e com melanoma também não foram diferentes ($p < 0,05$).

A contagem de monócitos dos animais do controle negativo ($4,5 \times 10^5$ céls./mL) e tratados com PPV VO ($2,7 \times 10^5$ céls./mL) não foi diferente dos animais saudáveis ($5,0 \times 10^5$ céls./mL), enquanto os animais tratados com PPV pela via IP aumentaram a concentração de monócitos circulantes ($14,8 \times 10^5$ céls./mL) em relação aos grupos de animais saudáveis e do controle negativo (Fig. 43B).

Os animais do controle negativo ($3,7 \times 10^6$ céls./mL) aumentaram a contagem de neutrófilos ($p < 0,05$) em relação ao grupo de animais saudáveis ($1,7 \times 10^6$ céls./mL) e o mesmo também foi verificado no grupo PPV IP ($3,5 \times 10^6$ céls./mL) em relação a estes

últimos (Fig. 43C). Por outro lado, o grupo PPV VO inibiu o aumento de neutrófilos ($2,0 \times 10^6$ céls./mL) causados pelo tumor.

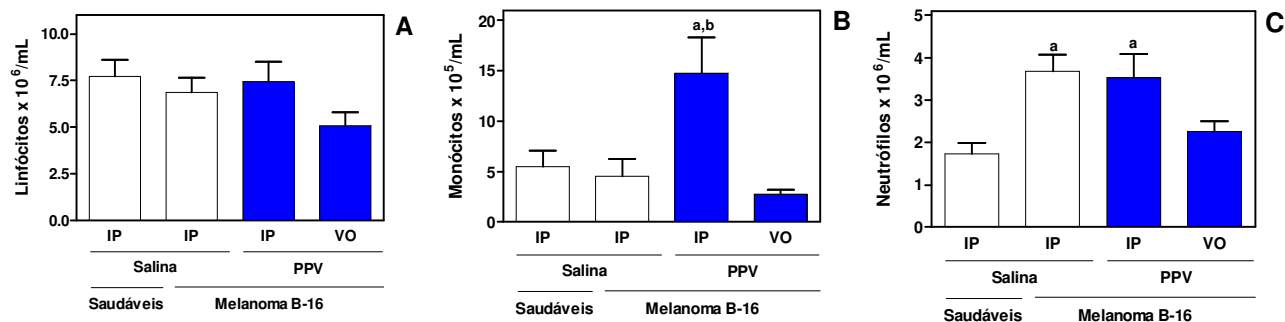


Figura 43 – Contagem diferencial de leucócitos de sangue de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 tratados com solução salina intraperitoneal (IP) saudáveis e com melanoma B-16 ou tratados com os polissacarídeos de *Protospalythoa variabilis* (PPV, 25mg/kg/dia) IP ou por via oral (VO) com melanoma B-16. A, linfócitos; B, monócitos e C, neutrófilos. Um dia após o implante tumoral, os animais de todos os grupos foram tratados diariamente por 10 dias e o sangue retirado após 15 dias. As diferenças entre todos os grupos (n= 5 a 8) foram analisadas por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. ^ap<0,05 comparado com o grupo salina saudáveis e ^bp<0,01 comparado com o grupo salina com melanoma.

3.4.5 Estudo da atividade imunoestimulante

3.4.5.1 Migração de neutrófilos

O PPV aumentou a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após 4 horas da sua injeção IP (Fig. 44) quando comparado ao controle negativo (C-). O grupo C- apresentou migração de 14×10^4 células/mL enquanto os tratamentos com PPV nas doses tanto de 5 como de 25 mg/mL aumentaram esse valor ($p<0,05$) para 33×10^4 células/mL. O tratamento com 200 ng de LPS também induziu aumento ($p<0,05$) para 46×10^4 células/mL.

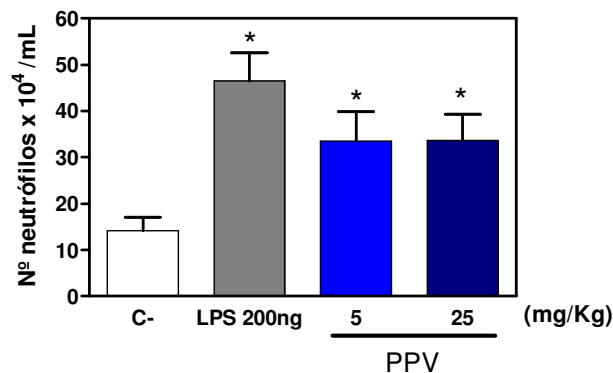


Figura 44 – Migração de neutrófilos em camundongos *Mus musculus* C57BL/6 após 4 horas de tratamento intraperitoneal com solução salina (C-), 200 ng de LPS (C+) ou 5 e 25 mg/kg dos polissacarídeos de *Protospalythoa variabilis* (PPV). Os dados apresentados são relativos às médias e erros padrão das médias de n= 5 a 7 animais por grupo. *p<0,05 comparado ao grupo salina por ANOVA seguida de Dunnet.

3.4.5.2 Ativação de macrófagos peritoneais *in vitro*

A cultura primária dos M ϕ foi incubada por 18 horas com apenas meio (C-), 10 μ g/mL de LPS (C+) ou 10 e 100 μ g/mL de PPV. Após a incubação a viabilidade dos M ϕ foi avaliada pelo teste do MTT e o sobrenadante aliqüotado para detecção de NO e das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6.

3.4.5.2.1. Produção de NO

A produção de NO foi avaliada indiretamente através da detecção de um produto estável da sua degradação, o nitrito (NO²⁻). O LPS e o PPV na concentração de 10 μ g/mL aumentaram significativamente as concentrações de NO²⁻ no sobrenadante dos M ϕ (Fig. 45).

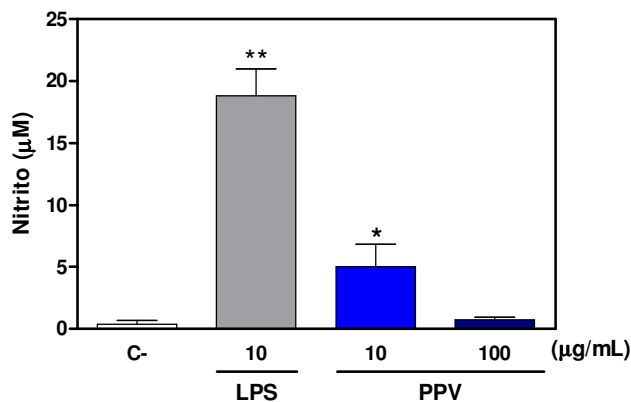


Figura 45 – Detecção de nitrito no sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 estimulados in vitro com meio (C-), 10 µg/mL de LPS (C+) ou 10 e 100 µg/mL dos polissacarídeos de *Protospalythoa variabilis* (PPV) após 18 horas de incubação. Os dados apresentados são relativos às médias e erros padrão das médias de n= 5 a 7 animais por grupo. *p<0,05 e **p<0,0001 comparado ao grupo salina por teste t não pareado.

3.4.5.2.2 Liberação de citocinas

A concentração das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no sobrenadante dos M ϕ foi detectada pelo teste de ELISA. O LPS aumentou (p<0,05) as concentrações de todas as citocinas avaliadas enquanto o PPV aumentou (p<0,05) apenas a IL-1 β e a IL-6 na concentração de 10 µg/mL. Os resultados estão apresentados nas figuras 46, 47 e 48.

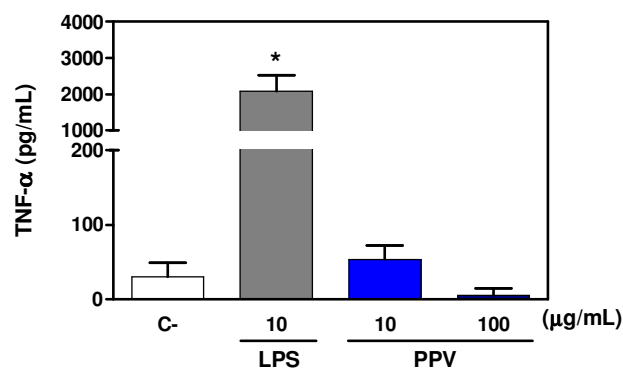


Figura 46 – Produção de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 estimulados in vitro com meio (C-), 10 µg/mL de LPS (C+) ou 10 e 100 µg/mL dos polissacarídeos de *Protospalythoa variabilis* (PPV) após 18 horas de incubação. Os dados apresentados são relativos às médias e erros padrão das médias de n= 5 a 7 animais por grupo. *p<0,05 comparado ao grupo salina por ANOVA seguida de Dunnet.

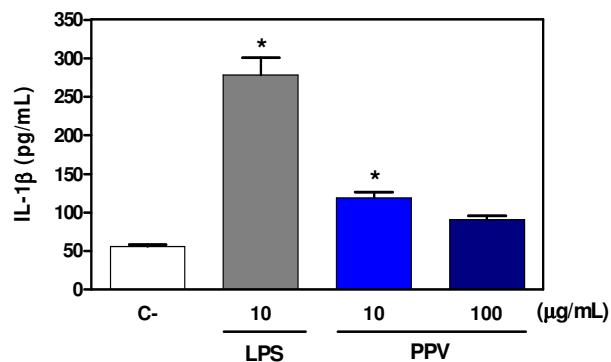


Figura 47 – Produção de IL-1 β por macrófagos peritoneais de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 estimulados in vitro com meio (C-), 10 μ g/mL de LPS (C+) ou 10 e 100 μ g/mL dos polissacarídeos de *Protospalythoa variabilis* (PPV) após 18 horas de incubação. Os dados apresentados são relativos às médias e erros padrão das médias de n= 5 a 7 animais por grupo. *p<0,05 comparado ao grupo salina por ANOVA seguida de Dunnet.

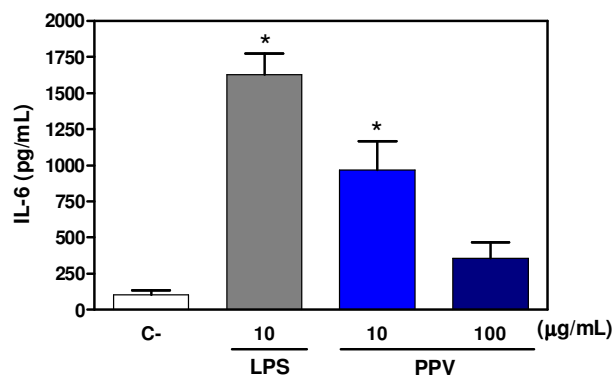


Figura 48 – Produção de IL-6 por macrófagos peritoneais de camundongos *Mus musculus* C57BL/6 estimulados in vitro com meio (C-), 10 μ g/mL de LPS (C+) ou 10 e 100 μ g/mL dos polissacarídeos de *Protospalythoa variabilis* (PPV) após 18 horas de incubação. Os dados apresentados são relativos às médias e erros padrão das médias de n= 5 a 7 animais por grupo. *p<0,05 comparado ao grupo salina por ANOVA seguida de Dunnet.

3.5 Discussão

Os PS são macromoléculas que ocorrem na natureza em uma enorme diversidade de organismos como fungos, microorganismos, algas, plantas e animais (MOURÃO *et al.*, 1996; SCHEPETKIN e QUINN, 2006; SCHEPETKIN *et al.*, 2005). A caracterização química do extrato alcoólico obtido a partir do resíduo do EHB revelou tratar-se de PS sulfatados de alta massa molecular ligados a proteínas (PPV). A literatura de invertebrados marinhos indica que tais animais são uma rica fonte de PS sulfatados (PAVÃO *et al.*, 1995; ALBANO e MOURÃO, 1986; MOURÃO e BASTOS, 1987; MOURÃO e PERLIN, 1987; BORSIG *et al.*, 2007; MOURÃO *et al.*, 1996; POMIN e MOURÃO, 2008; TAPON-BRETAUDIÈRE *et al.*, 2002; VILANOVA *et al.*, 2009). Os PS sulfatados são um grupo de conhecido por induzirem vários efeitos biológicos importantes inclusive antimetastático, imunoestimulante e antitumoral (BORSIG, 2007; MOURÃO *et al.*, 1996; SCHEPETKIN e QUINN, 2006).

Embora haja diversos estudos a cerca da atividade biológica dos PS o conhecimento sobre a estrutura é relativamente pequeno. Conseqüentemente é difícil estabelecer extensas relações entre características estruturais com atividade antitumoral de PS complexos, mesmo assim algumas correlações são possíveis de ser feitas. A massa molecular, ramificações, polaridade e conformação são as características melhor estudadas (OOI e LIU, 2000). Como dito anteriormente, o PPV possui alta massa molecular, sulfatação e proteínas ligadas.

A massa molecular é uma característica que muitas vezes está positivamente correlacionada com a atividade dos PS (OOI e LIU, 2000). Os glucanos de alta massa molecular são mais potentes que os de menor massa (SAKAGAMI *et al.*, 1991). Os PS utilizados na clínica como a lentinana, a esquizofilana e o PSK apresentam massas moleculares de $4-8 \times 10^5$, $4,5 \times 10^5$ e $9,4 \times 10^4$ g/mol respectivamente (OOI e LIU, 2000). A ordem de 10^6 g/mol do PPV é equiparável ao desses PS MDR. Além dessa correlação estabelecida, outra evidência a cerca da influência da massa tem sido demonstrada em estudos de fracionamento de PS. Quando o PSK foi separado em 4 frações, a de maior massa molecular apresentou atividade imunomoduladora mais potente (SAKAGAMI *et al.*, 1990; KIM *et al.*, 1990). Da mesma forma o fracionamento dos β -1-3-glucanos obtidos do micélio de *Grifola frondosa*, em frações de diferentes massas, mostrou que a fração de maior massa

molecular apresentou atividades antitumoral e imunomoduladora mais potentes (KIM *et al.*, 1990; ADACHI *et al.*, 1990a; ADACHI *et al.*, 1990b).

A polaridade pode ser aumentada pela sulfatação ou diminuída pela hidroximetilação e carboxi-metilação dos PS (LEUNG *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que a diminuição da polaridade por hidroximetilação de um β -glucano extinguiu a sua atividade antitumoral (KURACHI *et al.*, 1990; SUZUKI *et al.*, 1991). Yamamoto e colaboradores mostraram em meados da década de 80 que a sulfatação de PS extraídos da alga parda *Sargassum kjellmanianum* melhorava a atividade anticâncer (YAMAMOTO *et al.*, 1984). Compostos relacionados à heparina com diferentes graus de sulfatação foram encontrados em diferentes tecidos da ascídia *Styela plicata* (GANDRA *et al.*, 2000). Neste mesmo trabalho também foi demonstrado uma relação positiva entre a intensidade de sulfatação dos PS com a atividade anti-coagulante (GANDRA *et al.*, 2000).

Enquanto as algas possuem geralmente PS sulfatados com estruturas complexas e heterogêneas, dos invertebrados marinhos são extraídos fucanos e galactanos sulfatados com estruturas repetidas (POMIN e MOURÃO, 2008). Os PS destes organismos são componentes da matriz extracelular e estudos com ouriços-do-mar têm demonstrado que estas macromoléculas estão relacionadas com o reconhecimento espécie-específico da reação acrossômica (POMIN e MOURÃO, 2008). Justamente por se tratar de componentes estruturais desses animais, o rendimento da extração destes compostos é deveras superior ao dos metabólitos secundários estudados no capítulo I. Essa característica é fundamental para o estudo em animais, imprescindível para verificação da atividade antitumoral. O PPV, não surpreendentemente, apresentou um alto teor de PS no resíduo do EHB.

O estudo do PPV contemplou a avaliação dos efeitos diretos sobre a proliferação de células tumorais e normais, atividade antitumoral *in vivo* e efeito imunoestimulante. O PPV não apresentou citotoxicidade direta contra as células tumorais *in vitro*. Esse é um resultado comum para macromoléculas dessa natureza, que freqüentemente não possuem seus efeitos antitumorais relacionados à toxicidade direta nas células cancerígenas, mas sim mediados pela modulação das células imunológicas do hospedeiro (LEUNG *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2007; OOI e LIU, 2000; SCHEPETKIN e QUINN, 2006; TZIANABOS, 2000). A lentinana e a esquizofilana são dois exemplos de PS utilizados na clínica que apresentam efeito antitumoral *in vivo* não relacionados à citotoxicidade direta contra células tumorais (SAKAGAMI *et al.*, 1991; SAKAGAMI *et al.*, 1990; OOI e LIU, 2000).

Diversas estratégias vêm sendo investigadas na imunoterapia contra diferentes tipos de câncer como mama, pulmão, pâncreas, melanoma, gástrico, renal e cerebral, sendo o melanoma considerado o modelo para imunoterapia devido ao melhor conhecimento das respostas clínicas pelo sistema imune induzida por moduladores. Os melanomas são tumores bastante agressivos e apresentam alto potencial metastático (FANG *et al.*, 2008). A linhagem de células murino B-16 é pouco imunogênica e os melanomas de uma forma geral apresentam baixos índices de resposta às imunoterapias correntes, baseada em estímulos não específicos como citocinas (IL-2 e IFN- γ) ou derivados bacterianos (FANG *et al.*, 2008; BUHTOIAROV *et al.*, 2006).

Por exemplo, a IL-2, uma citocina utilizada clinicamente devido a sua potente habilidade em ativar células T CD8+ e NK, apresentou apenas de 13 a 17% de resultados objetivos em pacientes com melanoma metastático (ROSENBERG *et al.*, 1994). Em contra partida, Buhtoiarov e colaboradores demonstraram o envolvimento crucial dos M ϕ na regressão do melanoma B-16 em camundongos C57BL/6 por um agente modificador da resposta biológica, o CpG-1826, um oligonucleotídeo não metilado característico de DNA bacteriano. Nesse mesmo e em outros três trabalhos, foi mostrado que o efeito antitumoral desse modificador da resposta biológica não é afetado pela inibição das células T CD8+, células B, mas o é parcialmente quando células NK são inibidas e totalmente quando os M ϕ foram inibidos (BUHTOIAROV *et al.*, 2006; AUF *et al.*, 2001; KREPLER *et al.*, 2004; GUIDUCCI *et al.*, 2005).

O potencial antitumoral do PPV foi investigado *in vivo* no modelo de melanoma B-16 em camundongos C57BL/6. O tratamento dos animais foi realizado por 10 dias consecutivos, os volumes dos tumores medidos 11, 13 e 15 dias após o transplante sendo retirados e pesados no último dia. O grupo PPV IP apresentou uma inibição do crescimento tanto da massa quanto do volume do tumor, medidos no último dia de, aproximadamente, 50% em relação ao grupo controle negativo. O grupo PPV VO não alterou o volume ou massa relação ao controle negativo. A administração pela via intraperitoneal geralmente apresenta melhores respostas devido à extensa absorção dos compostos e sem experimentar uma prévia degradação como ocorre no trato intestinal pela administração por via oral ou metabolização de primeira passagem (MESTECKY *et al.*, 2008).

Uma triagem com extratos aquosos do ouriço-do-mar *Strongylocentrus nudus*, do cirripédio *Megabalanus rosa* e das ascídias *Styela plicata*, *Ecteinascidia turbinata* e

Halocynthia hilgendorfi f. ritteri induziram inibição crescimento do Sarcoma 180 superior a 60% em camundongos (SASAKI *et al.*, 1985). Em outro estudo conduzido por Liu e colaboradores foi demonstrado que os PS extraídos dos ovos do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus nudus* exibiram atividade anticâncer contra o sarcoma-180 em camundongos e estimularam a proliferação de leucócitos do baço *in vitro* (LIU *et al.*, 2007).

A análise macroscópica do fígado, baço e rins indicou não haver toxicidade nos animais tratados com PPV. A massa do fígado também não foi alterada pelo tratamento com PPV, nem a massa dos rins entre os animais com tumor. A massa úmida do baço dos animais tratados com PPV IP aumentou tanto em relação aos animais saudáveis quanto aos animais do controle negativo com melanoma.

O único sinal de toxicidade encontrado na análise histopatológica dos animais tratados com PPV foi congestão da polpa vermelha do baço o que pode explicar o seu aumento de volume. Na análise bioquímica do fígado e função renal, a única diferença encontrada foi um aumento da concentração de AST nos tratamentos com PPV pela via IP e VO, porém equivalente ao aumento encontrado nos animais com tumor do controle negativo, indicando que essa alteração está relacionada com a presença do tumor e não com a toxicidade dos PS.

Na realidade, a utilização dos PS na clínica tem como objetivos maiores contribuir para maior efetividade da quimioterapia e reduzir os efeitos colaterais (FUJIMOTO *et al.*, 1991; FRANZ, 1995). Os PS MRB utilizados na clínica – lentinana, esquizofilana, PSK e PSP – como adjuvante para diversos tipos de câncer como mama, próstata, cervical, coloretal, gastrointestinal e pulmonar prolongaram a sobrevida e aumentaram a qualidade de vida dos pacientes (TAGUCHI *et al.*, 1985; OKAMURA *et al.*, 1986; MITOMI *et al.*, 1992; ITO *et al.*, 2004; TARI *et al.*, 1994; KIMURA *et al.*, 2003; NISHIWAKI *et al.*, 1990; TORISU *et al.*, 1990; LEUNG *et al.*, 2006).

A análise dos parâmetros hematológicos revelou que o PPV, quando administrado pela via IP, estimula o aumento do número de monócitos circulantes. O estímulo à mielopoiese e indução da liberação de monócitos da medula óssea são fenômenos comuns aos PS MRB, podendo justificar o aumento dos monócitos observado na administração IP do PPV (SCHEPETKIN e QUINN, 2006; LEUNG *et al.*, 2006). Como demonstrado na análise histopatológica, o tratamento com PPV IP também induziu uma importante hiperplasia das células de Kupfer. Taki e colaboradores demonstraram que a

inibição de metástase hepática em camundongos transplantados com adenocarcinoma 26 tratados com a lentinana, se deveu à ativação das células de Kupfer (TAKI *et al.*, 1995).

A indução de células do sistema imune inato pode ajudar a combater o tumor e resultar em um efeito antitumoral através do reconhecimento e destruição das células neoplásicas pelos seus próprios meios, por vias diferentes daquelas utilizadas pelas células T ou ativando e estimulando as respostas celulares do sistema imune adquirido (DIEFENBACH e RAULET, 2002). Os M ϕ são células efetoras do sistema imune inato que desempenham um papel importante nas reações antitumorais imunológicas (MANTOVANI *et al.*, 2002b). O MIT tende a polarizar os M ϕ mais para o tipo M2, que está envolvido em processos que favorecem o sucesso do tumor como angiogênese, reparo tecidual e remodelamento da matriz (para mais detalhes, ver figura 49) (SICA *et al.*, 2006). A indução da polarização dos M ϕ mais para o tipo M1 por PAMPs é uma estratégia bastante interessante, pois induz os M ϕ a agirem diretamente contra o tumor e, de forma indireta, acredita-se favorecer a apresentação de antígenos do tumor às células T. Adicionalmente, a mudança causada no MIT também permite a migração e infiltração de células da imunidade adquirida para matar o tumor (BUHTOJAROV *et al.*, 2006; SICA *et al.*, 2006; MANTOVANI *et al.*, 2002a).

É possível que o PPV deva o seu efeito antitumoral, pelo menos em parte, a ativação de M ϕ a maneira dos PAMPs ligando-se a PRRs (LEUNG *et al.*, 2006; OOI e LIU, 2000; SCHEPETKIN e QUINN, 2006; TZIANABOS, 2000). Os M ϕ ativados por modificadores da resposta biológica aumentam a fagocitose, produzem citocinas pró-inflamatórias, processam e apresentam antígenos, produzem ROS e NO e expressam moléculas de adesão (SCHEPETKIN *et al.*, 2008; LEUNG *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2003; SHIN *et al.*, 2002). Adicionalmente ao efeito mitogênico em monócitos, os resultados demonstrando aumento da migração de neutrófilos *in vivo* indicaram que os M ϕ da cavidade peritoneal poderiam estar produzindo citocinas pró-inflamatórias (Fig. 50). O efeito do tratamento com PSK *in vivo* tem sido estudado e sugere-se que a ativação dos neutrófilos pode contribuir para a eficácia antitumoral em modelos de câncer experimentais (ISHIHARA *et al.*, 1998).

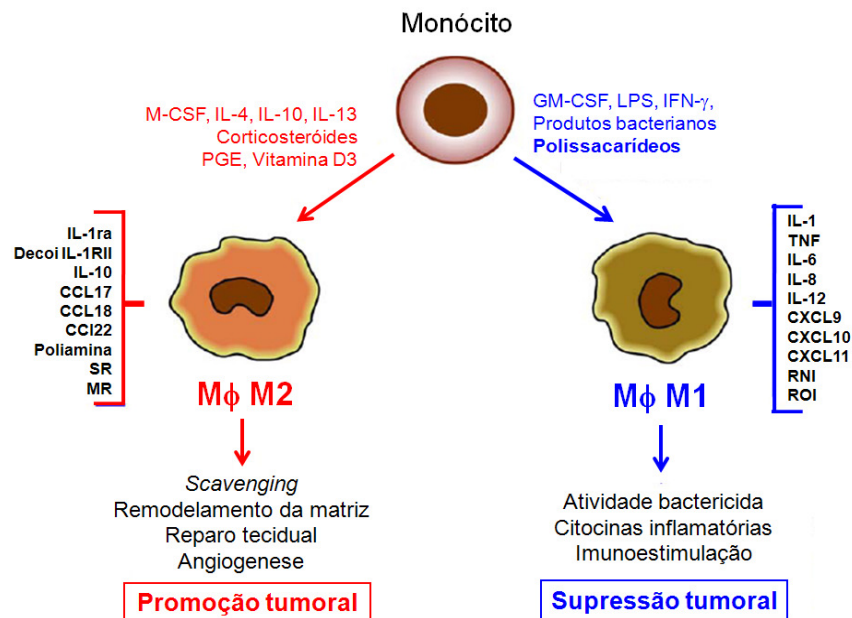


Figura 49 – Os monócitos podem diferenciar em diferentes tipos de macrófagos (Mφ) dependendo dos fatores a que são expostos. Na presença de fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), interferon- γ (IFN- γ) ou, potencialmente, de outros agentes modificadores da resposta biológica como os polissacarídeos, os monócitos podem diferenciar em macrófagos tipo M1 (Mφ M1). Em presença de fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), interleucinas (IL) IL-4, IL-10 e IL-13 e agentes imunossupressivos como corticosteróides, prostaglandinas e vitamina D3 os monócitos diferenciam em macrófagos M2 (Mφ M2). Os subtipos M1 e M2 diferem no fenótipo e funções. Enquanto os Mφ M1 possuem alta atividade microbicida, imunoestimulatória e citotoxicidade contra células tumorais os Mφ M2 possuem alta habilidade em *scavenging* (remoção/limpeza), promovem o reparo tecidual, remodelamento da matriz e favorecem a expansão tumoral. Adaptado de Mantovani *et al.*, 2002; Sica *et al.*, 2003 e Pinto *et al.*, 2009.

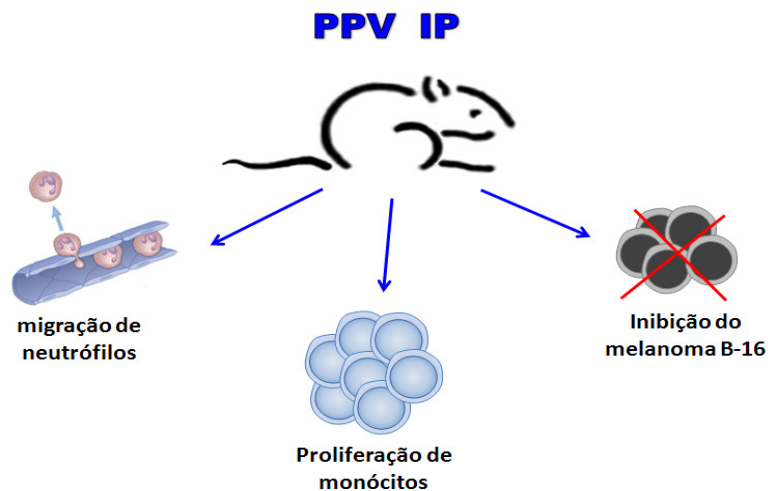


Figura 50 – Resumo esquemático dos efeitos observados em camundongos *Mus musculus* C57BL/6 tratados com os polissacarídeos do *Protopolythoa variabilis* (PPV) administrado intraperitonealmente (IP).

Para estudar a ativação dos M ϕ pelo PPV, a presença de citocinas pró-inflamatórias importantes (TNF- α , IL1 β e IL-6) e NO liberados no sobrenadante da cultura de M ϕ peritoneais de camundongos foi avaliada. Os M ϕ tratados com 10 μ g/mL de PPV produziram mais NO, IL-1 β e IL6 que o controle negativo ($p < 0,05$) e, interessante, não houve aumento significativo na maior concentração de 100 μ g/mL. O PPV não aumentou a produção de TNF- α em nenhuma das concentrações testadas. O LPS foi utilizado como controle positivo e aumentou significativamente a liberação de todos os fatores dosados.

O NO produzido em grandes concentrações é, reconhecidamente, um mediador envolvido com a morte de células tumorais mediada por M ϕ de camundongos. O NO e o TNF- α juntos representam as armas mais eficazes que os M ϕ dispõem para matar as células tumorais (KLIMP *et al.*, 2002). Cui e colaboradores mostraram que M ϕ murino ativados foram capazes de induzir apoptose de maneira dependente de NO em uma linhagem tumoral de mastocitoma (P815) e independente de NO, mas dependente de TNF- α em uma linhagem fibroblástica não tumoral (L929) (CUI *et al.*, 1994). Os M ϕ ativados pelo PPV não produziram TNF- α , porém, mesmo sendo um mediador importante, observou-se efeito antitumoral *in vivo*. Isso não exclui o envolvimento deste mediador *in vivo*, porque é possível que esta citocina esteja sendo ativada de forma indireta através de outras citocinas liberadas no organismo murino.

A principal função da IL-1 assemelha-se a do TNF. Ela medeia a resposta inflamatória do indivíduo a infecções ou outros estímulos inflamatórios, porém não induz apoptose *per se* tal qual o TNF. As semelhanças se devem ao fato que essas duas citocinas levam a ativação de vias intracelulares de transcrição de genes semelhantes (ABBAS *et al.*, 2000). Assim como o TNF, a IL-1 está associada à migração de neutrófilos, indução de inflamação e coagulação em pequenas concentrações e, em quantidades maiores, ela também induz efeitos sistêmicos como febre e estimula a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado (Fig. 51).

Devido aos seus efeitos, a IL-6 pode ser uma citocina importante para estimulação indireta do sistema imune adquirido. A IL-6 é uma das citocinas pró-inflamatórias mais importantes na febre e nas respostas de fase aguda inclusive na produção de proteínas de fase aguda pelo fígado (SCHEPETKIN *et al.*, 2008). Ela também é importante na estimulação da imunidade adquirida desempenhando um papel crucial na diferenciação de células B em plasmócitos e secreção de IgG1, como também servindo de segundo sinal para ativação de linfócitos T (GARMAN *et al.*, 1987; KISHIMOTO *et al.*, 1992; RAYNAL *et al.*, 1989; RIECKMANN *et al.*, 1997). O PSK e o PSP apresentam uma gama de efeitos fisiológicos e a indução da liberação de IL-6, produção de IgG, ativação de M ϕ e CTL estão entre os principais efeitos da imunopotenciação produzida por estes PS (CUI e CHISTI, 2003).

O efeito antitumoral dos PS do cogumelo-do-sol (*Agaricus brasiliensis*) foi correlacionado com a modificação do MIT no modelo de adenocarcinoma de Ehrlich em camundongos (PINTO *et al.*, 2009). Uma das razões que estimulou a investigação do MIT neste trabalho foi justamente a ausência da liberação de TNF- α e IFN- γ *in vitro*. Eles encontraram que os PS desse fungo induziram um discreto aumento da produção de TNF- α e IFN- γ nas células infiltradas no tumor. Também foi vista uma inibição parcial da liberação de IL-10 tanto nas células infiltradas do tumor como nas células do baço em comparação aos animais com tumor não tratados. Além da modificação das citocinas, foi observado o aumento de células CD4+ e Mac-3+ relativo a células T auxiliares e M ϕ respectivamente (PINTO *et al.*, 2009). Os autores especularam que o efeito antitumoral observado deve estar relacionado à indução da migração seletiva de células imunocompetentes do baço para o tumor associado a uma modificação das citocinas do MIT (PINTO *et al.*, 2009).

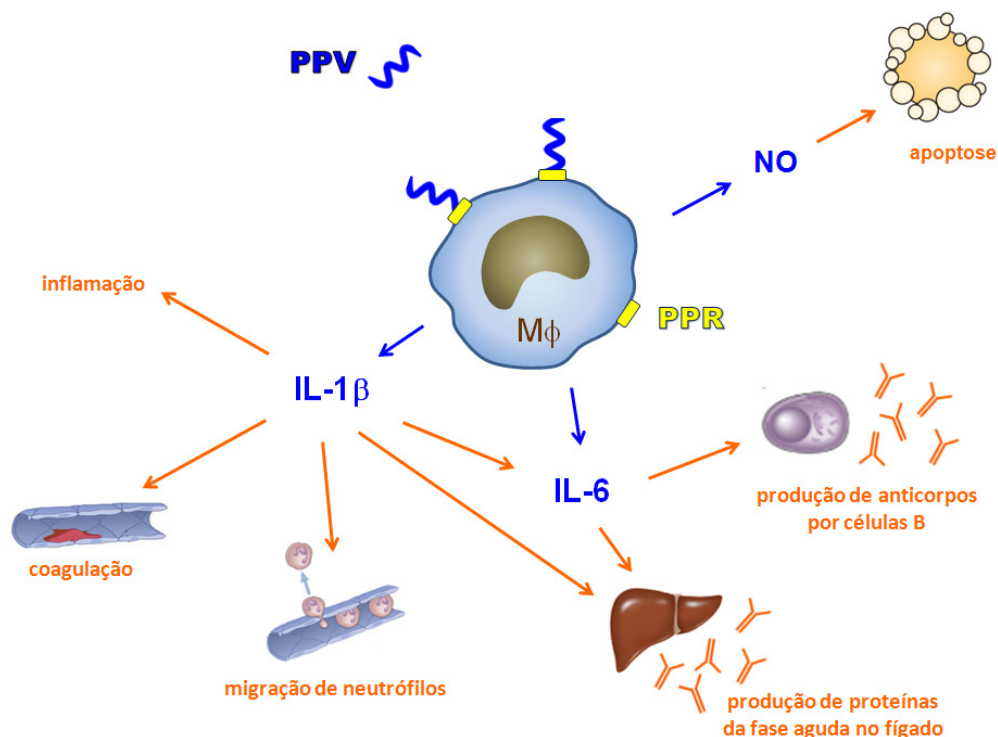


Figura 51 – Figura esquemática evidenciando os fatores liberados (em azul) pelos macrófagos (Mφ) ativados pelos polissacarídeos do *Protospalythoa variabilis* (PPV) e os efeitos possíveis no organismo (em laranja). A produção de IL-6 estimula o sistema imune inato e humoral adaptativo. O NO em altas concentrações é citotóxico contra as células tumorais. A IL-β é uma citocina característica de Mφ ativados e medeia diversas reações inflamatórias. PPR, receptor de reconhecimento de padrões (do inglês, *Patterns Recognition Receptor*).

Uma explicação possível para o resultado positivo para liberação de citocinas e NO com 10 µg/mL, mas não com 100 µg/mL é que uma concentração muito superior àquela efetiva pode estar causando dessensibilização dos receptores das células. Assim, os Mφ incubados com 100 µg/mL não responderam não produzindo fatores por terem sido dessensibilizados. Em um estudo realizado no Japão por de Tani e colaboradores, foi demonstrado que a lentinana é capaz de estimular LAK em uma faixa de concentração ótima entre 50 e 250 ng/mL (TANI *et al.*, 1993).

3.6 Conclusões

- Os polissacarídeos extraídos do *Protopalythoa variabilis* (PPV) possuem massa da ordem de 10^6 g/mol, grupos sulfato e um teor de 51% de proteínas

- O PPV não apresentou citotoxicidade direta contra células tumorais ou macrófagos *in vitro*;

- O PPV administrado intraperitonealmente induziu uma inibição do crescimento tumoral de 50% em camundongos com melanoma;

- A inibição tumoral foi correlacionada com efeitos imunoestimulantes do PPV como aumento do número de monócitos, indução da migração de neutrófilos e ativação de macrófagos peritoneais *in vitro*;

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O zoantídeo *Protopalythoa variabilis* é um organismo encontrado no mundo todo, porém nenhum estudo ressaltando o potencial farmacológico deste animal havia sido feito até este momento. A partir de evidências de uma potente atividade citotóxica em um estudo preliminar com zoantídeos dos gêneros *Protopalythoa* e *Palythoa*, nasceu a motivação para estudar mais aprofundadamente o potencial citotóxico do *P. variabilis*, uma espécie facilmente encontrada em diversas praias da costa cearense.

O estudo de purificação bioguiada do extrato hidroalcoólico bruto do zoantídeo *P. variabilis* revelou que esse organismo possui uma variedade de compostos citotóxicos. A suposta presença de PTX identificada pelo perfil de atividade hemolítica tempo-dependente no EHB e na fração mais polar, vem a ser o primeiro registro para espécies do gênero *Protopalythoa*, embora já tenha sido demonstrado que a presença desta toxina é comum em zoantídeos.

O isolamento dos α -aminoácidos lipídicos (**1a/1b**) figura como o primeiro registro da citotoxicidade e da obtenção de compostos desta classe a partir de uma fonte natural. Após vários ciclos de congelamento e descongelamento ao longo do estudo, os **1a/1b** sofreram degradação e diminuição da atividade impossibilitando aprofundamento maior dos estudos. Todavia, a possibilidade de os **1a/1b** poderem ser obtidos através de síntese abre uma perspectiva bastante atraente para o avanço dos estudos sobre o mecanismo de ação e, ao mesmo tempo, conveniente por dispensar necessidade de coletar mais exemplares desta espécie.

Na realidade essa possibilidade dar-se-á em pouco tempo, devido ao estabelecimento de uma colaboração para avaliação da citotoxicidade AALs sintéticos com o Dr. Istvan Toth, um pesquisador da Universidade de Queensland na Austrália, que trabalha com síntese de AALs e aplicações em vacinas. A síntese dos **1a** e **1b** encontra-se em andamento pelo grupo do Dr. Toth. Foram testados 14 diferentes AALs sintéticos dentre os quais 4 foram citotóxicos, porém com potência mil vezes menor que os AALs do *P. variabilis*. Essas moléculas também sofreram degradação, porém muito mais rapidamente, após 2 ciclos de congelamento-descongelamento.

Os PS obtidos do resíduo do EHB não apresentaram atividade citotóxica direta contra as células tumorais nem sinais de toxicidade nos animais tratados, porém exibiram efeito antitumoral significativo relacionado à imunomodulação. Os PS modificadores da resposta biológica são uma alternativa com casos já bem sucedidos na clínica como adjuvantes na quimioterapia do câncer para aumentar a eficiência e reduzir os efeitos colaterais. Diferentes características relacionadas à potente atividade imunomoduladora como alta massa molecular, sulfatação e ligação de proteínas foram encontradas no PPV. Devido a suas características estruturais favoráveis e efeitos observados, após o aprofundamento dos estudos de toxicidade e mecanismo de ação com estes PS, pode-se conjecturar a sua utilização como adjuvantes na quimioterapia do câncer.

Por fim, uma análise mais abrangente, demonstra que o zoantídeo *Protopalythoa variabilis* é uma fonte rica em compostos com promissoras atividades anticâncer. O presente trabalho também é uma parcela de contribuição no estudo do potencial farmacológico de organismos marinhos do litoral cearense exaltando sua biodiversidade pouco explorada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunoológico**. Rio de Janeiro, Elsevier, 2007. p. 29, 30, 39.

ADACHI, Y.; OHNO, N.; OHSAWA, M.; OIKAWA, S.; YADOMAE, T. Change of biological activities of (1-3)-beta-D-glucan from *Grifola frondosa* upon molecular weight reduction by heat treatment. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 38, p. 477-481, 1990a.

ADACHI, Y.; OHNO, N.; YADOMAE, T.; SUZUKI, Y.; OHSAWA, M.; OIKAWA, S. Thermal denaturation of (1->3)- β -D-glucans in neural aqueous solution above 130°: effect on physicochemical properties. **Carbohydr. Res.**, v. 198, p. 111-122, 1990b.

ADAM, J. K.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Immune responses in cancer. **Pharmacol. Ther.** v. 99, p. 113-132, 2003.

AKRAMIENE, D.; KONDROTAS, A.; DIDZIAPETRIENE, J.; KEVELAITIS, E. Effects of beta-glucans on the immune system. **Medicina**, v. 43, p. 597-606, 2007.

AL-KATIB, A. M.; SMITH, M. R.; KAMANDA, W. S.; PETTIT, G. R.; HAMDAN, M.; MOHAMED, A. N.; CHELLADURAI, B.; MOHAMMAD, R. M. Bryostatins 1 down-regulates mdrl and potentiates vincristine cytotoxicity in diffuse large cell lymphoma xenografts. **Clin. Cancer Res.**, v. 4, p. 1305-1314, 1998.

ALBANO, R. M.; MOURÃO, P. A. Isolation, fractionation, and preliminary characterization of a novel class of sulfated glycans from the tunic of *Styela plicata* (Chordata Tunicata). **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 758-765, 1986.

AUF, G.; CARPENTIER, A. F.; CHEN, L.; CLANCHE, C. L.; DELATTRE, G. Y. Implication of macrophages in tumor rejection induced by CpG-oligodeoxynucleotides without antigen. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 3540-3543, 2001.

BAI, R. L.; PETTIT, G. R.; HAMEL, E. Binding of dolastatin 10 to tubulin at a distinct site for peptide antimetabolic agents near the exchangeable nucleotide and vinca alkaloid sites. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 17141-17149, 1990.

BAILLY, C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. **Curr. Med. Chem.**, v. 7, p. 39-58, 2000.

BALKWILL, F. Chemokine biology in cancer. **Semin. Immunol.**, v. 15, p. 49-55, 2003.

BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 540-550, 2004.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, p. 539-545, 2001.

BEHENNA, D. C.; STOCKDILL, J. L.; STOLTZ, B. M. The biology and chemistry of the zonanamine alkaloids. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 47, p. 2365-2386, 2008.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Nucleosides of sponges. **J. Org. Chem.**, v. 16, p. 981-987, 1951.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J.; SWIFT, A. N. Contributions to the study of marine products. XXXI. Palysterol and other lipid components of sea anemones. **J. Org. Chem.**, v. 16, p. 1337-1344, 1951.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 303, p. 474-482, 1993.

BHAKUNI, D. S.; RAWAT, D. S. **Bioactive marine natural products**. New Delhi: Anamaya Publishers, 2006. p. 382.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W. P.; MUNRO, M. H.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 24, p. 31-86, 2007.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W. P.; MUNRO, M. H.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 25, p. 35-94, 2008.

BNET, findarticles.com. Disponível em:
<http://findarticles.com/p/articles/mi_m0EIN/is_/ai_108611542> Acesso em 2008.

BOONLARPPRADAB, C.; FAULKNER, D. J. Eurysterols A and B, cytotoxic and antifungal steroidal sulfates from a marine sponge of the genus *Euryspongia*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 846-848, 2007.

BORSIG, L. Antimetastatic activities of modified heparins: selectin inhibition by heparin attenuates metastasis. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 33, p. 540-546, 2007.

BORSIG, L.; WANG, L.; CAVALCANTE, M. C.; CARDILO-REIS, L.; FERREIRA, P. L.; MOURAO, P. A.; ESKO, J. D.; PAVAO, M. S. Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber. Effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 14984-14991, 2007.

BOSCOLO, H. K.; SILVEIRA, F. L. Reproductive biology of *Palythoa caribaeorum* and *Protopalythoa variabilis* (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea) from the southeastern coast of Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 65, p. 29-41, 2005.

BREMERS, A. J.; PARMIANI, G. Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments. **Crit. Ver. Oncol. Hematol.**, v. 34, p. 1-25, 2000.

BUGNI, T. S.; HARPER, M. K.; MCCULLOH, M. W. B.; REPPART, J.; IRELAND, C. M. Fractionated marine invertebrate extract libraries for drug discovery. **Molecules**, v. 13, p. 1372-1383, 2008a.

BUGNI, T. S.; RICHARDS, B.; BHOITE, L.; CIMBORA, D.; HARPER, M. K.; IRELAND, C. M. Marine natural product libraries for high-throughput screening and rapid drug discovery. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1095-1098, 2008b.

BUHTOJAROV, I. N.; SONDEL, P. M.; EICKHOFF, J. C.; RAKHMILEVICH, A. L. Macrophages are essential for antitumor effects against weakly immunogenic murine tumors induced by class B CpG-oligodeoxynucleotides. **Immunology**, v. 120, p. 412-423, 2006.

BUTLER, M.; DAWSON, M. **Cell culture Labfax**. New York: Academic Press, 1992. 268p.

CARTÉ, B. K. Biomedical potential of marine natural products. **Bioscience**, v. 46, p. 271-286, 1996.

CHASE, A.; CROSS, N. C. Signal transduction therapy in haematological malignancies: identification and targeting of tyrosine kinases. **Clin. Sci.**, v. 111, p. 233-249, 2006.

CLINICALTRIALS, National Institute of Health. Disponível em: <http://www.clinicaltrials.gov>. Acesso em 2009.

COLLINS, S. J. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. **Blood**, v. 70, p. 1233-1244, 1987.

COLLINS, S. J.; GALLO, R. C.; GALLAGHER, R. E. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. **Nature**, v. 270, p. 347-349, 1977.

COLOTTA, F.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, p. 1073-1081, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: hitórico e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 32, p. 703-716, 2009.

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

CUADROS, R.; MONTEJO DE GARCINI, E.; WANDOSELL, F.; FAIRCLOTH, G.; FERNANDEZ-SOUSA, J. M.; AVILA, J. The marine compound spisulosine, an inhibitor of cell proliferation, promotes the disassembly of actin stress fibers. **Cancer Lett.**, v. 152, p. 23-29, 2000.

CUI, J.; CHISTI, Y. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. **Biotechnol. Adv.**, v. 21, p. 109-122, 2003.

CUI, S.; REICHNER, J. S.; MATEO, R. B.; ALBINA, J. E. Activated macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. **Cancer Res.**, v. 54, p. 2462-2467, 1994.

CUVILLIER, O.; EDSALL, L.; SPIEGEL, S. Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 15691-15700, 2000.

CUVILLIER, O.; LEVADE, T. Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. **Blood**, v. 98, p. 2828-2836, 2001.

CUVILLIER, O.; LEVADE, T. Enzymes of sphingosine metabolism as potential pharmacological targets for therapeutic intervention in cancer. **Pharmacol. Res.**, v. 47, p. 439-445, 2003.

DAMONTE, E.; NEYTS, J.; PUJOL, C. A.; SNOECK, R.; ANDREI, G.; IKEDA, S.; WITVROUW, M.; REYMEN, D.; HAINES, H.; MATULEWICZ, M. C.; ET AL. Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 47, p. 2187-2192, 1994.

DATASUS, Banco de Dados do Sistema Único de Saúde. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em 2009.

DAVIDSON, S. K.; HAYGOOD, M. G. Identification of sibling species of the bryozoan *Bugula neritina* that produce different anticancer bryostatins and harbor distinct strains of the bacterial symbiont *Candidatus endobugula sertula*. **Biol. Bull.**, v. 196, p. 273-280, 1999.

DE FREITAS, J. C.; SAWAYA, M. I. Anomalies in sea-urchin egg development induced by a novel purine isolated from the sea-anemone *Bunodosoma caissarum*. **Toxicon**, v. 24, p. 751-755, 1986.

DE JONGE, M. J. A.; VAN DER GAAST, A.; PLANTING, A. S. T.; VAN DOORN, L.; LEMS, A.; BOOT, I.; WANDERS, J.; SATOMI, M.; VERWEIJ, J. Phase I and pharmacokinetic study of the dolastatin 10 analogue TZT-1027, given on days 1 and 8 of a 3-week cycle in patients with advanced solid tumors. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, p. 3806-3813, 2005.

DE SOUSA, A. P. A.; TORRES, M. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FILHO, F. D. R.; ALVES, A. P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Carbohydr. Polym.**, v. 69, p. 7-13, 2007.

DEBEUS, G.; CRISPIM, M. C. O turismo nas piscinas naturais de Picãozinho, João Pessoa, PB - Percepções, conflitos e alternativas. **Rev. Estudos Amb.**, v. 10, p. 21-32, 2008.

DERMIME, S.; ARMSTRONG, A.; HAWKINS, R. E.; STERN, P. L. Cancer vaccines and immunotherapy. **Br. Med. Bull.**, v. 62, p. 149-162, 2002.

DIEFENBACH, A.; RAULET, D. H. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. **Immunol. Rev.**, v. 188, p. 9-21, 2002.

DIOP, M.; LEUNG-TACK, D.; BRAEKMAN, J. C.; KORNPROBST, M. Composition en stérols de quatre zoanthaires du genre *Palythoa* de la presqu-île du Cap-Vert. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 14, p. 151-154, 1986.

DOWLATI, A.; LAZARUS, H. M.; HARTMAN, P.; JACOBBERGER, J. W.; WHITACRE, C.; GERSON, S. L.; KSENICH, P.; COOPER, B. W.; FRISA, P. S.; GOTTLIEB, M.; MURGO, A. J.; REMICK, S. C. Phase I and correlative study of combination bryostatin 1 and vincristine in relapsed B-cell malignancies. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, p. 5929-5935, 2003.

DUERDEN, J. E. Report on the actinians of Porto Rico (Investigations of the aquatic resources and fisheries of Porto Rico by the U.S. Fish Commission Steamer Fish Hawk in 1899). **Bull. U.S. Fish. Comm.**, v. 20, p. 323-374, 1902.

DUH, C. Y.; WANG, S. K.; CHU, M. J.; SHEU, J. H. Cytotoxic sterols from the soft coral *Nephthea erecta*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 1022-1024, 1998.

DUNLAP, W. C.; YAMAMOTO, M. Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 112, p. 105-114, 1995.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The three Es of cancer immunoediting. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 329-360, 2004.

EBBINGHAUS, S.; HERSH, E.; CUNNINGHAM, C. C.; O'DAY, S.; MCDERMOTT, D.; STEPHENSON, J.; RICHARDS, D. A.; ECKARDT, J.; HAIDER, O. L.; HAMMOND, L. A. Phase II study of synthadotin (SYN-D; ILX651) administered daily for 5 consecutive days once every 3 weeks (qdx5q3w) in patients (Pts) with inoperable locally advanced or metastatic melanoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 22, p. 7530 [Abstract], 2004.

EMA, European Medicine Agency. <http://www.emea.europa.eu>, capturado em 2009.

ERBA, E.; BERGAMASCHI, D.; BASSANO, L.; DAMIA, G.; RONZONI, S.; FAIRCLOTH, G. T.; D'INCALCI, M. Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. **Eur. J. Cancer**, v. 37, p. 97-105, 2001.

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

FANG, L.; LONSDORF, A. S.; HWANG, S. T. Immunotherapy for advanced melanoma. **J. Invest. Dermatol.**, v. 128, p. 2596-2605, 2008.

FARROW, B.; THOMAS, R. P.; WANG, X. F.; EVERS, B. M. Activation of conventional PKC isoforms increases expression of the pro-apoptotic protein Bad and TRAIL receptors. **Int. J. Gastrointest. Câncer**, v. 32, p. 63-72, 2002.

FAULKNER, D. J. Marine pharmacology. **Ant. Van Leeuwenh.**, v. 77, p. 135-145, 2000.

FÁVARO, O. C.; DE OLIVEIRA, M. M.; ROSSINI, M. A.; KAMAKURA, C. K.; PINTO, A. V.; PINTO, M. D. C. Seleção por meio de células KB de substâncias e extratos potencialmente ativos em quimioterapia do câncer. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 62, p. 299-302, 2004.

- FELING, R. H.; BUCHANAN, G. O.; MINCER, T. J.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus salinospora. **Angew. Chem. Int. Ed Engl.**, v. 42, p. 355-357, 2003.
- FENICAL, W. New pharmaceuticals from marine organisms. **Trends Biotechnol.**, v. 15, p. 339-341, 1997.
- FENICAL, W. Marine pharmaceuticals: past, present and future. **Oceanography**, v. 19, p. 11-119, 2006.
- FENICAL, W.; JENSEN, P. R.; PALLADINO, M. A.; LAN, K. S.; LLOYD, G. K.; POTTS, B. C. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, p. 2175-2180, 2009.
- FERREIRA, E. G.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; PORTELA, T. A.; SILVEIRA, E. R.; HAJDU, E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic activity of hydroethanolic extracts of sponges (Porifera) collected at Pedra da Risca do Meio Marine State Park, Ceará State, Brazil. **Porifera Res. Biod. Innov. Sust.**, v., p. 313-318, 2007.
- FRANZ, G. Polysaccharides: biopolymers with medicinal actions. **J. Pharm. Belg.**, v. 50, p. 87-93, 1995.
- FRELIN, C.; VAN RENTERGHEM, C. Palytoxin. Recent electrophysiological and pharmacological evidence for several mechanisms of action. **Gen. Pharmacol.**, v. 26, p. 33-37, 1995.
- FRENCH, K. J.; SCHRECENGOST, R. S.; LEE, B. D.; ZHUANG, Y.; SMITH, S. N.; EBERLY, J. L.; YUN, J. K.; SMITH, C. D. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. **Cancer Res.**, v. 63, p. 5962-5969, 2003.
- FUJIMOTO, S.; FURUE, H.; KIMURA, T.; KONDO, T.; ORITA, K.; TAGUISHI, T.; YOSHIDA, K.; OGAWA, N. Clinical outcome of postoperative adjuvant immunochemotherapy with schizophiran for patients with resectable gastric cancer: a randomized controlled study. **Eur. J. Cancer**, v. 27, p. 1114-1118, 1991.
- FUNEL, C.; BERRUE, F.; ROUSSAKIS, C.; FERNANDEZ RODRIGUEZ, R.; AMADE, P. New cytotoxic steroids from the Indian Ocean sponge *Axinella* cf. *bidderi*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 491-494, 2004.
- GALLAGHER, R.; COLLINS, S.; TRUJILLO, J.; MCCREDIE, K.; AHEARN, M.; TSAI, S.; METZGAR, R.; AULAKH, G.; TING, R.; RUSCETTI, F.; GALLO, R. C. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 54, p. 713-733, 1979.
- GANDRA, M.; CAVALCANTE, M.; PAVAO, M. Anticoagulant sulfated glycosaminoglycans in the tissues of the primitive chordate *Styela plicata* (Tunicata). **Glycobiology**, v. 10, p. 1333-1340, 2000.

GARMAN, R. D.; JACOBS, K. A.; CLARK, S. C.; RAULET, D. H. B-cell-stimulatory factor 2 ($\beta 2$ interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 7629-7633, 1987.

GAW, A.; MURPHY, M. J.; COWAN, R. A.; O'REILLY, D. S. T. J.; STEWART, M. J.; SHEPHERD, J. **Clinical Biochemistry: an illustrated colour**. Livingstone: Churchill, 2004. 188 p.

GINGRAS, D.; BOIVIN, D.; DECKERS, C.; GENDRON, S.; BARTHOMEUF, C.; BELIVEAU, R. Neovastat--a novel antiangiogenic drug for cancer therapy. **Anticancer Drugs**, v. 14, p. 91-96, 2003.

GOMEZ, S. G.; BUEREN, J. A.; FAIRCLOTH, G. T.; JIMENO, J.; ALBELLA, B. In vitro toxicity of three new antitumoral drugs (trabectedin, aplidin, and kahalalide F) on hematopoietic progenitors and stem cells. **Exp. Hematol.**, v. 31, p. 1104-1111, 2003.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 12, p. 56-58, 1981.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N nitrates] in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GU, L.; TSENG, S.; HORNER, R. M.; TAM, C.; LODA, M.; ROLLINS, B. J. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. **Nature**, v. 404, p. 407-411, 2000.

GUIDUCCI, C.; VICARI, A. P.; SANGALETTI, S.; TRINCHIERI, G.; COLOMBO, M. P. Redirecting *in vivo* elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. **Cancer Res.**, v. 65, p. 3437-3446, 2005.

GUPTA, K. C.; SCHEUER, P. J. Zoanthid sterols. **Steroids**, v. 13, p. 343-356, 1968.

HABERMANN, E.; AHNERT-HILGER, G.; CHHATWAL, G. S.; BERESS, L. Delayed haemolytic action of palytoxin general characteristics. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 649, p. 481-486, 1981.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discov. Today**, v. 8, p. 536-544, 2003.

HAN, C.; QI, J.; SHI, X.; SAKAGAMI, Y.; SHIBATA, T.; USHIDA, K.; OJIKI, M. Prostaglandins from a zoanthid: paclitaxel-like neurite-degenerating and microtubule-stabilizing activities. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 70, p. 706-711, 2006.

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

HARPER, M. K. B., T. S.; COPP, B. R.; JAMES, R. B.; LINDSAY, B. S.; RICHARDSON, A. D. **Introduction to the chemical ecology of marine natural products**. Boca Raton: CRS Press LLC, 2001. p. 3-8.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 13, p. 894-901, 2008.

HUNT, B.; VINCENT, A. C. Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceuticals. **Ambio**, v. 35, p. 57-64, 2006.

HUWILER, A.; ZANGEMEISTER-WITTKE, U. Targeting the conversion of ceramide to sphingosine 1-phosphate as a novel strategy for cancer therapy. **Crit. Ver. Oncol. Hematol.**, v. 63, p. 150-159, 2007.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em 2009.

IOANNOU, E.; ADBEL-RAZIK, A. F.; ZERVOU, M.; CHRISTOFIDIS, D.; ALEXI, X.; VAGIAS, C.; ALEXIS, M. N.; ROUSSIS, V. $5\alpha,8\alpha$ -epidioxyterols from the gorgonian *Eunicella cavolini* and the ascidian *Trididemnum inarmatum*: isolation and evaluation of their antiproliferative activity. **Steroids**, v. 74, p. 73-80, 2009.

ISHIDA, Y.; TAKAGI, K.; TAKAHASHI, M.; SATAKE, N.; SHIBATA, S. Palytoxin isolated from marine coelenterates. The inhibitory action on (Na,K)-ATPase. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 7900-7902, 1983.

ISHIHARA, Y.; FUJII, T.; IJIMA, H.; SAITO, K.; MATSUNAGA, K. The role of neutrophils as cytotoxic cells in lung metastasis: suppression of tumor cell metastasis by a biological response modifier (PSK). **In Vivo**, v. 12, p. 175-182, 1998.

ITO, K.; NAKAZATO, H.; KOIKIE, A.; TAKAGI, H.; SAKJI, S.; BABA, S.; MAI, M.; SAKAMOTO, J.; OHASHI, Y. Long term effect of 5-fluorouracil enhanced by intermittent administration of polysaccharide K after curative resection of colon cancer. A randomized controlled trial for 7-year follow-up. **Int. J. Colorectal Dis.**, v. 19, p. 157-164, 2004.

JÄNICKE, R. U.; SPRENGART, M. L.; WATI, M. R.; PORTER, A. G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with Apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 9357-9360, 1998.

JHA, R. K.; ZI-RONG, X. Biomedical compounds from marine organisms. **Mar. Drugs**, v. 2, p. 123-146, 2004.

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

JIMENEZ, P. C.; TEXEIRA, G. L. S.; WILKE, D. V.; NOGUEIRA, N. A. P.; HAJDU, E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic and antimicrobial activities in hydromethanolic extracts of sponges (Porifera) from the northeastern Brazilian Coast. **Arq. Cien. Mar.**, v. 37, p. 85-91, 2004.

JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; TAKEARA, R.; LOTUFO, T. M.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vannamei* (Tunicata: Ascidiacea). **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 151, p. 391-398, 2008.

JIMENO, J.; FAIRCLOTH, G.; SOUSA-FARO, J. M. F.; SCHEUER, P.; RINEHART, K. New marine derived anticancer therapeutics: a journey from the sea to clinical trials. **Mar. Drugs**, v. 1, p. 14-29, 2004a.

JIMENO, J.; LOPEZ-MARTIN, J. A.; RUIZ-CASADO, A.; IZQUIERDO, M. A.; SCHEUER, P. J.; RINEHART, K. Progress in the clinical development of new marine-derived anticancer compounds. **Anticancer Drugs**, v. 15, p. 321-329, 2004b.

JIN, S.; GORFAJN, B.; FAIRCLOTH, G.; SCOTTO, K. W. Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 6775-6779, 2000.

JORDAN, M. A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. **Curr. Med. Chem. Anticancer Agents**, v. 2, p. 1-17, 2002.

KAN, Y.; UEMURA, D.; HIRATA, Y.; ISHIGURO, M.; IWASHITA, T. Complete NMR signal assignment of palytoxin and N-acetylpalytoxin. **Tetrahedron Lett.**, v. 42, p. 3197-3202, 2001.

KANZAKI, A.; TAKEBAYASHI, Y.; REN, X. Q.; MIYASHITA, H.; MORI, S.; AKIYAMA, S.; POMMIER, Y. Overcoming multidrug drug resistance in P-glycoprotein/MDR1-overexpressing cell lines by ecteinascidin 743. **Mol. Cancer Ther.**, v. 1, p. 1327-1334, 2002.

KATOH, R.; OOSHIRO, M. Enhancement of antitumor effect of tegafur/uracil (UFT) plus leucovorin by combined treatment with protein-bound polysaccharide, PSK, in mouse models. **Cell. Mol. Immunol.**, v. 4, p. 295-299, 2007.

KAWABE, T. G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. **Mol. Cancer Ther.**, v. 3, p. 513-519, 2004.

KERR, J. F. R. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**, v. 181, p. 471-474, 2002.

KIJJOA, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and cosmetics from the sea. **Mar. Drugs**, v. 2, p. 73-82, 2004.

KIM, F.; SAKAGAMI, H.; TANUMA, S.; KONNO, K. Stimulation of interferon-gamma-induced human myelogenous leukemic cell differentiation by high molecular weight PSK subfraction. **Anticancer Res.**, v. 10, p. 55-58, 1990.

KIM, G. Y.; PARK, H. S.; NAM, B. H.; LEE, J. D. Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk. & M. A. Curtis). **Teng. Bioresour. Technol.**, v. 89, p. 81-87, 2003.

KIMURA, Y.; IIJIMA, S.; KATO, T.; TISUJIE, M.; NAOI, Y.; HAYASHI, T.; TANIGAWA, T.; YAMAMOTO, H.; KUROKAWA, E.; KIKKAWA, N.; MATSUURA, N. Usefulness of TS-1 and lentinan combination immunochemotherapy in advanced or recurrent gastric cancer pilot study aiming at a randomized trial. **Gan To Kagaku Ryoho.**, v. 30, p. 1125-1130, 2003.

- KINDLER, H. L.; TOTHY, P. K.; WOLFF, R.; MCCORMACK, R. A.; ABBRUZZESE, J. L.; MANI, S.; WADE-OLIVER, K. T.; VOKES, E. E. Phase II trials of dolastatin-10 in advanced pancreaticobiliary cancers. **Invest. New Drugs.**, v. 23, p. 489-493, 2005.
- KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; TAGA, T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. **Science**, v. 258, p. 593-597, 1992.
- KITAMURA, M.; SAGAWA, K.; TAKEHARA, M. Cosmetics containing α -amino fatty acids. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, v. 106, p. 395, 1987.
- KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G. E.; SCHERPHORF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 44, p. 143-161, 2002.
- KOKOTOS, G.; CONSTANTINOU-KOKOTOU, V.; NOULA, C.; NICOLAOU, A.; GIBBONS, W. A. Synthesis of lipidic amino acid and dipeptide inhibitors of human platelet phospholipase A₂. **Int. J. Peptide Protein Res.**, v. 48, p. 160-166, 1996a.
- KOKOTOS, G.; MARTIN, V.; CONSTANTINOU-KOKOTOU, V.; GIBBONS, W. A. Synthesis of medicinally useful lipidic α -amino acids, 2-amino alcohols and diamines. **Amino acids**, v. 11, p. 329-343, 1996b.
- KOLENDER, A. A.; MATULEWICZ, M. C.; CERESO, A. S. Structural analysis of antiviral sulfated alpha-D-(1 \rightarrow 3)-linked mannans. **Carbohydr. Res.**, v. 273, p. 179-185, 1995.
- KREPLER, C.; WACHECK, V.; STROMMER, S.; HARTMANN, G.; POLTERAUER, P.; WOLFF, K.; PEHAMBERGER, H.; JANSEN, B. CpG-oligonucleotides elicit antitumor responses in a human melanoma NOD/SCID xenotransplantation model. **J. Invest. Dermatol.**, v. 122, p. 387-391, 2004.
- KRESSEL, M.; GROSCURTH, P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labeling of fragmented DNA. **Cell Tissue Res.**, v. 278, p. 549-556., 1994.
- KRONCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, v. 376, p. 327-343, 1995.
- KTARI, L.; GUYOT, M. A cytotoxic oxysterol from the marine alga *Padina pavonica* (L.) Thivy. **J. Appl. Phycol.**, v. 11, p. 511-513, 1999.
- KULCSAR, G. Theoretical and literary evidence for the existence of the passive antitumor defence system. **Cancer Biother. Radiopharm.**, v. 12, p. 281-286, 1997.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Pathologic basis of disease**. Philadelphia: W B Saunders, 2004. p. 1525.
- KURACHI, K.; OHNO, N.; YADOMAE, T. Preparation and antitumor activity of hydroxyethylated derivatives of 6-branched (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan, SSG, obtained from the culture filtrate of *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 38, p. 2527-2531, 1990.

KURAMOTO, M.; YAMAGUCHI, K.; TSUJI, T.; UEMURA, D. Zoanthamines, antiosteoporotic alkaloids. In: FUSEYANI, N. Ed. **Drugs from the sea**. Basel: Karger, 2000. 158p.

LEUNG, M. Y.; LIU, C.; KOON, J. C.; FUNG, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunol. Lett.**, v. 105, p. 101-114, 2006.

LIMA, M. M. **Estudo do potencial citotóxico e antimicrobiano de dois antozoários (Cnidaria) dos gêneros *Protopalyythoa* e *Palythoa***. 2004. Monografia - Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

LIN, H. W.; WANG, Z. L.; WU, J. H.; SHI, N.; ZHANG, H. J.; CHEN, W. S.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LIN, A. S. Stelletins L and M, cytotoxic isomalabaricane-type triterpenes, and sterols from the marine sponge *Stelletta tenuis*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 1114-1117, 2007.

LINS, K. O.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P.; ALENCAR, N. M.; LIMA, M. W.; TORRES, V. M.; FARIAS, W. R.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **J. Appl. Toxicol.**, v. 29, p. 20-26, 2009.

LIU, C.; KLIN, Q.; GAO, Y.; YE, L.; XING, Y.; XI, T. Characterizations and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. **Carbohydr. Polym.**, v. 67, p., 2007.

LIU, Y.; ZHANG, W.; CHAN, T.; SAXENA, A.; XIANG, J. Engineered fusion hybrid vaccine of IL-4 gene-modified myeloma and relative mature dendritic cells enhances antitumor immunity. **Leuk. Res.**, v. 26, p. 757-763, 2002.

LONG, B. H.; CARBONI, J. M.; WASSERMAN, A. J.; CORNELL, L. A.; CASAZZA, A. M.; JENSEN, P. R.; LINDEL, T.; FENICAL, W.; FAIRCHILD, C. R. Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (Taxol). **Cancer Res.**, v. 58, p. 1111-1115, 1998.

LORENZI, T. F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. Rio de Janeiro: Medsi, 2006. 722 p.

LOS, M.; BUREK, C. J.; STROH, C.; BENEDYK, K.; HUG, H.; MACKIEWICZ, A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design. **Drug Discov. Today**, v. 8, p. 67-77, 2003.

LU, Y.; WANG, B.-L. The research progress of antitumor effectiveness of *Stichopus japonicus* acid mucopolysaccharide in north of China. **Am. J. Med. Sci.**, v. 337, p. 195-198, 2009.

MALPEZZI, E. L.; FREITAS, J. C. Antimitotic effect of an extract of the sea anemone *Bunodosoma caissarum* on sea urchin egg development. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 23, p. 811-814, 1990.

MANSOOR, T. A.; HONG, J.; LEE, C. O.; BAE, S. J.; IM, K. S.; JUNG, J. H. Cytotoxic sterol derivatives from a marine sponge *Homaxinella* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 331-336, 2005.

MANSOOR, T. A.; LEE, Y. M.; HONG, J.; LEE, C. O.; IM, K. S.; JUNG, J. H. 5,6:8,9-diepoxy and other cytotoxic sterols from the marine sponge *Homaxinella* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 131-134, 2006.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, p. 436-444, 2008.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol.**, v. 23, p. 549-555, 2002a.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes **Trends Immunol.**, v. 23, p. 549-555, 2002b.

MARINEBIOTECH, Marine Biotech. Disponível em: <http://www.marinebiotech.org>. Acesso em 2009.

MARINLIT, MarinLit Database, Department of Chemistry, University of Canterbury. Disponível em: <http://www.chem.canterbury.ac.nz/marinlit/marinlit.shtml>. Acesso em 2009.

MARTINEZ, E. J.; COREY, E. J. A new, more efficient, and effective process for the synthesis of a key pentacyclic intermediate for production of ecteinascidin and phthalascidin antitumor agents. **Org. Lett.**, v. 2, p. 993-996, 2000.

MAYER, B.; OBERBAUER, R. Mitochondrial regulation of apoptosis. **News Physiol. Sci.**, v. 18, p. 89-94, 2003.

MELLADO, M.; DE ANA, A. M.; MORENO, M. C.; MARTINEZ, C.; RODRIGUEZ-FRADE, J. M. A potential immune escape mechanism by melanoma cells through the activation of chemokine-induced T cell death. **Curr. Biol.**, v. 11, p. 691-696, 2001.

MENDOLA, D. Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: process development and economics. **Biomol. Eng.**, v. 20, p. 441-458, 2003.

MESTECKY, J.; NGUYEN, H.; CZERKINSKY, C.; KIYONO, H. Oral immunization: an update. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 24, p. 713-719, 2008.

MITOMI, T.; TSUCHIYA, S.; IJIMA, N.; ASO, K.; SUZUKI, K.; NISHIYAMA, K.; AMANO, T.; TAKAHASHI, T.; MURAYAMA, N.; OKA, H. Randomized, controlled study on adjuvant immunochemotherapy with PSK in curatively resected colorectal cancer. **Dis. Colon Rectum.**, v. 35, p. 123-130, 1992.

MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L.; SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 8, p. 69-85, 2009.

MOORE, R. E.; SCHEUER, P. J. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. **Science**, v. 172, p. 495-498, 1971.

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

MOURÃO, P. A.; BASTOS, I. G. Highly acidic glycans from sea cucumbers. Isolation and fractionation of fucose-rich sulfated polysaccharides from the body wall of *Ludwigothurea grisea*. **Eur. J. Biochem.**, v. 166, p. 639-645, 1987.

MOURÃO, P. A.; GIUMARAES, B.; MULLOY, B.; THOMAS, S.; GRAY, E. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. **Br. J. Haematol.**, v. 101, p. 647-652, 1998.

MOURÃO, P. A.; PEREIRA, M. S.; PAVÃO, M. S.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D. M.; MOWINCKEL, M. C.; ABILDGAARD, U. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. Sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 23973-23984, 1996.

MOURÃO, P. A.; PERLIN, A. S. Structural features of sulfated glycans from the tunic of *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). A unique occurrence of L-galactose in sulfated polysaccharides. **Eur. J. Biochem.**, v. 166, p. 431-436, 1987.

MUNRO, M. H.; BLUNT, J. W.; DUMDEI, E. J.; HICKFORD, S. J.; LILL, R. E.; LI, S.; BATTERSHILL, C. N.; DUCKWORTH, A. R. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. **J. Biotechnol.**, v. 70, p. 15-25, 1999.

NAVA, V. E.; CUVILLIER, O.; EDSALL, L. C.; KIMURA, K.; MILSTIEN, S.; GELMANN, E. P.; SPIEGEL, S. Sphingosine enhances apoptosis of radiation-resistant prostate cancer cells. **Cancer Res.**, v. 60, p. 4468-4474, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 1216-1238, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products from marine invertebrates and microbes as modulators of antitumor targets. **Curr. Drug Targets**, v. 7, p. 279-304, 2006.

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

NICOLAOU, A.; KOKOTOS, G.; CONSTANTINO-KOKOTOU, V.; CHARITOS, C.; NOULA, C.; VERGER, R.; GIBBONS, W. A. Synthesis and properties of novel lipopeptides and lipid mimetics. **J. Pep. Sci.**, v. 3, p. 291-298, 1997.

NICOLAOU, A.; KOKOTOS, G.; CONSTANTINO-KOKOTOU, V.; YORK, J.; GIBBONS, W. A. Lipidic mimetics as inhibitors of pancreatic phospholipase A₂. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 23, p. 614S, 1995.

NICOLAOU, K. C.; CHEN, J. S.; DALBY, S. M. From nature to the laboratory and into clinic. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, p. 2290-2303, 2009.

NICOLLETTI, I.; MAGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J. Immunol. Methods**, v. 139, p. 217-279, 1991.

NISHIWAKI, Y.; FURUSE, K.; FUKUOKA, M.; NIITANI, H.; ASAKAWA, M.; NAKAI, H.; SAKAI, S.; OGAWA, N. A randomized controlled study of PSK combined immuno-chemotherapy for adenocarcinoma of the lung. **Gan To Kagaku Ryoho**, v. 17, p. 131-136, 1990.

NOULA, C.; CONSTANTINO, V.; NICOLAOU, A.; GIBBONS, W. A.; KOKOTOS, G. Lipid mimetics as inhibitors of human phospholipase A₂. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 24, p. 303S, 1996.

OHTA, H.; SWEENEY, E. A.; MASAMUNE, A.; YATOMI, Y.; HAKOMORI, S.; IGARASHI, Y. Induction of apoptosis by sphingosine in human leukemia HL-60 cells: a possible endogenous modulator of apoptotic DNA fragmentation occurring during phorbol ester-induced differentiation. **Cancer Res.**, v. 55, p. 691-697, 1995.

OKAMURA, K.; SUZUKI, M.; CHIHARA, T.; FUJIWARA, A.; FUKUDA, T.; GOTO, S.; ICHINOHE, K.; JIMI, S.; KASAMATSU, T.; KAWAI, N. Clinical evaluation of schizophyllan combined with irradiation in patients with cervical cancer. A randomized study. **Cancer**, v. 58, p. 865-872, 1986.

OKU, N.; SATA, N. U.; MATSUNAGA, S.; UCHIDA, H.; FUSETANI, N. Identification of palytoxin as a principle which causes morphological changes in rat 3Y1 cells in the zoanthid *Palythoa aff. margaritae*. **Toxicon**, v. 43, p. 21-25, 2004.

ONUMA, Y.; SATAKE, M.; UKENA, T.; ROUX, J.; CHANTEAU, S.; RASOLOFONIRINA, N.; RATSIMALOTO, M.; NAOKI, H.; YASUMOTO, T. Identification of putative palytoxin as the cause of clueteoxism. **Toxicon**, v. 37, p. 55-65, 1999.

OOI, V. E. C.; LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Curr. Med. Chem.**, v. 7, p. 715-729, 2000.

OVODOV, I. Polysaccharides of flower plants: structure and physiological activity. **Bioorg. Khim.**, v. 24, p. 483-501, 1998.

PARKIN, D. M. Global cancer statistics in the year 2000. **Lancet Oncol.**, v. 2, p. 533-543, 2001.

PASIC, L.; SEPCIC, K.; TURK, T.; MACEK, P.; POKLAR, N. Characterization of parazoanthoxanthin A binding to a series of natural and synthetic host DNA duplexes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 393, p. 132-142, 2001.

- PAVÃO, M. S.; AIELLO, K. R.; WERNECK, C. C.; SILVA, L. C.; VALENTE, A. P.; MULLOY, B.; COLWELL, N. S.; TOLLEFSEN, D. M.; MOURÃO, P. A. Highly sulfated dermatan sulfates from Ascidians. Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 27848-27857, 1998.
- PAVÃO, M. S.; MOURÃO, P. A.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D. M. A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from ascidian. Its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 31027-31036, 1995.
- PETTIT, G. R.; DAY, J. F.; HARTWELL, J. L.; WOOD, H. B. Antineoplastic components of marine animals. **Nature**, v. 227, p. 962-963, 1970.
- PETTIT, G. R.; FUJI, Y.; HASLER, J. A.; SCHMIDT, J. M.; MICHEL, C. Isolation of palystatin 1-3 from the Indian ocean *Palythoa liscia*. **J. Nat. Prod.**, v. 45, p. 263-269, 1982a.
- PETTIT, G. R.; FUJII, Y.; HASLER, J. A.; SCHMIDT, J. M. Isolation and characterization of palystatins A-D. **J. Nat. Prod.**, v. 45, p. 272-276, 1982b.
- PETTIT, G. R.; HERALD, C. L.; DOUBEK, D. L.; HERALD, D. L.; ARNOLD, E.; CLARDY, J. Isolation and structure of bryostatin 1. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 104, p. 6846-6848, 1982c.
- PETTIT, G. R.; HERALD, C. L.; HOGAN, F. **Anticancer drug development**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 203-235.
- PETTIT, G. R.; KAMANO, M.; DUFRESNE, C.; CERNY, R. L.; HERALD, C. L.; SCHMIDT, J. M. Isolation and structure of the cytostatic linear depsipeptide dolastatin 15. **J. Org. Chem.**, v. 54, p. 6005-6006, 1989.
- PETTIT, G. R.; KAMANO, Y.; HERALD, C. L.; TUINMAN, A. A.; BOETTNER, F. E.; KIZU, H.; SCHMIDT, J. M.; BACZYNYKI, L.; TOMER, K. B.; BONTEMS, R. J. The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: dolastatin 10. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 109, p. 6883-6885, 1987.
- PHARMAMAR, Pharma Mar, Zeltia. Disponível em: <http://www.pharmamar.com>. Acesso em 2008.
- PINTO, A. V. F. D. S.; MARTINS, P. R.; ROMAGNOLI, G. G.; CAMPANELLI, A. P.; TEREZAN, A. P.; FILHO, E. R.; DA EIRA, A. F.; KANENO, R. Polysaccharide fraction of *Agaricus brasiliensis* avoids tumor-induced IL-10 production and changes the microenvironment of subcutaneous Ehrlich adenocarcinoma. **Cell Immunol.**, v. 256, p. 27-38, 2009.
- PLUNKETT, T. A.; MILES, D. W. 13. New biological therapies for breast cancer. **Int. J. Clin. Pract.**, v. 56, p. 261-266, 2002.
- POMIN, V.; MOURÃO, P. A. S. Structure, biology, evolution and medical importance of sulphated fucans and galactans. **Glycobiology**, v. 18, p. 1016-1027, 2008.

PREOBRAZHENSKY, S.; MALUGIN, A.; WENTZ, M. Flow cytometric assay for evaluation of the effects of the cell density on cytotoxic and induction of apoptosis. **Cytometry**, v. 43, p. 199-203, 2001.

PUCHALSKI, T. A.; RYAN, D. P.; GARCIA-CARBONERO, R.; DEMETRI, G. D.; BUTKIEWICZ, L.; HARMON, D.; SEIDEN, M. V.; MAKI, R. G.; LOPEZ-LAZARO, L.; JIMENO, J.; GUZMAN, C.; SUPKO, J. G. Pharmacokinetics of ecteinascidin 743 administered as a 24-h continuous intravenous infusion to adult patients with soft tissue sarcomas: associations with clinical characteristics, pathophysiological variables and toxicity. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 50, p. 309-319, 2002.

RAVAGNAN, L.; ROUMIER, T.; KROEMER, G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. **J. Cell. Physiol.**, v. 192, p. 131-137, 2002.

RAYNAL, M.-C.; LIU, Z.; HIRANO, T.; MAYER, L.; KISHIMOTO, T.; CHEN-KIANG, S. Interleukin 6 induces secretion of IgG1 by coordinated transcriptional activation and differential mRNA accumulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 8024-8028, 1989.

REIMAN, J. M.; KMIĘCIAK, M.; MANJILI, M. H.; KNUTSON, K. L. Tumor immunoeediting and immunosculpting pathways to cancer progression. **Semin. Cancer Biol.**, v. 17, p. 275-287, 2007.

RICHARDSON, P. G.; BARLOGIE, B.; BERENSON, J.; SINGHAL, S.; JAGANNATH, S.; IRWIN, D.; RAJKUMAR, S. V.; SRKALOVIC, G.; ALSINA, M.; ALEXANIAN, R.; SIEGEL, D.; ORLOWSKI, R. Z.; KUTER, D.; LIMENTANI, S. A.; LEE, S.; HIDESHIMA, T.; ESSELTINE, D.-L.; KAUFFMAN, M.; ADAMS, J.; SCHENKEIN, D. P.; ANDERSON, K. C. A Phase 2 Study of Bortezomib in Relapsed, Refractory Myeloma. **New Engl. J. Med.**, v. 348, p. 2609-2617, 2003.

RIECKMANN, P.; TUSCANO, J. M.; KEHRL, J. H. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in lymphocyte function. **Methods Enzimol.**, v. 11, p. 128-132, 1997.

RIELY, G. J.; GADGEEL, S.; ROTHMAN, I.; SAIDMAN, B.; SABBATH, K.; FEIT, K.; KRIS, M. G.; RIZVI, N. A. A phase 2 study of TZT-1027, administered weekly to patients with advanced non-small cell lung cancer following treatment with platinum-based chemotherapy. **Lung Cancer**, v. 55, p. 181-185, 2007.

RIHOVA, B. Immunomodulating activities of soluble synthetic polymer-bound drugs. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 54, p. 653-674, 2002.

RINEHART, K. L. Antitumor compounds from tunicates. **Med. Res. Rev.**, v. 20, p. 1-27, 2000.

RINEHART, K. L., JR.; GLOER, J. B.; HUGHES, R. G., JR.; RENIS, H. E.; MCGOVREN, J. P.; SWYNENBERG, E. B.; STRINGFELLOW, D. A.; KUENTZEL, S. L.; LI, L. H. Didemnins: antiviral and antitumor depsipeptides from a caribbean tunicate. **Science**, v. 212, p. 933-935, 1981.

ROBERTS, D. C.; VELLACCIO, F. Unusual amino acids in peptide synthesis. In: GROSS, E.; MEINHOFER, J. (Eds.). **The peptides, analysis, synthesis, biology**. New York: Academic Press, 1983. v. 5. p. 341-449.

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

ROSENBERG, S. A.; YANG, J. C.; TOPALIAN, S. L.; SCHAWARTZENTRUBER, D. J.; WEBER, J. S.; PARKINSON, D. R.; SEIPP, C. A.; EINHORN, J. H.; WHITE, D. E. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. **JAMA.**, v. 271, p. 907-913, 1994.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. B. **Zoologia dos invertebrados**. São Paulo: Rocca, 1996.

RYLAND, J. S.; LANCASTER, J. E. Revision of methods for separating species of *Protopalythoa* (Hexacorallia: Zoanthidea) in the tropical West Pacific **Invertebr. Syst.**, v. 17 p. 407-428, 2003.

SAGAWA, K.; TAKEHARA, M. Polishes. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, v. 107, p. 101, 1987a.

SAGAWA, K.; TAKEHARA, M. Surface improver for ceramics. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, v. 107, p. 284, 1987b.

SAKAGAMI, H.; AOKI, T.; SIMPSON, A.; TANUMA, S. Induction of immunopotential activity by a protein-bound polysaccharide, PSK (review). **Anticancer Res.**, v. 11, p. 993-999, 1991.

SAKAGAMI, H.; KIM, F.; KONNO, K. Stimulation of human peripheral blood polymorphonuclear cell iodination by PSK subfractions. **Anticancer Res.**, v. 10, p. 697-702, 1990.

SAKAI, R.; RINEHART, K. L.; KISHORE, V.; KUNDU, B.; FAIRCLOTH, G.; GLOER, J. B.; CARNEY, J. R.; NAMIKOSHI, M.; SUN, F.; HUGHES, R. G., JR.; GARCIA GRAVALOS, D.; DE QUESADA, T. G.; WILSON, G. R.; HEID, R. M. Structure-activity relationships of the didemnins. **J. Med. Chem.**, v. 39, p. 2819-2834, 1996.

SAKAKURA, C.; SWEENEY, E. A.; SHIRAHAMA, T.; HAKOMORI, S.; IGARASHI, Y. Suppression of bcl-2 gene expression by sphingosine in the apoptosis of human leukemic HL-60 cells during phorbol ester-induced terminal differentiation. **FEBS Lett.**, v. 379, p. 177-180, 1996.

SALCEDO, M.; CUEVAS, C.; ALONSO, J. L.; OTERO, G.; FAIRCLOTH, G.; FERNANDEZ-SOUSA, J. M.; AVILA, J.; WANDOSELL, F. The marine sphingolipid-derived compound ES 285 triggers an atypical cell death pathway. **Apoptosis**, v. 12, p. 395-409, 2006.

SALGALLER, M. L.; LODGE, P. A. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. **J. Surg. Oncol.**, v. 68, p. 122-138, 1998.

SÁNCHEZ, A. M.; MALAGARIE, C.; OLEA, N.; VARA, D.; CUEVAS, C.; DÍAZ-LAVIADA, I. Spisulosine (ES-285) induces prostate tumor PC-3 and LNCaP cell death by de novo synthesis of ceramide and PKC ζ activation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 584, p. 237-245, 2008.

SANTAFE, G.; PAZ, V.; RODRIGUEZ, J.; JIMENEZ, C. Novel cytotoxic oxygenated C29 sterols from the Colombian marine sponge *Polymastia tenax*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 1161-1164, 2002.

SASAKI, T.; UCHIDA, N. A.; UCHIDA, H.; TAKASUKA, N.; KAMIYA, H.; ENDO, Y.; TANAKA, M.; HAYASHI, T.; SHIMIZU, Y. Antitumor activity of aqueous extracts of marine animals. **J. Pharmacobiodyn.**, v. 8, p. 969-974, 1985.

SCHEPETKIN, I. A.; FAULKNER, C. L.; NELSON-OVERTON, L. K.; WILEY, J. A.; QUINN, M. T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. **Int. Immunopharmacol.**, v. 5, p. 1783-1799, 2005.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutical potential. **Int. Immunopharmacol.**, v. 6, p. 317-333, 2006.

SCHEPETKIN, I. A.; XIE, G.; KIRPOTINA, L. N.; KLEIN, R. A.; JUTILA, M. A.; QUINN, M. T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*. **Int. Immunopharmacol.**, v. 8, p. 1455-1466, 2008.

SEPCIC, K.; TURK, T.; MACEK, P. Anticholinesterase activity of the fluorescent zoanthid pigment, parazoanthoxanthin A. **Toxicon**, v. 36, p. 937-940, 1998.

SHEU, J. H.; HUANG, S. Y.; WANG, G. H.; DUH, C. Y. Study on cytotoxic oxygenated desmosterols isolated from the red alga *Galaxaura marginata*. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 900-903, 1997.

SHEU, J. H.; WANG, G. H.; SUNG, P. J.; DUH, C. Y. New cytotoxic oxygenated fucosterols from the brown alga *Turbinaria conoides*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 224-227, 1999.

SHIN, J. Y.; SONG, J. Y.; YUN, Y. S.; YANG, H. O.; RHEE, D. K.; PYO, S. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 24, p. 469-482, 2002.

SICA, A.; SCHIOPPA, T.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. Tumor associated macrophages are distinct M2 polarized population promoting tumor progression: potential target of anti-cancer therapy. **Eur. J. Cancer**, v. 42, p. 717-727, 2006.

SIMMONS, T. L.; ANDRIANASOLO, E.; MCPHAIL, K.; FLATT, P.; GERWICK, W. H. Marine natural products as anticancer drugs. **Mol. Cancer Ther.**, v. 4, p. 333-342, 2005.

SPIELER, R. Seaweed compound's anti-HIV efficacy will be tested in southern Africa. **Lancet**, v. 359, p. 1675, 2002.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to Cancer Drug Discovery. In: **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 1991. v. 6. p. 71-131.

SUKSAMRARN, A.; JANKAM, A.; TARNCHOMPOO, B.; PUTCHAKARN, S. Ecdysteroids from a Zoanthus sp. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 1194-1197, 2002.

SUZUKI, T.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; CIRELLI, A. F.; COVIAN, J. A.; YADOMAE, T. Preparation and biological activities of sulfated derivatives of (1---3)-beta-D-glucans. **J. Pharmacobiodyn.**, v. 14, p. 256-266, 1991.

TAGUCHI, T.; FURUE, H.; KIMURA, K.; KONDO, T.; HATTORI, T.; ITOH, I.; OGAWA, N. Results of phase III study of lentinan. **Gan To Kagaku Ryoho**, v. 12, p. 366-378, 1985.

TAKEARA, R.; JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; ODORICO DE MORAES, M.; PESSOA, C.; PEPORINE LOPES, N.; LOPES, J. L.; MONTEIRO DA CRUZ LOTUFO, T.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antileukemic effects of *Didemnum psammotodes* (Tunicata: Ascidiacea) constituents. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 151, p. 363-369, 2008.

TAKI, H.; OHISHI, K.; OKANO, A.; SUGA, T.; AKIYAMA, Y.; YAMASHITA, A. Antimetastatic effect of lentinan on liver metastasis of colon carcinoma (colon26): possible role of activated kupfer cells. **Int. J. Immunother.**, v. 11, p. 29-38, 1995.

TAKINO, H.; SAGAWA, K.; KITAMURA, N.; KITAMURA, M. Lubricants containig α -amino acids long fatty acids. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, v. 107, p. 161, 1987.

TANI, M.; TANIMURA, H.; YAMAUE, H.; TSUNODA, T.; IWAHASHI, M.; NOGUCHI, K.; TAMAI, M.; HOTTA, T.; MIZOBATA, S. Augmentation of lymphokine-activated killer cell activity by lentinan. **Anticancer Res.**, v. 13, p. 1773-1776, 1993.

TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; CHABUT, D.; ZIERER, M.; MATOU, S.; HELLEY, D.; BROS, A.; MOURAO, P. A.; FISCHER, A. M. A fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm modulates in vitro fibroblast growth factor 2-dependent angiogenesis. **Cancer Res.**, v. 1, p. 96-102, 2002.

TARI, K.; SATAKE, I.; NAKAGOMI, K.; OZAKA, K.; OOWADA, F.; HIGASHI, Y.; NEGISHI, T.; YAMADA, T.; SAITO, H.; YOSHIDA, K. Effect of lentinan for advanced prostate carcinoma. **Hinyokika Kiyo**, v. 40, p. 119-123, 1994.

TER HAAR, E.; KOWALSKI, R. J.; HAMEL, E.; LIN, C. M.; LONGLEY, R. E.; GUNASEKERA, S. P.; ROSENKRANZ, H. S.; DAY, B. W. Discodermolide, A Cytotoxic Marine Agent That Stabilizes Microtubules More Potently Than Taxol,. **Biochemistry**, v. 35, p. 243-250, 1996.

TORISU, M.; HAYASHI, Y.; ISHIMITSU, T.; FUJIMURA, T.; IWASAKI, K.; KATANO, M.; YAMAMOTO, H.; KIMURA, Y.; TAKESUE, M.; KONDO, M. Significant prolongation of disease-free period gained by oral polysaccharide K (PSK) administration after curative surgical operation of colorectal cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 31, p. 261-268, 1990.

TOSTESON, M. T.; HALPERIN, J. A.; KISHI, Y.; TOSTESON, D. C. Palytoxin induces an increase in the cation conductance of red cells. **J. Gen. Physiol.**, v. 98, p. 969-985, 1991.

TOTH, I. A novel chemical approach to drug delivery: lipidic amino acids conjugates. **J. Drug Targeting**, v. 2, p. 217-239, 1994.

TOTH, I.; DANTON, M.; FLINN, N.; GIBBONS, W. A. A combined adjuvant and carrier system for enhancing synthetic peptides immunogenicity utilising lipidic amino acids. **Tetrahedron Lett.**, v. 34, p. 3925-3928, 1993.

TURK, T.; MACEK, P.; SUPUT, D. Inhibition of acetylcholinesterase by a pseudozoanthoxanthin-like compound isolated from the zoanthid *Parazoanthus axinellae* (O. Schmidt). **Toxicon**, v. 33, p. 133-142, 1995.

TWENTYMAN, P. R.; FOX, N. E.; REES, J. K. Chemosensitivity testing of fresh leukaemia cells using the MTT colorimetric assay. **Br. J. Haematol.**, v. 71, p. 19-24, 1989.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide Immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 523-533, 2000.

URDIALES, J. L.; MORATA, P.; NUNEZ DE CASTRO, I.; SANCHEZ-JIMENEZ, F. Antiproliferative effect of dehydridemnin B (DDB), a depsipeptide isolated from Mediterranean tunicates. **Cancer Lett.**, v. 102, p. 31-37, 1996.

VARELA, C.; GUITART, B.; ORTIZ, M.; LALANA, R. Los zoantídeos (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthiniaria), de la región occidental de cuba. **Rev. Invest. Marinas**, v. 3, p. 179-184, 2002.

VERA, M. D.; JOULLIE, M. M. Natural products as probes of cell biology: 20 years of didemnin research. **Med. Res. Rev.**, v. 22, p. 102-145, 2002.

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

VILANOVA, E.; COUTINHO, C. C.; MOURAO, P. A. Sulfated polysaccharides from marine sponges (Porifera): an ancestor cell-cell adhesion event based on the carbohydrate-carbohydrate interaction. **Glycobiology**, v. 19, p. 860-867, 2009.

VILLAR, R. M.; GIL-LONGO, J.; DARANAS, A. H.; SOUTO, M. L.; FERNANDEZ, J. J.; PEIXINHO, S.; BARRAL, M. A.; SANTAFE, G.; RODRIGUEZ, J.; JIMENEZ, C. Evaluation of the effects of several zoanthamine-type alkaloids on the aggregation of human platelets. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 11, p. 2301-2306, 2003.

VLIEGENTHART, J. F. G. Carbohydrate based vaccines. **FEBS Lett.**, v. 580, p. 2945-2950, 2006.

WANG, L. M.; LI, Q. Y.; ZU, Y. G.; FU, Y. J.; CHEN, L. Y.; LV, H. Y.; YAO, L. P.; JIANG, S. G. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of CPT13, a novel camptothecin analog, on human colon cancer HCT8 cell line. **Chem. Biol. Interact.**, v. 176, p. 165-172, 2008.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 60, p. 258-274, 2002.

- WENDER, P. A.; BARYZA, J. L.; BRENNER, S. E.; CLARKE, M. O.; CRASKE, M. L.; HORAN, J. C.; MEYER, T. Function oriented synthesis: the design, synthesis, PKC binding and translocation activity of a new bryostatin analog. **Curr. Drug Discov. Technol.**, v. 1, p. 1-11, 2004.
- WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ARAÚJO, R. M.; DA SILVA, W. M. B.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic lipidic α -amino acids from the zoanthid *Protopalycha variabilis* from the northeastern coast of Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, p. 1455-1459, 2009.
- WILLIAMS, J. A.; DAY, M.; HEAVNER, J. E. Ziconotide: an update and review. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 9, p. 1575-1583, 2008.
- WILLIAMS, O. Flow cytometry-based methods for detection in lymphoid cells. In: BRADY, H. J. M. Ed. **Apoptosis methods and protocols**, Totowa: Humana Press, 2004. v. 282. p. 304.
- XU, S.; LIAO, X.; DU, B.; ZHOU, X.; HUANG, Q.; WU, C. A series of new 5,6-epoxysterols from a Chinese sponge *Ircinia aruensis*. **Steroids**, v. 73, p. 568-573, 2008.
- YAMAMOTO, I.; TAKAHASHI, M.; SUZUKI, T.; SEINO, H.; MORI, H. Antitumor effect of seaweeds. IV. Enhancement of antitumor activity by sulfation of a crude fucoidan fraction from *Sargassum kjellmanianum*. **Jpn. J. Exp. Med.**, v. 54, p. 143-151, 1984.
- ZEITLIN, L.; WHALEY, K. J.; HEGARTY, T. A.; MOENCH, T. R.; CONE, R. A. Tests of vaginal microbicides in the mouse genital herpes model. **Contraception**, v. 56, p. 329-335, 1997.
- ZEWAIL-FOOTE, M.; LI, V. S.; KOHN, H.; BEARSS, D.; GUZMAN, M.; HURLEY, L. H. The inefficiency of incisions of ecteinascidin 743-DNA adducts by the UvrABC nuclease and the unique structural feature of the DNA adducts can be used to explain the repair-dependent toxicities of this antitumor agent. **Chem. Biol.**, v. 8, p. 1033-1049, 2001.
- ZITVOGEL, L.; APETO, L.; GHIRINGHELLI, F.; KROEMER, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 59-73, 2008.
- ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 715-727, 2006.
- ZOU, W.; MACHELON, V.; COULOMB-L'HERMIN, A.; BORVAK, J.; NOME, F.; ISAEVA, T.; WEI, S.; KRZYSIEK, R.; DURAND-GASSELIN, I.; GORDON, A.; PUSTILNIK, T.; CURIEL, D. T.; GALANAUD, P.; CAPRON, F.; EMILIE, D.; CURIEL, T. J. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. **Nat. Med.**, v. 7, p. 1339-1346, 2001.

ANEXO I

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 20, No. 8, 1455-1459, 2009.
 Printed in Brazil - ©2009 Sociedade Brasileira de Química
 0103 - 5053 \$6.00+0.00

Article

**Cytotoxic Lipidic α -amino Acids from the Zoanthid *Protopalythoa variabilis*
 from the Northeastern Coast of Brazil**

Diego Veras Wilke,^a Paula Christine Jimenez,^a Claudia Pessoa,^a Manoel Odorico de Moraes,^a
 Renata Mendonça Araújo,^b Wildson Max Barbosa da Silva,^b Edilberto Rocha Silveira,^b Otilia Deusdênia
 Loiola Pessoa,^b Raimundo Braz-Filho,^b Norberto Peporine Lopes^c and Letícia Veras Costa-Lotufo^{*a}

^aDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará,
 60430-270 Fortaleza-CE, Brazil

^bDepartamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 60021-940 Fortaleza-CE, Brazil

^cDepartamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto,
 Universidade de São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto-SP, Brazil

Dois α -aminoácidos lipídicos **1a** e **1b** foram isolados do zoantídeo *Protopalythoa variabilis* através de fracionamento guiado pela atividade citotóxica. As estruturas foram determinadas por diferentes métodos espectroscópicos, tais como, RMN (ressonância magnética nuclear) ¹H e ¹³C, IV (infravermelho) e espectrometria de massa de alta resolução (modo positivo). A atividade citotóxica dos extratos, das frações e **1a/1b** foi avaliada *in vitro* através do teste do MTT contra quatro linhagens de células tumorais. Este achado tem implicações biológicas e químicas importantes para essa classe de compostos. Este é o primeiro relato de α -aminoácidos lipídicos a partir de uma fonte natural, bem como de sua atividade citotóxica.

Two lipidic α -amino acids **1a** and **1b** were isolated from the zoanthid *Protopalythoa variabilis* using a bioguided fractionation for cytotoxic activity. The structures of the metabolites were determined by spectroscopic methods, including NMR (nuclear magnetic resonance) ¹H e ¹³C, IR (infrared) and high resolution mass spectrometry (positive mode). The cytotoxic activity of the crude extract, as well as of the mixture of **1a** and **1b** were measured *in vitro* using the MTT assay for four human tumor cell lines. This finding has important biological and chemical implications for this type of compound. This is the first report of lipidic α -amino acids from natural sources, as well as of their cytotoxic activity.

Keywords: *Protopalythoa variabilis*, lipidic α -amino acids, cytotoxic activity

Introduction

Cnidarians produce a wide variety of compounds showing biological activities, such as antineoplastic,¹ antioxidant,² osteoporosis suppression³ and anti-acetylcholinesterase.⁴ The most prolific ones are soft bodied sessile corals, such as gorgonians and zoanthids.⁵ Palytoxin, the most potent non-proteic toxin known, was first isolated from the zoanthid *Palythoa toxica*.⁶ Despite the interest of the chemical community due to the complexity of palytoxin molecule, it is a useful tool for probing cellular processes involving sodium as a second messenger, since it binds in Na⁺, K⁺-ATPase and transforms the pump into a channel permeable to monovalent cations.^{7,8} Moreover, new

steroids^{9,10} and zoanthamine alkaloids, some of them with potent biological activity,¹¹⁻¹⁵ were also isolated from species of the Zoanthidae family. Herein, in the continuing search to discover anticancer agents from marine sources¹⁶⁻¹⁹ we have investigated the zoanthid *Protopalythoa variabilis* Duerden 1898, an abundant cnidarian at the coast of Ceará State, northeast of Brazil.

In this paper the isolation and identification of two new lipidic α -amino acids (**1a** and **1b**, Figure 1) from the zoanthid *Protopalythoa variabilis* is described. The literature describes the lipidic α -amino acids (LAAs) as non-natural amino acids with long saturated, or unsaturated, aliphatic chains. Although highly lipophilic, these compounds still have polar behavior showing chemical and conformational characteristics of amino acids and peptides.²⁰⁻²² The potential use of LAAs in industries is

*e-mail: lvcosta@secrel.com.br; lvcosta@ufc.br

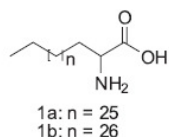


Figure 1. Chemical structures of the lipidic α -amino acids from *Protopalychia variabilis*.

wide as lubricants,²³ cosmetics,²⁴ polishes²⁵ and surface improvers for ceramics.²⁶ They are also medicinally useful. LAA amides with saturated or unsaturated long chain amines as well as LAA esters with saturated or unsaturated long chain alcohols, both have been synthesized.²⁷ These compounds inhibited both porcine pancreatic²⁸ and human platelet phospholipase A2 (PLA2)²⁷ being potential antiinflammatory agents. LAAs and their oligomers have been suggested to work as a drug delivery system.²⁹ A Lipid-Core-Peptide system has been designed and used as a combined adjuvant-carrier-vaccine system.³⁰

Results and Discussion

In preliminary experiments, an aqueous-MeOH extract from *Protopalychia variabilis* showed a potent cytotoxic activity. After a liquid-liquid partitioning, the biological activity was distributed among all fractions, but the hexane phase and the aqueous-MeOH residue demonstrated higher cytotoxicity as shown on Table 1. Comparative TLC (thin layer chromatography) showed some common spots in all fractions suggesting the presence of common compounds distributed among all fractions. Due to the higher activity and larger yield, the hexane fraction was chosen for further analytical separation procedures.

From the hexane fraction, a greasy solid named PV-Hex SII was obtained by successive solubilization/precipitation with $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ at different proportions of solvents using different sample concentrations. Part of this solid was soluble in pyridine- d_5 , and after the solvent evaporation afforded the most active fraction designated PV-Hex-SIIS. This fraction showed a purple color when reacted with a 0.1% EtOH solution of ninyhydrine on TLC plates. Its IR spectrum showed absorptions bands at 1633 and 1413 ($-\text{COO}^-$) and 1644 and 1462 ($-\text{NH}_3^+$), characteristic of amino acids. The very simple ^1H NMR spectrum of PV-Hex SIIS exhibited only a signal at δ 3.57 (br t, H-2), typical of a nitrogenated methine, an intense and broad signal at δ 1.27, consistent with the long methylene moiety, and a broad triplet at δ 0.88 characteristic of the terminal methyl of fatty chains. The ^{13}C NMR (CPD composite pulse decoupling and DEPT 135) spectra revealed a signal at δ 54.7 (C-2) for the aminated α -carbon, which in the HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence)

spectrum showed correlation with the signal at δ 3.57 (H-2), highly suggestive of an α -amino acid moiety, in addition to multiple carbon signals between δ 32.5 to 23.3 (long chain methylenes) and a carbon signal at δ 14.6 for the terminal methyl, suggesting the presence of a long alkyl chain. Despite the non observation of the carboxyl carbon in the ^{13}C NMR spectrum, these spectroscopic data suggested that the compounds of the PV-Hex SIIS were aliphatic amino acids. Indeed, the HR-ESI-TOF (positive ion mode) spectrum of this sample showed some cationized ions at m/z 490.4566 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ indicating the molecular formula $\text{C}_{30}\text{H}_{61}\text{NO}_2$ for **1a**, while the ion peak at m/z 504.4706 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ was in agreement with the molecular formula $\text{C}_{31}\text{H}_{63}\text{NO}_2$ for **1b**.

Additionally, the structures were confirmed after preparation of the methyl ester mixture (**1a'**/**1b'**) and its correspondent N-acetyl methyl ester derivatives (**1a''**/**1b''**). The HMBC (heteronuclear multiple-bond connectivity) spectrum of the methyl ester clearly revealed a correlation for the amino hydrogens (δ 2.31) with the carbonyl carbon (δ 176.6), as well as with the methylene carbons at δ 30.8 (C-3) and 26.2 (C-4). Furthermore, a long-range coupling was also observed between the methyl ester group (δ 3.65) with the carbonyl carbon. Further support to the structures of **1a**/**1b** was obtained after acetylation of the methyl ester mixture **1a'**/**1b'**. A signal at δ 2.19 in the ^1H NMR spectrum of the acetylated methyl esters confirmed the N-acetylation of both **1a'**/**1b'**. Therefore, the structures of **1a**/**1b** could be unambiguously established.

Conclusions

There are three major points of chemical and biological implications that can be raised from these findings. First, there is no previous report on LAAs isolation from natural sources. Second, the number of carbon atoms for already known synthetic LAAs ranges from eight to twenty four²² what is different for the ones reported here. Third, the cytotoxic activity of LAAs has never been reported in the literature.

Experimental

General Experimental Procedures

IR spectrum (film on NaCl discs) was recorded using a Perkin-Elmer FT-IR 1000 spectrometer. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DRX-500 (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C) spectrometer using pyridine- d_5 as solvent. Chemical shifts, given on the δ scale, were referenced to the residual undeuterated portion of the deuterated solvent

for proton (δ_{H} 8.74, 7.58, 7.22) and the center peak of the deuterated pyridine carbons (δ_{C} 150.35, 135.91, 123.87). High resolution mass spectrometry were measured on a quadrupole-time of flight instrument (UltrTOF-Q, Bruker Daltonics, Billerica, MA). The analyses were performed in positive ion ESI mode at a capillary voltage of 3400 V and N_2 drying gas temperature of 180 °C. NaTFA 10 mM was used as a standard for internal and external calibration. TLC was performed on precoated silica gel polyester sheets (kieselgel 60 F₂₅₄, 0.20 mm, Merck). The compounds were detected by spraying with an EtOH solution of 0.1% ninyhydrine.

Biological Material Collection and Identification

Protopalythoa variabilis colonies were manually collected at Paracuru beach (Paracuru, Ceará State, Brazil) at the intertidal zone during low tide. Voucher specimens (N° 000975), identified by Dr. Antonio Carlos Marques have been deposited at the Zoological Museum of the University of São Paulo (Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo - MZUSP).

Extraction and Bioguided Fractionation

A large amount of colonies of *Protopalythoa variabilis* after collection was stored in plastic coolers containing crushed ice and immediately transported to the laboratory. The contaminants (little rock pieces and algae specimens) were removed from the colonies. The material was weighted (11.3 kg), blended and soaked with MeOH (2 × 5L) during 48 h at 10 °C. After filtration, the MeOH extract was

evaporated under reduced pressure at 45 °C to approximately 400 mL of an aqueous suspension (named PV-HE) to which an equal amount of MeOH was added and liquid partitionated with hexane, followed by partition with CH_2Cl_2 and finally with EtOAc. After solvent evaporation, 1.6 g of PV-Hex, 178.2 mg of PV- CH_2Cl_2 , 1.2 g of PV-EtOAc and 41.4 mg of PV-MeOH/ H_2O extracts were obtained. All fractions were biologically assayed showing cytotoxicity, but PV-Hex and PV-MeOH/ H_2O were the most actives (see data on Table 1). Due to its higher amount PV-Hex was chosen for further purification through high performance liquid chromatography (HPLC) analysis, but this procedure was not successful due to the poor solubility of this fraction. The treatment of PV-Hex with a mixture of $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) yielded an inactive precipitate (548 mg), while the soluble part (PV-Hex S, 680 mg) retained and improved the cytotoxic activity. The PV-Hex S was only partially soluble in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (8:2), being the stronger activity observed for the insoluble residue (PV-Hex SII, 90 mg). The solubility of this solid was systematically investigated using deuterated solvents, and only the soluble fraction obtained in pyridine- d_5 (PV-Hex SIIS, 26.7 mg) revealed a much stronger cytotoxic activity than all other tested fractions (see Table 1). ^1H and ^{13}C NMR analysis of PV-Hex SIIS revealed it to be a mixture of **1a** and **1b**, as confirmed by HRESIMS (high resolution electrospray ionization mass spectrometry).

Lipidic α -amino acids (1a/1b): Brown wax, IR ν cm^{-1} 3390, 2924, 2853, 1644, 1633, 1462, 1413; ^1H NMR (pyridine- d_5 , 500 MHz) 0.88 (br s, H-30/H-31), 1.27 (br s, methylene hydrogens), 3.57 (br s, H-2); ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , 125 MHz) 54.7 (C-2), 32.4 (C-28), 30.4

Table 1. Cytotoxic activity of PV-HE, its derivative fractions and PV-Hex-SIIS on tumor cell lines evaluated by the MTT, assay for 72 h incubation. Data are presented as IC_{50} with their CI 95% values by non-linear regression. Experiments were performed in triplicate. N.T. not tested

Samples	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) CI 95%			
	HL-60	HCT-8	SF-295	MDA-MB-435
Doxorubicin	0.02 0.01 – 0.02	0.04 0.03 – 0.05	0.24 0.17 – 0.36	0.48 0.34 – 0.66
PV-HE	0.40 0.27 – 0.59	0.36 0.09 – 1.38	4.24 3.25 – 5.52	0.73 0.48 – 1.09
PV-MeOH/ H_2O	0.76 0.62 – 0.94	0.40 0.32 – 0.49	0.49 0.40 – 0.59	0.085 0.02 – 0.41
PV-EtOAc	2.94 1.94 – 4.46	2.25 1.26 – 4.02	1.85 1.29 – 2.65	1.42 1.08 – 1.87
PV- CH_2Cl_2	5.43 4.86 – 6.07	2.67 2.19 – 3.24	2.95 2.68 – 3.25	2.82 2.40 – 3.29
PV-Hex	0.43 0.39 – 0.47	0.24 0.22 – 0.27	0.29 0.25 – 0.33	0.38 0.34 – 0.43
PV-Hex SIIS (1a/1b)	0.13 0.12-0.14	0.05 0.05-0.06	0.07 0.06-0.08	N.T.

(C-5/C-27), 29.9 (C-3), 26.8 (C-4), 23.3 (C-29/C-30), 14.6 (C-30/C-31); HR-ESI-TOFMS (**1a**) m/z 490.4566 [M + Na]⁺ (calcd. for C₃₀H₆₁NO₂Na, 490.4599); (**1b**) m/z 504.4706 [M + Na]⁺ (calcd. for C₃₁H₆₃NO₂Na, 504.4756).

Methylation of 1a/1b: An aliquot (4.0 mg) of the lipidic α -amino acids (**1a/1b**) was dissolved in MeOH with catalytic amounts of HCl, and stirred under reflux during 4 hours. Usual work-up afforded **1a'/1b'** (4.2 mg). ¹H NMR (pyridine-d₅, 500 MHz) 0.93 (t, $J = 6.45$ Hz, H-30/H-31), 1.32 (br s, methylene hydrogens), 2.31 (NH₂), 3.66 (br s, H-2), 3.65 (s, OCH₃); ¹³C NMR (pyridine-d₅, 125 MHz) 176.6 (C-1), 52.1 (C-2), 33.2 (C-28), 30.8-23.8 (C-3/C-29), 14.6 (C-30/C-31).

Acetylation of 1a'/1b': This material was dissolved in a mixture of pyridine/acetic anhydride 1:2 (1 mL) and stirred for 24 h at room temperature. After this, the reaction mixture was neutralized with a solution of HCl 1 mol L⁻¹ (4 drops) and extracted with CH₂Cl₂ (4 x 10 mL). The CH₂Cl₂ layer was evaporated under reduced pressure to yield **1a''/1b''** (4.2 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) 0.89 (br t), 1.27 (br s, methylene hydrogens), 2.19 (s), 3.68 (s, OCH₃).

Cytotoxic assay

The cytotoxic potential of the extract and of all derived fractions was evaluated against four tumor cell lines (National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA): HCT-8 (human colon), MDA-MB-435 (melanoma), SF-295 (CNS glioblastoma) and HL-60 (leukemia) using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium (MTT) assay described by Mosmann³¹ after 72 h incubation. Doxorubicin was used as positive control.

Acknowledgment

The authors would like to acknowledge the financial support in the form of grants and/or fellowships from the following Brazilian agencies: CNPq, FINEP and Institute Claude Bernard (InCB). The authors are grateful to Antonio Carlos Marques, from University of São Paulo for taxonomic identification of the zoanthid. The technical assistance of Silvana França is gratefully acknowledged.

Supporting Information Available

Supplementary information for compounds **1a** and **1b** is available free of charge as PDF file at <http://jbcs.sbq.org.br>.

References

- Pettit, G.; Fuji, Y.; *J. Nat. Prod.* **1982**, *45*, 640.
- Dunlap, W.C.; Yamamoto, Y.; *Comp. Biochem. Physiol.* **1995**, *112B*, 105.
- Yamaguchi, K.; Yada, M.; Tsuji, T.; Kuramoto, M.; Uemura, D.; *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22*, 920.
- Turk, T.; Macek, P.; Suput, D.; *Toxicol.* **1995**, *33*, 133.
- Harper, M.K.; Bugni, T.S.; Copp, B.R.; James, R.B.; Lindsay, B.S.; Richardson, A.D.; Marine Chemical Ecology. In the *McClintock, JB & Baker BJ* eds.; Boca Raton, Florida, 2001.
- Moore, R.E.; Scheuer, P.J.; *Science* **1971**, *172*, 495.
- Wang, D.Z.; *Mar. Drugs* **2008**, *6*, 349.
- Jha, R.K.; Zi-rong, X.; *Mar. Drugs* **2004**, *2*, 123.
- Guerriero, A.; Traldi, P.; Pietra, F.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 40.
- Suksamrarn, A.; Jankam, A.; Tarnchompoo, B.; Puchakarn, S.; *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1194.
- Behenna, D.C.; Stockdill, J.L.; Stoltz, B.M.; *Angew. Chem.* **2008**, *47*, 2365.
- Daranas, A.H.; Fenandez, J.J.; Gavin, J. A.; Norte, M.; *Tetrahedron* **1999**, *55*, 5539.
- Rao, C.B.; Anjaneyula, A.S.R. Sarma, N.S.; Venkateswarlu, Y.; *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7983.
- Fattorusso, E.; Romano, A.; Tagliatalata-Scafati, O.; Achmad, M.J.; Bavestrello, G.; Cerrano, C.; *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2189.
- Villar, R.M.; Gil-Longo, J.; Daranas, A.H.; Souto, M.L.; Fernández, J.J.; Peixinho, S.; Barral, M.A.; Santafé, G.; Rodríguez, J.; Jiménez, C.; *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2301.
- Jimenez, P.C.; Fortier, S.C.; Lotufo, T.M.C.; Pessoa, C.; Moraes, M.E.A.; Moraes, M.O.; Costa-Lotufo, L.V.; *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2003**, *4040*, 1.
- Takeara, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P.; Jimenez, P. C.; Costa-Lotufo, L. V.; *Quim. Nova*, **2007**, *30*, 1179.
- Takeara, R.; Jimenez, P. C.; Costa-Lotufo, L. V.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 1054.
- Jimenez, P.C.; Wilke, D.V.; Takeara, R.; Lotufo, T.M. C.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Lopes, N.P.; Costa-Lotufo, L.V.; *Comp. Biochem. Physiol.* **2008**, *151*, 391.
- Roberts, D.C.; Vellaccio, F.; In: *Gross E, Meinhofer J.* eds.; Academic Press: New York, 1983.
- Williams, R.M.; *Synthesis of optically active alpha-amino acids*. Pergamon Press, Oxford, 1989.
- Kokotos, G.; Martin, V.; Constantinou-Kokotou, V.; Gibbons, W.A.; *Amino Acids* **1996**, *11*, 329.
- Takino, H.; Sagawa, K.; Kitamura, N.; Kilahara, M.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* **62,151,495** **1987** (CA 107:220318c)
- Kitamura, N.; Sagawa, K.; Takehara, M.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* **62 04,211** **1987** (CA 106:182464s).

25. Sagawa, K.; Takehara, M.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 62 30,171 **1987a** (CA 107:79672e).
26. Sagawa, K.; Takehara, M.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 62 65,964 **1987b** (CA 107:63607b).
27. Kokotos, G.; Constantinou-Kokotou, V.; Noula, C.; Nicolaou, A.; Gibbons, W.A.; *Int. J. Peptide. Protein. Res. Ther.* **1996**, *48*, 160.
28. Nicolaou, A.; Kokotos, G.; Constantinou-Kokotou, V.; York, J.; Gibbons, W.A.; *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 614S.
29. Toth, I.; *J. Drug. Targeting.* **1994**, *2*, 217.
30. Toth, I.; Danton, M.; Flinn, N.; Gibbons, W.A.; *Tetrahedron* **1993**, *34*, 3925.
31. Mosmann, T.; *J. Immunol. Met.* **1983**, *65*, 55.

Received: August 12, 2008

Web Release Date: August 20, 2009

FAPESP helped in meeting the publication costs of this article.

**Cytotoxic Lipidic α -amino Acids from the Zoanthid *Protopalythoa variabilis*
from the Northeastern Coast of Brazil**

*Diego Veras Wilke,^a Paula Christine Jimenez,^a Claudia Pessoa,^a Manoel Odorico de Moraes,^a
Renata Mendonça Araújo,^b Wildson Max Barbosa da Silva,^b Edilberto Rocha Silveira,^b Otilia Deusdênia
Loiola Pessoa,^b Raimundo Braz-Filho,^b Norberto Peporine Lopes^c and Letícia Veras Costa-Lotufo^{*,a}*

^a*Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará,
60430-270 Fortaleza-CE, Brazil*

^b*Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 60021-940 Fortaleza-CE, Brazil*

^c*Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto-SP, Brazil*

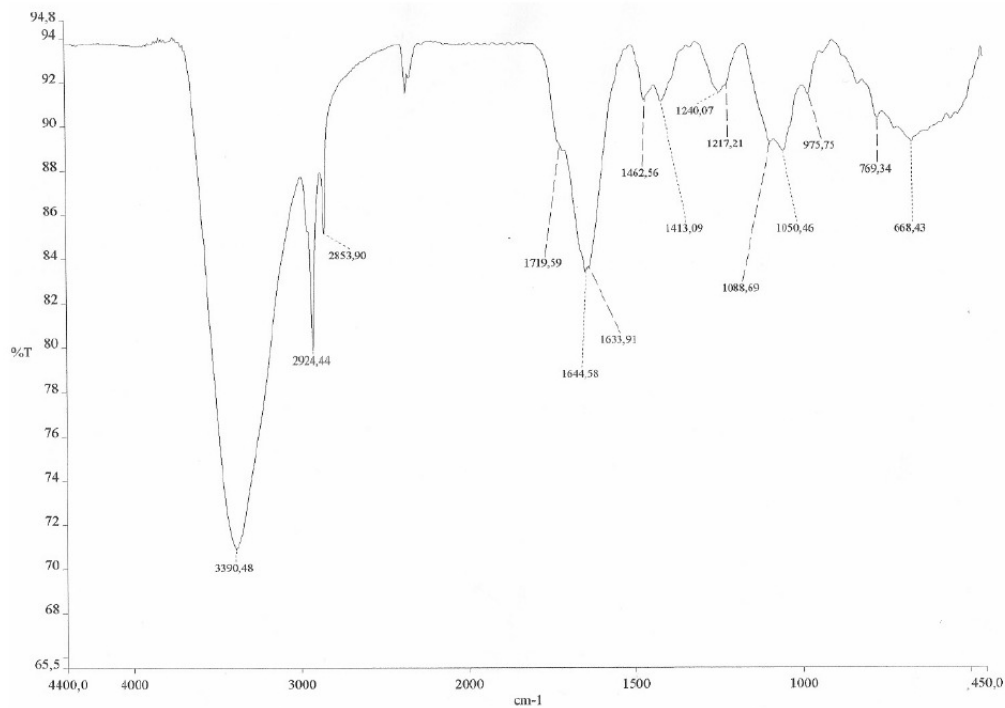
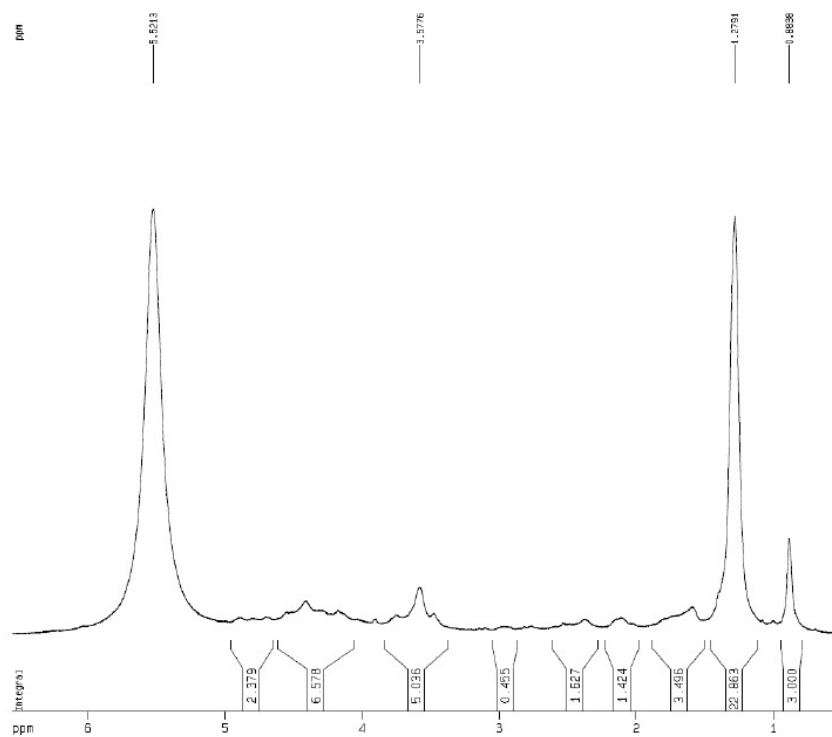
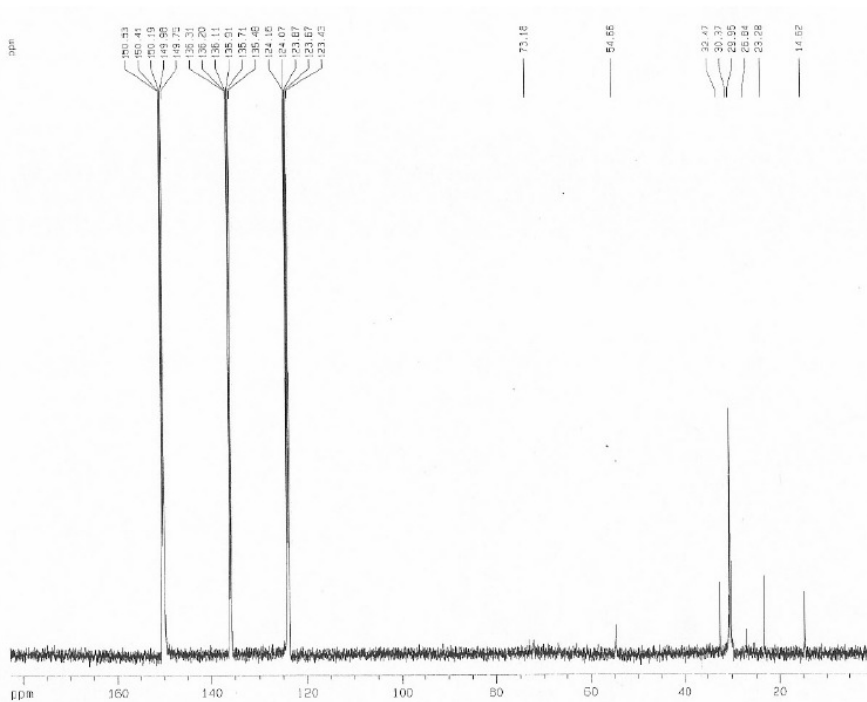


Figure S1. IR spectrum of mixture of two lipidic α -amino acids (1a and 1b)

*e-mail: lvcosta@secrel.com.br; lvcosta@ufc.br

S2

Cytotoxic Lipidic α -amino Acids from the Zoanthid *Protospalythoa variabilis**J. Braz. Chem.*Figure S2. ¹H NMR spectrum (500 MHz, C₃D₃N) of a mixture of two lipidic α -amino acids (**1a** and **1b**)Figure S3. ¹³C NMR spectrum (125 MHz, C₃D₃N) of a mixture of two lipidic α -amino acids (**1a** and **1b**)

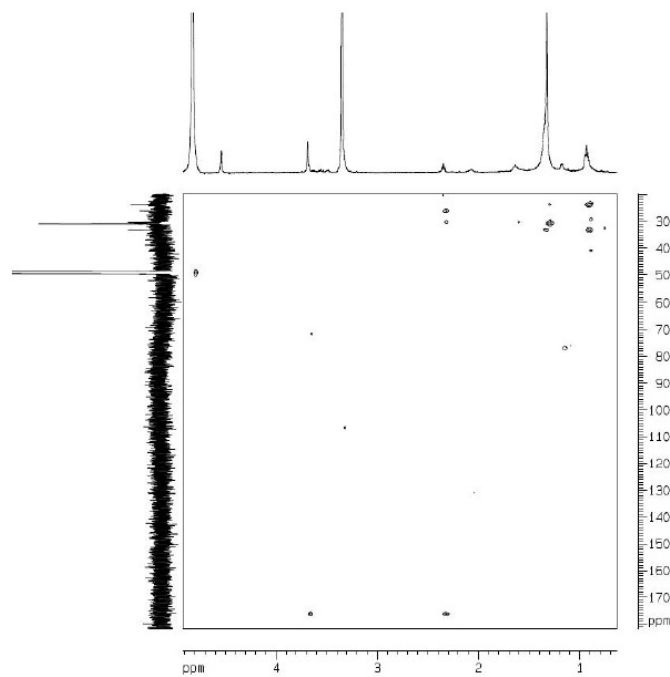


Figure S6. HMBC spectrum (500 MHz, MeOD) of methyl ester derivatives (**1a'**/**1b'**)

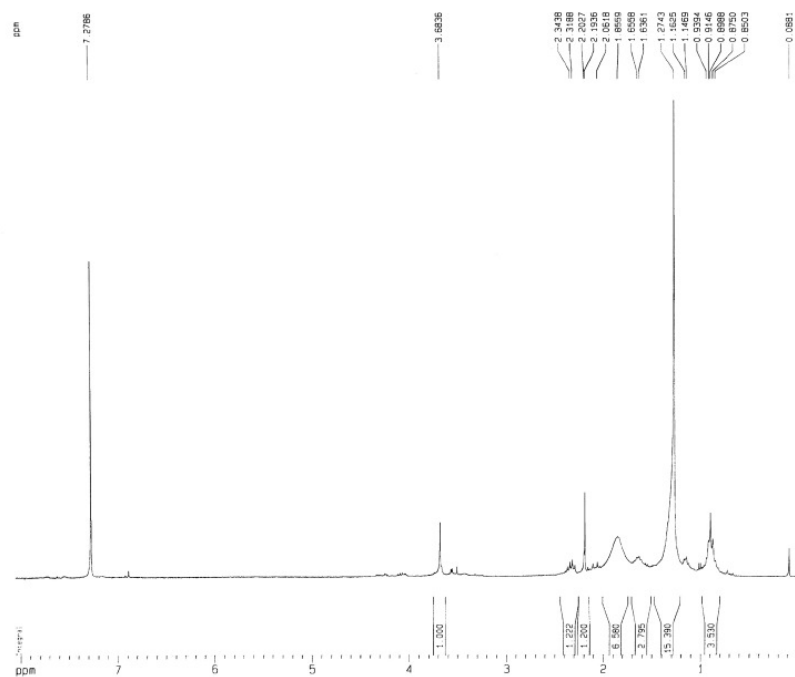


Figure S7. ^1H NMR spectrum (500 MHz, CDCl_3) of N-acetyl methyl ester derivatives (**1a''**/**1b''**)

ANEXO II

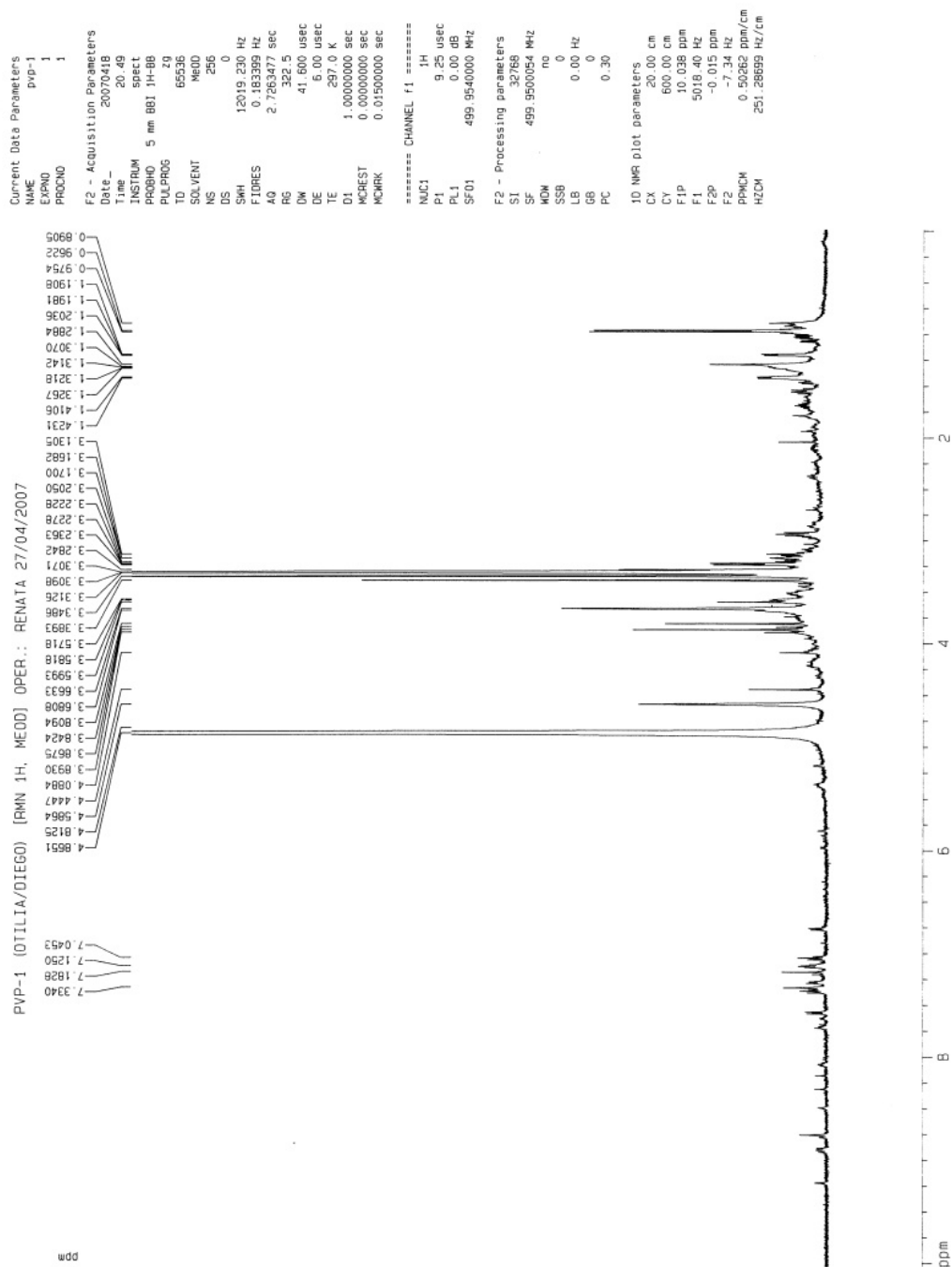


Figura A2.1. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) da fração AcOEt-P-1.

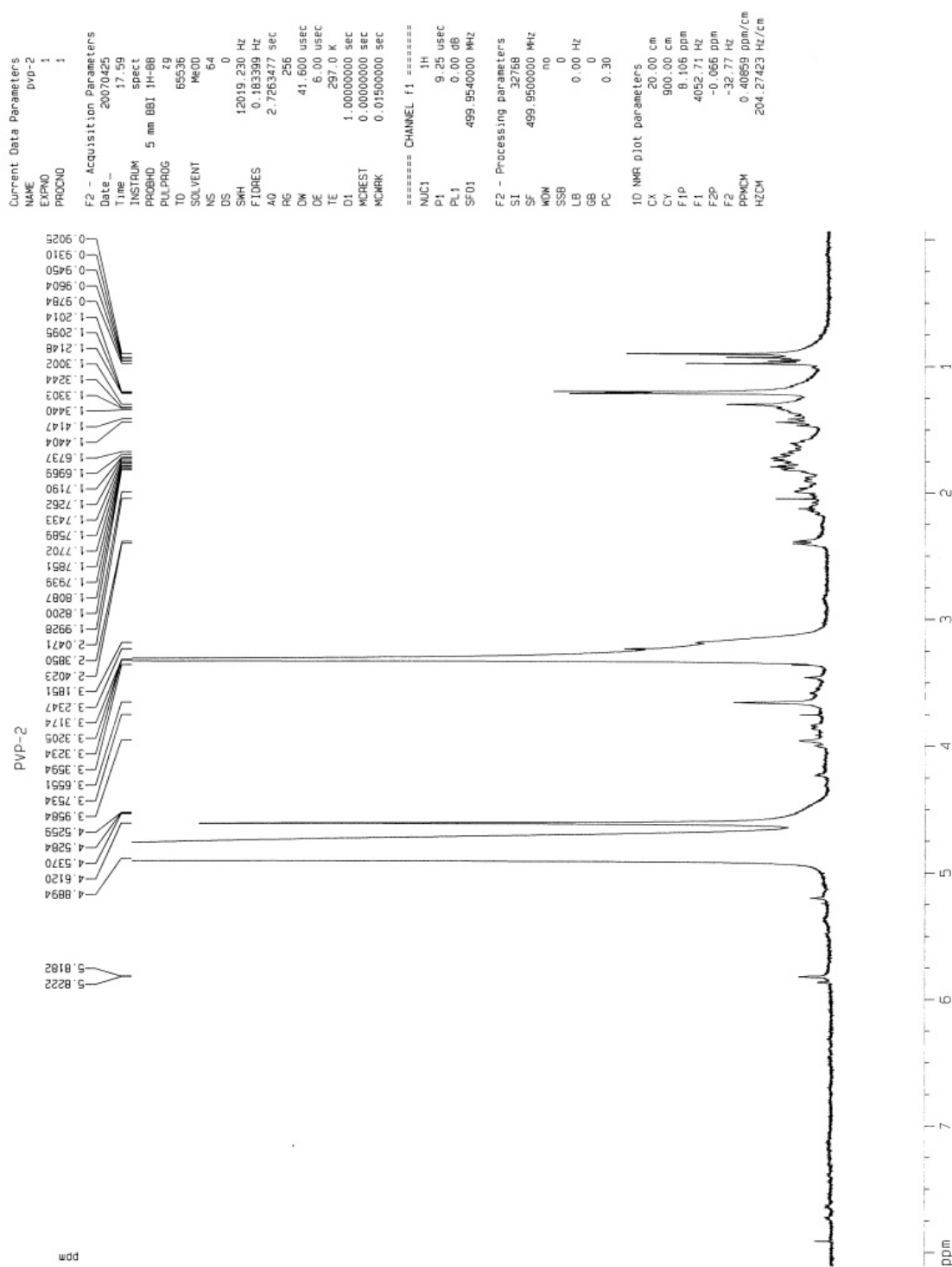


Figura A2.2. espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) da fração AcOEt-P-2.

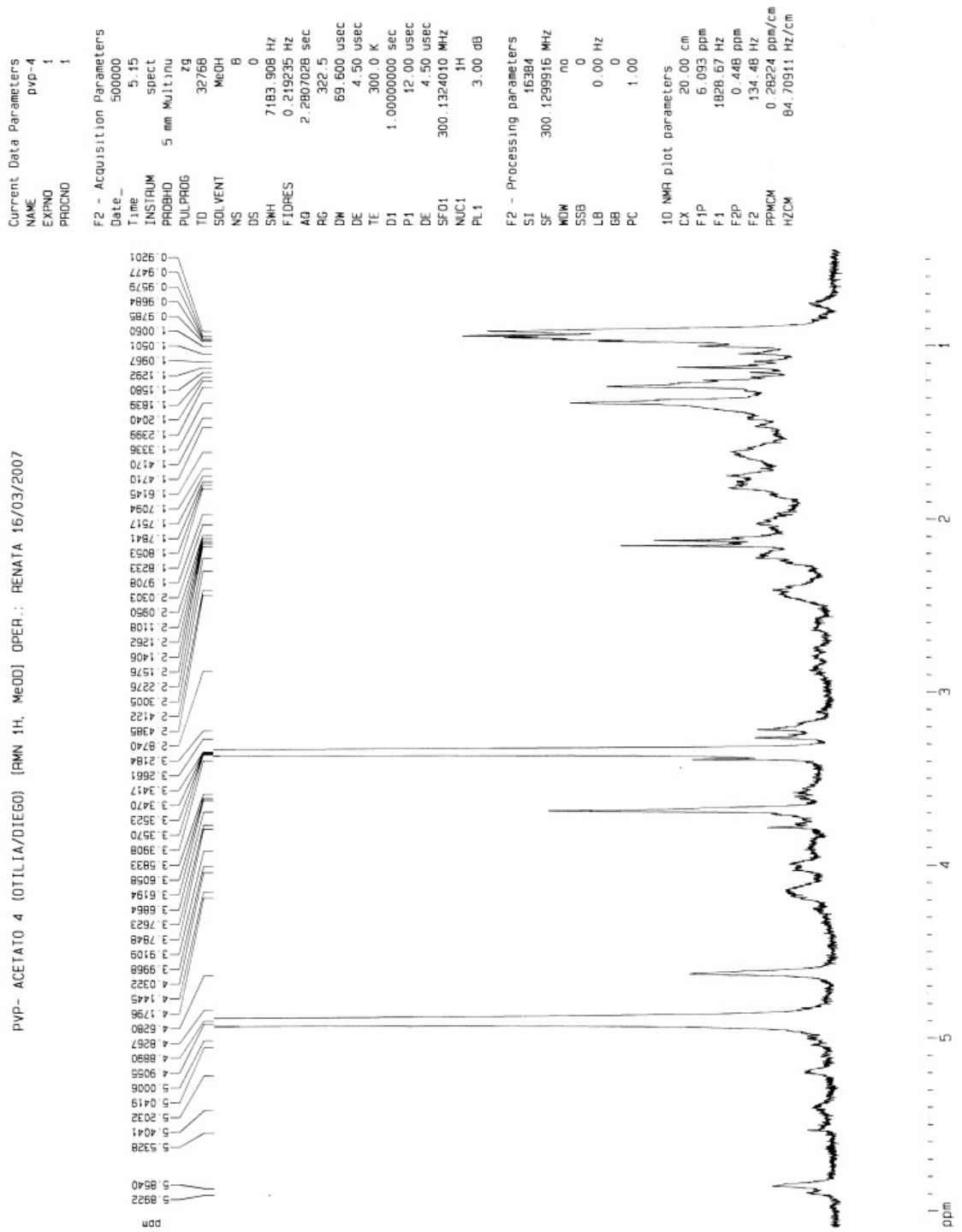


Figura A2.4. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) da fração AcOEt-P-4.

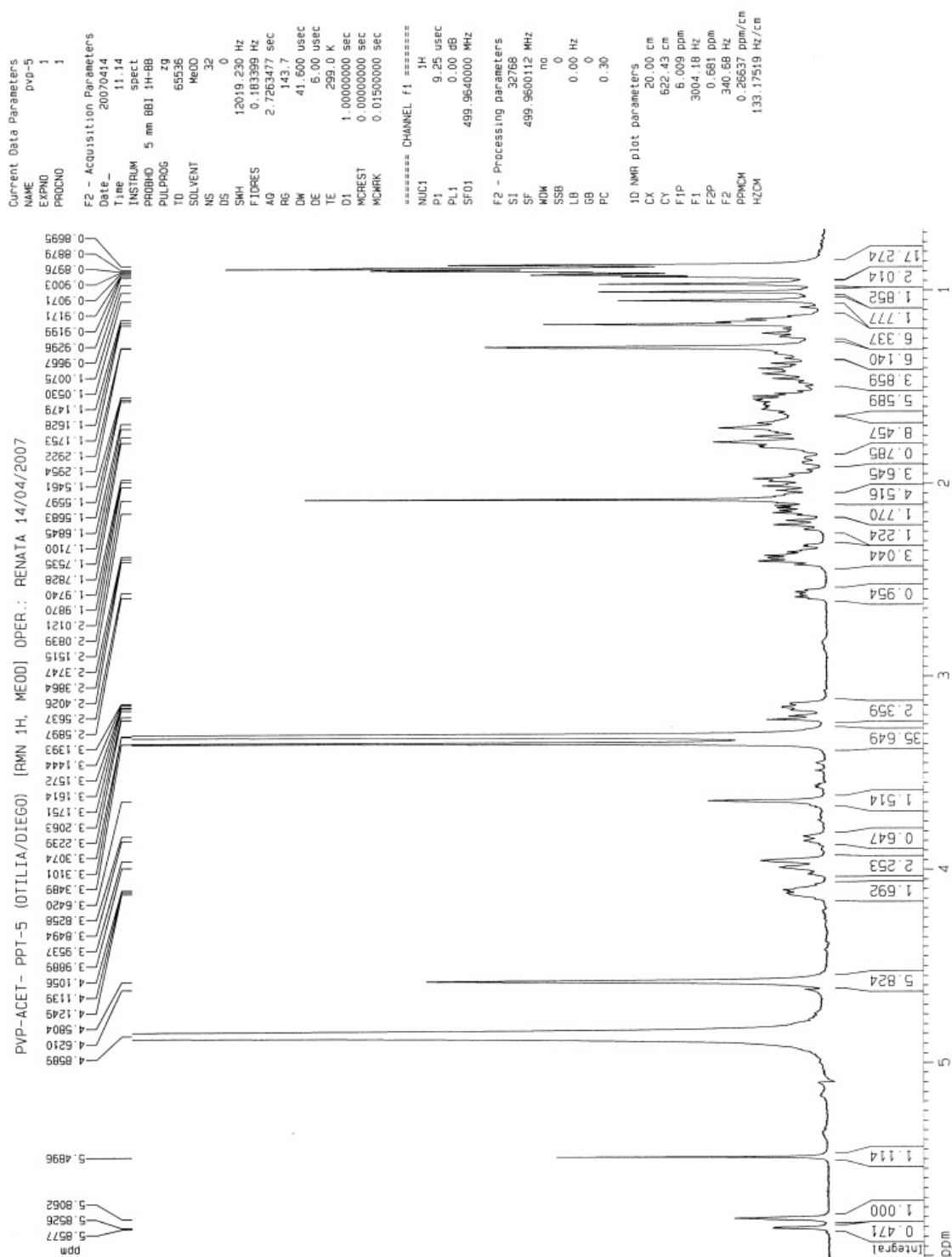


Figura A2.5. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) da fração AcOEt-P-5.

ANEXO III

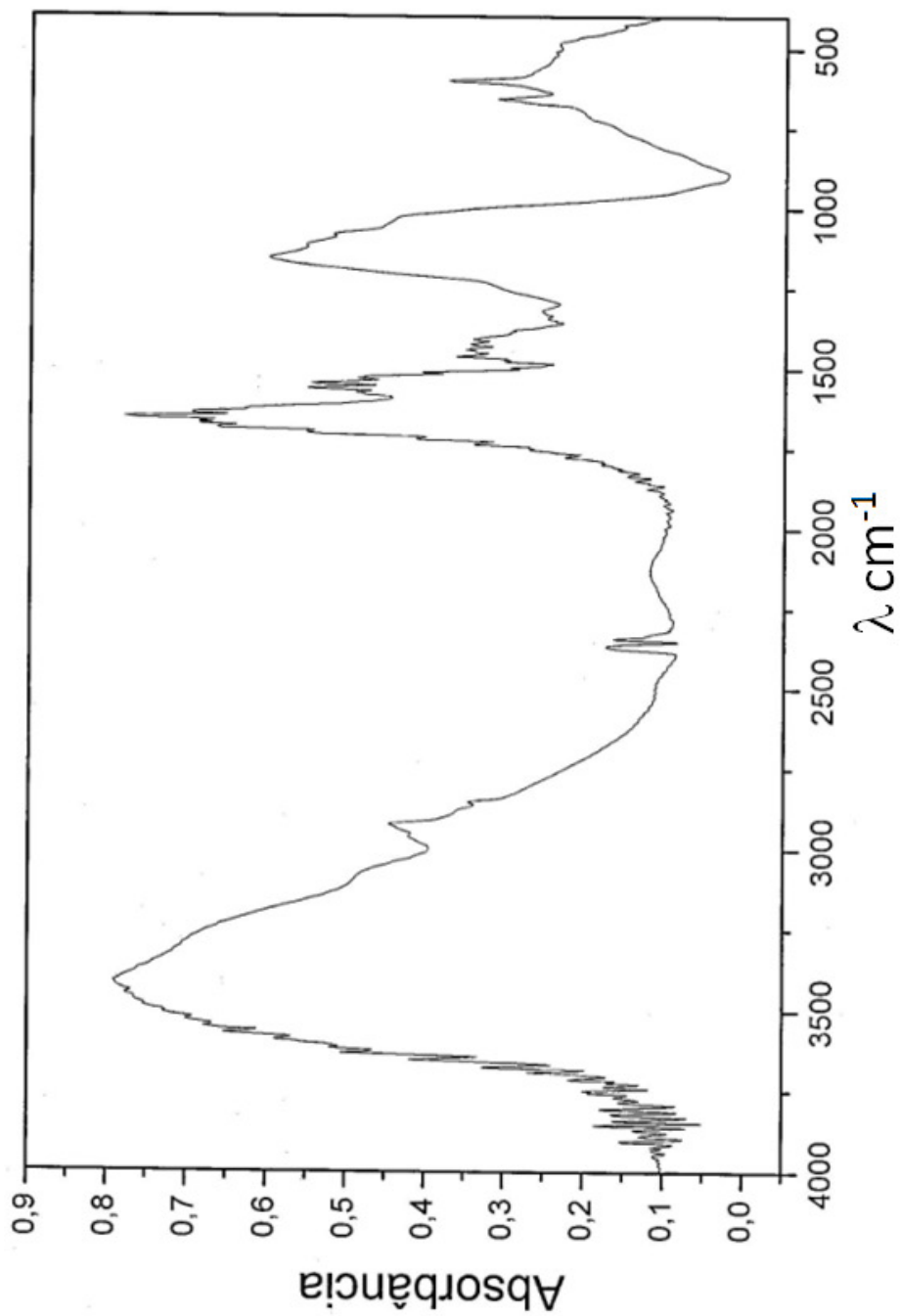


Figura A3.1. Espectro infravermelho dos polissacarídeos obtidos do resíduo seco e triturado do extrato hidroalcoólico bruto do zoantídeo *Protospalythoa varibilis*.

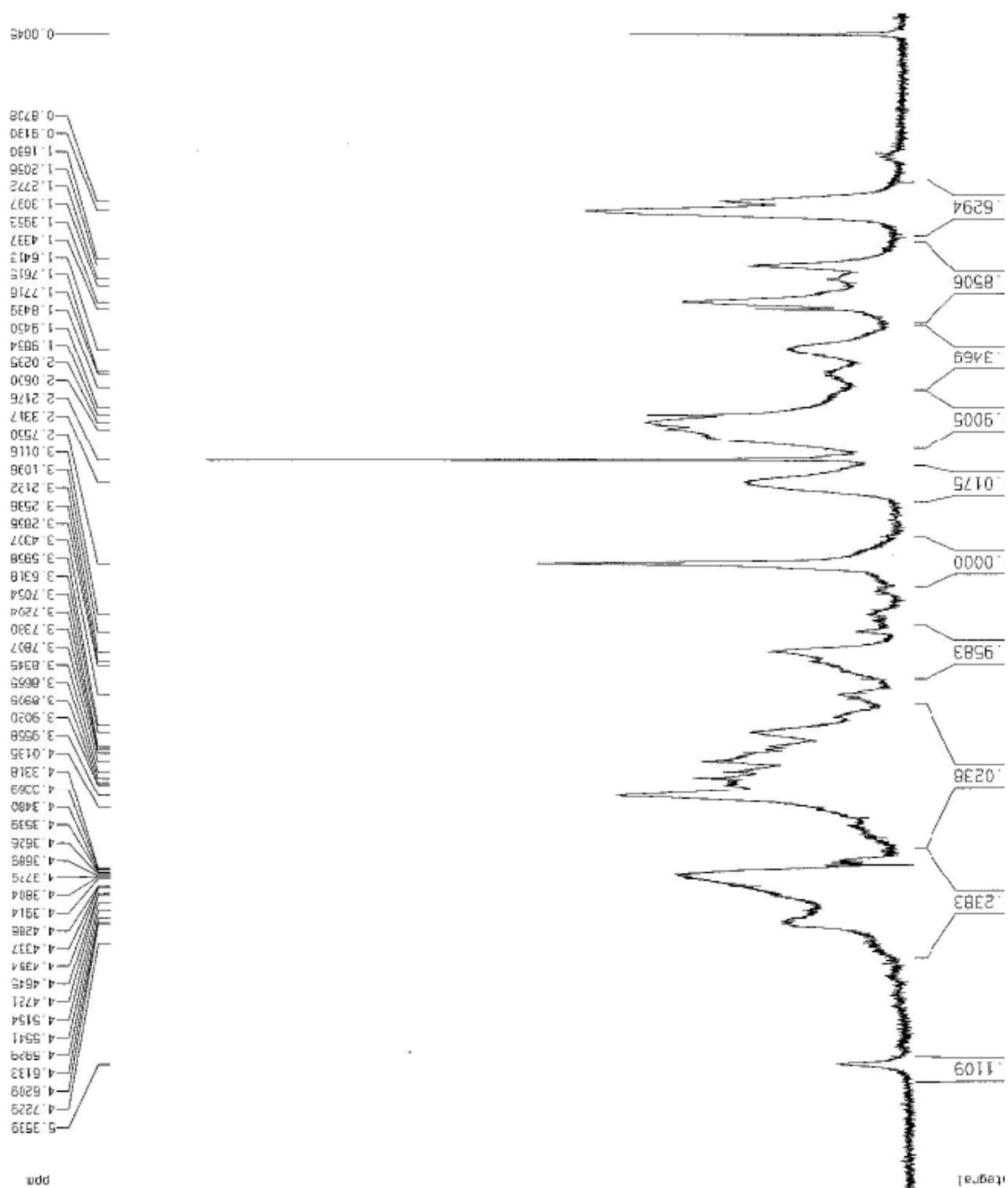


Figura A3.2. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) dos polissacarídeos obtidos do resíduo seco e triturado do extrato hidroalcoólico bruto do zoantídeo *Protopalychtha varibilis*.

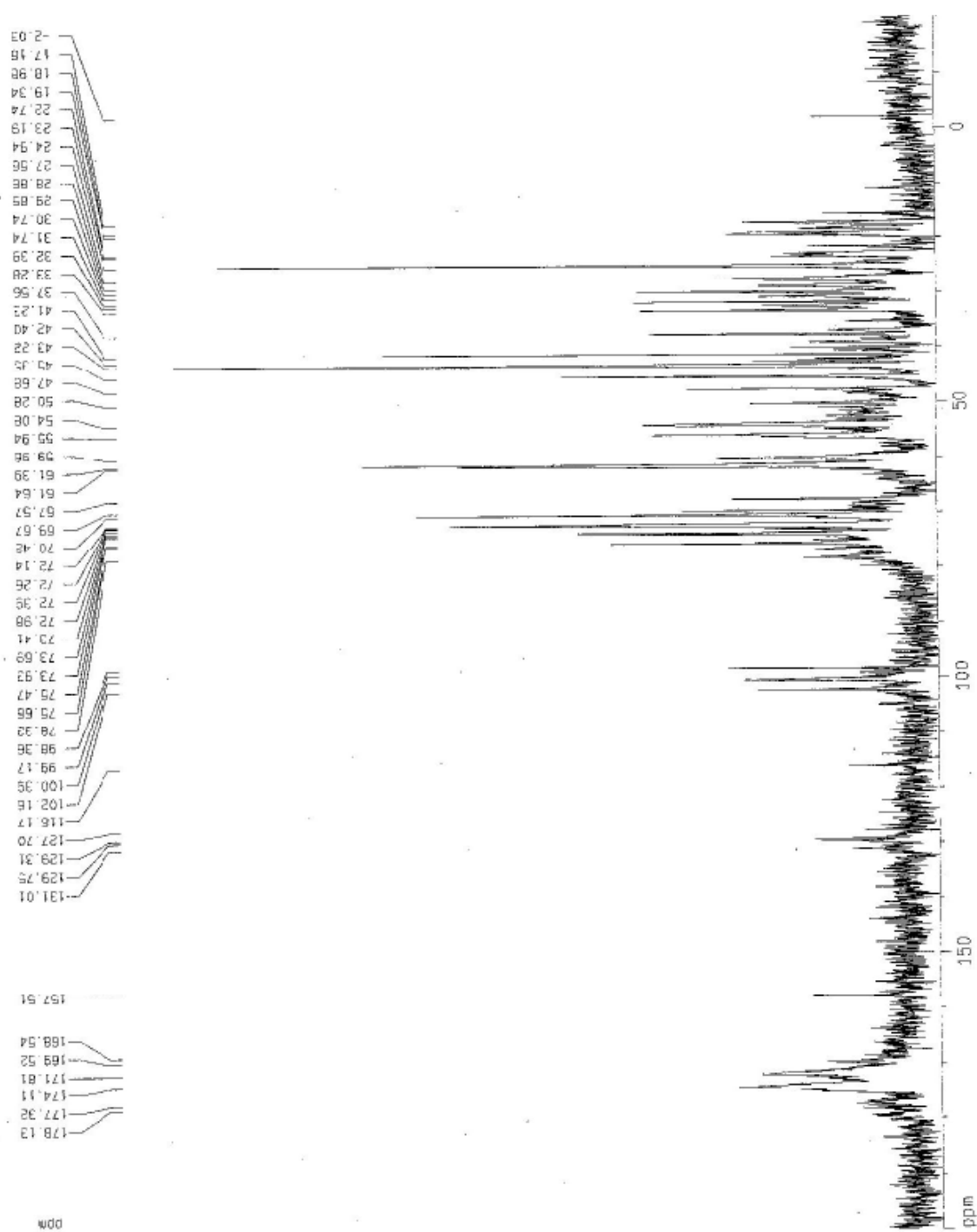


Figura A3.3. Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, D_2O) dos polissacarídeos obtidos do resíduo seco e triturado do extrato hidroalcoólico bruto do zoantídeo *Protospalythoa varibilis*.

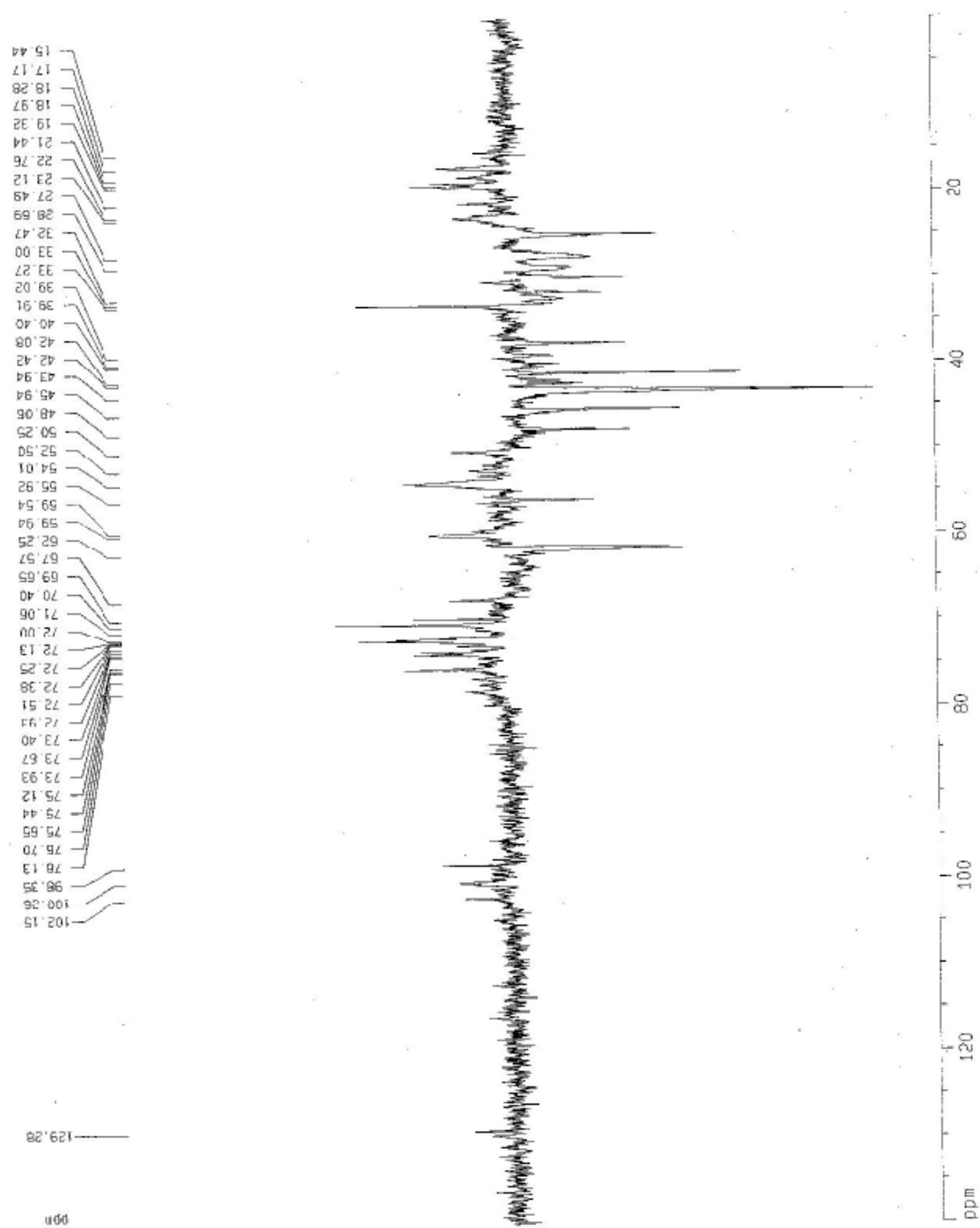


Figura A3.4. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (500 MHz, D_2O) dos polissacarídeos obtidos do resíduo seco e triturado do extrato hidroalcoólico bruto do zoantídeo *Protospalythoa varibilis*.

Tabela A3.1. Valores da análise elementar dos polissacarídeos obtidos do resíduo seco e triturado do extrato hidroalcoólico bruto do zoantídeo *Protopalythoa varibilis* e cálculo do teor protéico baseado na fórmula* N x 6,25

Átomo	Percentual
C	29,30
H	6,03
N	8,16
S	4,66
Teor protéico	51,0

*Baseado em: Maciel, J. S., Chaves, L.S., Souza, B.W.S., Teixeira, D.I.A., Freitas, A.L.P., Feitosa, J.P.A., de Paula, R.C.M. (2008) Structural characterization of cold extracted fractions of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdia*. *Carbohydrate Polymers* 71:559-565.