



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

MÁRCIO ROBERTO PINHO PEREIRA

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTICÂNCER *IN VITRO*
E *IN VIVO* DO 15-DEOXIGOIAZENSOLIDO.

FORTALEZA
2008

MÁRCIO ROBERTO PINHO PEREIRA

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTICÂNCER *IN VITRO*
E *IN VIVO* DO 15-DEOXIGOIAZENSOLIDO.**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leticia Veras Costa-Lotufo

**FORTALEZA
2008**

P493e

Pereira, Márcio Roberto Pinho

Estudo da atividade anticâncer *in vitro* e *in vivo* do 15-deoxigoiazensolido / Márcio Roberto Pinho Pereira. – Fortaleza, 2008.

125 f. : Il.

Orientador: Profa. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2008

1. Neoplasias 2. Apoptose 3. Lactonas I. Costa-Lotufo, Letícia Veras (orient.) II. Título

CDD: 616.994

MÁRCIO ROBERTO PINHO PEREIRA

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTICÂNCER *IN VITRO* E *IN VIVO* DO 15-
DEOXIGOIAZENSOLIDO.**

Tese submetida à coordenação do programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Letícia Veras Costa-Lotufo
Universidade Federal do Ceará-UFC
(Orientadora)

Manoel Odorico de Moraes Filho
Universidade Federal do Ceará-UFC

Ana Paula Negreiros Nunes
Universidade Federal do Ceará-UFC

Norberto Peporine Lopes
Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto-USP

Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará-UFC

“Deus não pode estar em todos os lugares ao mesmo tempo. E exatamente por esse motivo, Deus criou as mães”

Ditado Judeu.

À minha mãe Maria Teresa, dedico...

“Quanto melhor é adquirir a sabedoria do que o ouro! E quanto mais excelente é escolher o entendimento do que a prata”

(prov. 16:16)

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. **Letícia Veras Costa-Lotufo**, não apenas pela grande dedicação na orientação desta tese, mas principalmente pela grande amizade conquistada e pelo exemplo de competência, determinação e otimismo contagiante, repassada a todos os seus estudantes.

Ao Professor Dr. **Manoel Odorico de Moraes**, por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório e tornar realidade meu grande sonho de exercer carreira no magistério.

À Professora Dra. **Ana Paula Negreiros Nunes**, pela ajuda na análise histopatológica dos órgãos, bem como pela amizade conquistada

Ao Professor Dr. **Norberto Peporine Lopes** e à **Valquíria Jabor**, pelo isolamento da Lactona Sesquiterpênica utilizada neste trabalho e pela gentil acolhida em Ribeirão Preto.

À Professora Dra. **Maria Izabel Florindo Guedes**, pela amizade, pelo carinho e pela inspiração como grande imunologista.

À Professora Dra. **Cláudia do Ó Pessoa**, pela amizade e carinho dispensada desde minha entrada na família LOE.

À **família LOE**, graduandos e pós-graduandos que durante 5 anos participaram de alguma forma na elaboração dessa tese. Seja na ajuda de um experimento, seja um ombro amigo nos momentos difíceis, a todos vocês minha eterna gratidão.

À **Silvana** e à **Fátima**, pela ajuda técnica e amizade conquistada nesses 8 anos de família LOE.

Aos professores do Depto de Fisiologia e Farmacologia, pelos ensinamentos adquiridos em toda minha pós-graduação, minha eterna estima...

À Professora Dra. **Raquel Montenegro**, pela amizade eterna e verdadeira desde a fila da matrícula de graduação em Ciências Biológicas...

À **Marne Vasconcellos**, que sempre terá um lugar especial no meu coração...

Às professoras **Silvia Fernandes** e **Sônia Leite**, pela amizade conquistada na UNIFOR e apoio na fase final desta Tese.

À **Aura Yda**, pela ajuda sempre disponível quando recorri à coordenação do curso.

À Universidade de Fortaleza, em nome das professoras **Fátima Veras** e **Fátima Antunes**, por acreditarem em meu potencial.

Aos meus primos **Denise, Zé e Débora**, por terem “suportado” com muito amor e paciência todos os meus momentos de “agunite”.

Ao amigo **Rallys Viana**, exemplo de perseverança e honestidade. Meu muito obrigado por sempre estar presente nos momentos difíceis.

Aos meus pais **Múcio Roberto** e **Maria Teresa**, por todo o sacrifício que fizeram pela minha formação, à minha irmã querida **Márjori Teresa**, meu sobrinho **Luan “Bucheça”** e a toda minha família que me ama incondicionalmente e entende minhas imperfeições.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1. O Câncer..... | 18 |
| 1.2. Quimioterapia Anticâncer e Alvos Terapêuticos..... | 21 |
| 1.3. Produtos Naturais..... | 28 |
| 1.4. Lactonas Sesquiterpênicas..... | 35 |
| 2. OBJETIVOS..... | 42 |
| 2.1. Geral..... | 43 |
| 2.2. Específicos..... | 43 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 44 |
| 3.1. Materiais Utilizados..... | 45 |
| 3.1.1. Equipamentos..... | 45 |
| 3.1.2. Reagentes..... | 46 |
| 3.1.3. Fármacos..... | 46 |
| 3.1.4. Isolamento do 15-Deoxigoiazensolido..... | 47 |
| 3.2. Células..... | 47 |
| 3.2.1. Linhagens Celulares Utilizadas..... | 47 |
| 3.2.2. Tumores Experimentais..... | 48 |
| 3.3. Animais..... | 48 |
| 3.4. Experimentos <i>in vitro</i> | 48 |
| 3.4.1. Teste de Citotoxicidade <i>in vitro</i> - Ensaio do MTT..... | 48 |
| 3.4.1.1. Manutenção das Células..... | 48 |
| 3.4.1.2. Ensaio do MTT..... | 49 |
| 3.4.1.2.1. Procedimento Experimental..... | 49 |
| 3.4.1.2.2. Análise dos Dados..... | 49 |
| 3.4.2. Análise dos Efeitos Celulares em HL-60 – Determinação do Mecanismo de ação..... | 50 |
| 3.4.2.1. Viabilidade Celular – Exclusão por Azul de Tripan..... | 50 |
| 3.4.2.1.1. Procedimento Experimental..... | 50 |
| 3.4.2.1.2. Análise dos Dados..... | 50 |
| 3.4.2.2. Inibição da Síntese de DNA BrdU..... | 51 |
| 3.4.2.2.1. Procedimento Experimental..... | 51 |

| | |
|---|----|
| 3.4.2.2.2. Análise dos Dados..... | 51 |
| 3.4.2.3. Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/ Laranja de Acridina..... | 52 |
| 3.4.2.3.1. Procedimento Experimental..... | 52 |
| 3.4.2.3.2. Análise dos Dados..... | 53 |
| 3.4.2.4. Determinação da Integridade de Membrana por Citometria de Fluxo..... | 53 |
| 3.4.2.4.1. Procedimento Experimental..... | 53 |
| 3.2.4.4.2. Análise dos Dados..... | 54 |
| 3.2.4.5. Determinação do Potencial Transmembrânico da Mitocôndria..... | 54 |
| 3.2.4.5.1. Procedimento Experimental..... | 55 |
| 3.2.4.5.2. Análise dos Dados..... | 55 |
| 3.2.4.6. Determinação do Conteúdo de DNA Nuclear da Célula..... | 56 |
| 3.2.4.6.1. Procedimento Experimental..... | 56 |
| 3.2.4.6.2. Análise dos Dados..... | 57 |
| 3.5. Experimentos <i>in vivo</i> | 57 |
| 3.5.1. Manutenção dos Tumores..... | 57 |
| 3.5.1.1. Sarcoma 180..... | 57 |
| 3.5.1.2. Carcinossarcoma de Walker..... | 57 |
| 3.5.2. Experimentos com Sarcoma 180..... | 58 |
| 3.5.2.1. Avaliação da Sobrevida e do Crescimento Tumoral..... | 58 |
| 3.5.2.2. Avaliação da Atividade Antitumoral..... | 59 |
| 3.5.2.3. Análise Histopatológica..... | 60 |
| 3.5.3. Experimentos com Carcinossarcoma de Walker..... | 60 |
| 3.5.3.1. Avaliação da Atividade Antitumoral..... | 60 |
| 3.5.4. Análise Estatística..... | 60 |
| 3.5.5. Determinação da Síntese de IgE Anti-Lactona..... | 61 |
| 3.5.5.1. Imunização dos Animais..... | 61 |
| 3.5.5.2. Obtenção dos Antissoros..... | 61 |
| 3.5.5.3. Sorologia: Enzyme Linked Immunosorbent Assay | |

| | |
|---|-----|
| (ELISA)..... | 61 |
| 3.5.5.4. Análise dos Resultados..... | 62 |
| 4. RESULTADOS..... | 63 |
| 4.1. Estudos <i>in vitro</i> | 64 |
| 4.1.1. Teste de citotoxicidade in vitro – Ensaio do MTT..... | 64 |
| 4.2. Análise dos Efeitos Celulares em HL-60 – Determinação do Mecanismo de Ação..... | 66 |
| 4.2.1. Viabilidade Celular em HL-60..... | 66 |
| 4.2.2. Inibição da Síntese de DNA – Incorporação de BrdU..... | 67 |
| 4.2.3. Análise Morfológica – Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina..... | 68 |
| 4.2.4. Determinação da Integridade de Membrana por Citometria de Fluxo..... | 69 |
| 4.2.5. Determinação do Conteúdo de DNA Nuclear da Célula.... | 71 |
| 4.2.6. Despolarização da Mitocôndria..... | 73 |
| 4.3. Experimentos <i>in vivo</i> | 75 |
| 4.3.1. Estudos com Sarcoma 180..... | 75 |
| 4.3.1.1. Avaliação da Sobrevida e do Crescimento Tumoral..... | 75 |
| 4.3.1.2. Avaliação da Atividade Antitumoral..... | 77 |
| 4.3.1.3. Avaliação da Toxicidade e das Alterações Histopatológicas..... | 78 |
| 4.3.2. Estudos com Carcinossarcoma de Walker 256..... | 81 |
| 4.3.2.2. Avaliação da Atividade Antitumoral..... | 81 |
| 4.3.3. Avaliação da síntese de anticorpos IgE anti-lactona..... | 84 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 85 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 99 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 101 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| FIGURA 1 – Características adquiridas comuns aos vários subtipos de células cancerosas..... | 19 |
| FIGURA 2 – Fases da carcinogênese..... | 21 |
| FIGURA 3 – Estrutura química do gás mostarda, droga precursora da quimioterapia anticâncer..... | 23 |
| FIGURA 4 – O ciclo celular e sua modulação pelos pontos de checagem nas suas diferentes fases até a completa divisão celular..... | 25 |
| FIGURA 5 – Novos medicamentos desenvolvidos a partir de plantas terrestres..... | 30 |
| FIGURA 6 – Estrutura química da Vinblastina e da Vincristina isoladas de <i>Catharanthus roseus</i> | 31 |
| FIGURA 7 – Produtos naturais de plantas terrestres com importante atividade anticâncer descobertas pelo NCI a partir do programa de coletas..... | 32 |
| FIGURA 8 – Porcentagem do tipo de drogas anticâncer descobertas desde 1940 até 2006. S (sintéticas); S/NM (Sintética, mas mimetiza a ação de um produto natural); S* (Sintética, mas o esqueleto inicial foi de um produto natural); S*/NM (Sintética, mas o esqueleto inicial foi de um produto natural e mimetiza a sua ação); V (Vacina); B (Produto biológico, peptídeo ou proteína com mais de 45 resíduos de aminoácidos isolados de um organismo ou sintetizado em laboratório); N (Produto natural); ND (Derivado de produto natural com modificações semissintéticas)..... | 32 |
| FIGURA 9 – Novas moléculas isoladas ou derivadas de plantas terrestres com potencial anticâncer..... | 34 |
| FIGURA 10 – Anel α -metileno- γ -lactona característico de todas as lactonas sesquiterpênicas..... | 35 |
| FIGURA 11 – Esqueleto básico da estrutura das diferentes lactonas sesquiterpênicas..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| FIGURA 12 – Estrutura molecular de algumas lactonas sesquiterpênicas bioativas..... | 39 |
| FIGURA 13 – Estrutura química de germacronolido furanoheliangolidos da classe do goiazensolido..... | 40 |
| FIGURA 14 – Efeito do 15-deoxigoiazensolido na viabilidade da células leucêmicas HL-60, determinado por exclusão de azul de tripan depois de 24 horas de incubação..... | 66 |
| FIGURA 15 – Efeito do 15-deoxigoiazensolido na incorporação do 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) em células leucêmicas HL-60 depois de 24 horas de incubação..... | 67 |
| FIGURA 16 – Efeito do 15-deoxigoiazensolido em células leucêmicas HL-60, analisado pela coloração por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina depois de 24 horas de incubação..... | 68 |
| FIGURA 17 – Viabilidade das células da linhagem HL-60 tratadas com 15-deoxigoiazensolido avaliada por citometria de fluxo..... | 70 |
| FIGURA 18 – Histogramas do DNA obtidos por citometria de fluxo..... | 72 |
| FIGURA 19 – Avaliação da despolarização da mitocôndria por citometria de fluxo em células da linhagem HL-60 tratadas com 0,5 µg/mL e 1 µg/mL de 15-deoxigoiazensolido..... | 73 |
| FIGURA 20 – Histogramas da despolarização da mitocôndria obtidos por citometria de fluxo..... | 74 |
| FIGURA 21 – Curva de Sobrevida de camundongos inoculados com sarcoma 180 submetidos ao tratamento de diferentes doses da lactona sesquiterpênica 15-deoxigoiazensolido..... | 76 |
| FIGURA 22 – Curva do crescimento tumoral do sarcoma 180 em camundongos tratados com diferentes doses de Lactona Sesquiterpênica 15-deoxigoiazensolido (* p < 0,05)..... | 76 |
| FIGURA 23 – Peso tumor sarcoma 180 (A), Fígado (B), Rins (C) e Baço (D) de camundongos tratados durante 7 dias consecutivos com 5 mg/m ² e 10 mg/m ² de lactona sesquiterpênica 15-deoxigoiazensolido..... | 77 |
| FIGURA 24 – Fotomicrografia do fígado dos camundongos após 7 dias consecutivos de tratamento com 15-deoxigoiazensolido..... | 79 |

| | |
|---|-----------|
| FIGURA 25 – Fotomicrografia do rim dos camundongos após 7 dias consecutivos de tratamento com 15-deoxigoiazensolido..... | 80 |
| FIGURA 26 – Peso do tumor de Walker 256 (A), Fígado (B), Rins (C) e Baço (D) em ratos Wistar tratados durante 7 dias consecutivos com 5 mg/Kg e 10 mg/Kg de lactona sesquiterpênica 15-deoxigoiazensolido..... | 82 |
| FIGURA 27 – Síntese de anticorpos IgE anti-Lactona em camundongos imunizados com 100 µg de 15-deoxigoiazensolido por via subcutânea..... | 84 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1 – Os agentes antineoplásicos e sua inter-relação com o ciclo-celular..... | 27 |
| Tabela 2 – Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> | 47 |
| Tabela 3 – Atividade citotóxica da lactona sesquiterpênica 15-deoxigioiazensolido em linhagens de células tumorais apos 72 horas de incubação..... | 65 |
| Tabela 4 – Análise do Ciclo Celular/conteúdo de DNA por citometria de fluxo..... | 71 |
| Tabela 5 – Resumos da atividade antitumoral <i>in vivo</i> do 15-deoxigioiazensolido e do 5-Fluorouracil (controle positivo) em modelos murinos..... | 83 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|---|
| 5-FU | 5-Fluorouracil |
| BrdU | Bromodeoxiuridina |
| BE | Brometo de Etídio |
| CCE | Ciclo Celular Específico |
| CCNE | Ciclo Celular Não-Específico |
| CDK | Quinases Dependentes de Ciclinas |
| CI₅₀ | Concentração inibitória média |
| CKI | Inibidoras de Quinases Dependentes de Ciclinas |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| DAB | Diaminobenzidina |
| DMSO | Dimetilsufóxido |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| EPM | Erro Padrão da Média |
| FDA | Food and Drug Administration |
| HE | Hematoxilina/Eosina |
| IFN-γ | Interferon gama |
| IL | Interleucina |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| IP | Iodeto de Propídeo |
| LA | Laranja de Acridina |
| LST | Lactona Sesquiterpênica |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromido |
| NCI | National Institute of Cancer |
| NO | Óxido Nítrico |
| OPD | Orthophenylenediamine |
| PBS | Phosphate Buffer Solution (Solução Tampão Fosfato) |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| RPMI | Roswell Parrk Memorial Institute Medium |
| TBS | Tris Buffer Solution (Solução Tampão Tris) |
| TNF-α | Fator de Necrose Tumoral alfa |
| TNFRI | Receptor tipo I do Fator de Necrose Tumoral |

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER *IN VITRO* E *IN VIVO* DO 15-DEOXIGOIAZENSOLIDO. Márcio Roberto Pinho Pereira. Orientadora: Letícia Veras Costa-Lotufo. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2008.

RESUMO

O presente estudo procurou avaliar a atividade anticâncer da lactona sesquiterpênica 15-deoxigoiazensolido. A atividade citotóxica foi inicialmente avaliada pelo método do MTT, onde o 15-deoxigoiazensolido obteve uma $IC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$ em todas as linhagens testadas variando de 0,09 a 0,56 $\mu\text{g/mL}$. Essa atividade foi confirmada pelo método do Azul de Tripán, no qual o 15-deoxigoiazensolido mostrou atividade nas doses de 0,25, 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$ após exposição por 24 h na linhagem HL-60. Em seguida, foi revelado pelo teste de incorporação do Brdu que a atividade citotóxica do 15-deoxigoiazensolido está relacionada com a inibição da síntese de DNA. Além disso, os ensaios que avaliam a indução de morte celular mostraram alterações morfológicas, fragmentação do DNA, despolarização da mitocôndria e manutenção da integridade da membrana celular, características do processo de apoptose. A atividade *in vivo* do 15-deoxigoiazensolido foi avaliado utilizando-se o sarcoma 180 em camundongos e Walker 256 em ratos. A lactona sesquiterpênica inibiu o crescimento do volume tumoral do sarcoma 180 de maneira dose dependente, mas não foi capaz de aumentar a sobrevivência dos animais. A administração do 15-deoxigoiazensolido na dose de 10 $\text{mg/m}^2/\text{dia}$ inibiu 49,39 % do desenvolvimento do tumor sólido em camundongos transplantados com Sarcoma 180. A análise histopatológica nos órgãos dos camundongos revelou que houve moderada toxicidade no fígado, mas os efeitos são passíveis de reversibilidade. A administração da lactona sesquiterpênica nas doses de 5 e 10 mg/kg/dia em ratos transplantados com o tumor de Walker 256 inibiu seu desenvolvimento em cerca de 34,05 e 38,80 % respectivamente. Em relação ao seu potencial alergênico, não foi detectado síntese de anticorpos IgE anti-lactona em camundongos Swiss. Os resultados mostram que o 15-deoxigoiazensolido tem potente atividade anticâncer, sendo a apoptose o mecanismo de ação que leva as células tumorais à morte.

EVALUATION OF *IN VITRO* AND *IN VIVO* ANTICANCER ACTIVITY OF 15-DEOXYGOYAZENSOLIDE. Márcio Roberto Pinho Pereira. Advisor: Letícia Veras Costa-Lotufo. Doctorate Thesis. Postgraduate Program on Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, UFC, 2008.

ABSTRACT

The present study evaluated the anticancer activity of sesquiterpene lactone 15-deoxygoyazensolido. Citotoxic activity was initially evaluated by the MTT assay, where 15-deoxygoyazensolido showed $IC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$ in all tested cell lines, varying from 0,09 to 0,56 $\mu\text{g/mL}$. This activity was confirmed by Trypan Blue assay, which 15-deoxygoyazensolido showed activity at 0,25, 0,5 and 1 $\mu\text{g/mL}$ after 24h exposition in HL-60 cells. Afterwards, it was revealed by incorporation test of BrdU that citotoxic activity of 15-deoxygoyazensolido is related to inhibition of DNA synthesis. Besides, on the assays for induction of cellular apoptosis showed morphological alterations, DNA fragmentation, mitochondria depolarization, maintaining membrane integrity, typical apoptosis sight. The *in vivo* activity of 15-deoxygoyazensolido was evaluated using sarmoca 180 tumor in mice and Walker 256 tumor in rats. The sesquiterpene lactone inhibited tumor growth in a dose-dependent manner, but it was not capable to increase mice survival. The administration of 15-deoxygoyazensolido at dose 10 $\text{mg/m}^2/\text{day}$ inhibited 49,39% of solid Sarcoma 180 tumor development in transplanted mice. The histopathological assay in mice organs revealed moderate liver toxicity but these effects are considered reversible. The administration of sesquiterpene lactone inhibited Walker 256 tumor development at doses 5 e 10 mg/kg/day in transplanted rats about 34,05 e 38,80 % respectively. Concerning allergenic properties, it was not detected anti-lactone IgE antibody synthesis in swiss mice immunized with 100 μg of 15-deoxygoyazensolido. The results show that 15-deoxigoiazensolido has a potent anticancer activity, being apoptosis the mechanism of action which takes tumor cells to death.

1 . INTRODUÇÃO

1.1. O Câncer

O conceito único para o câncer torna-se difícil devido à complexidade das inúmeras alterações bioquímicas que ocorrem nas diferentes células neoplásicas de um organismo doente. O câncer se desenvolve a partir de uma célula que perde o controle sobre sua capacidade de proliferação por não conseguir reparar a mutação em seu metabolismo e nem sofrer morte celular (apoptose), e acaba se multiplicando de forma indevida (INCA, 2008). Após a segunda metade do século XX, tornou-se evidente que a tumorigenese em seres humanos é um processo que envolve várias etapas, entre elas ocorre alterações no genoma, transformando células saudáveis em células malignas. Hanahan e Weinberg (2000) sugerem que as células cancerosas, apesar da ampla variedade genotípica, apresentam seis alterações essenciais na fisiologia celular, que conjuntamente levam ao crescimento maligno. Essas alterações são: sinalização auto-suficiente no crescimento celular, ausência de sensibilidade para sinais anti-proliferativos, evasão da apoptose, potencial de replicação sem limites, constante estímulo da angiogênese e invasão tecidual e metástase (figura 1).

O corpo de um ser humano adulto é composto de aproximadamente 10^{15} células e muitas delas multiplicam-se constantemente, pois precisam repor alguns órgãos e/ou tecidos. Podemos citar como exemplos as células do epitélio intestinal, que se renovam a cada 10 dias aproximadamente, e células da medula óssea que se dividem a partir de células tronco e amadurecem em leucócitos ou eritrócitos (BERTRAM, 2001). O tempo de vida dessas células é determinado por genes que controlam a sua taxa de morte e dessa forma temos a quantidade adequada de células para compor o órgão em questão. Se a taxa de divisão celular se tornar maior que a taxa de morte dessas células, dizemos que elas estão em um estágio de proliferação descontrolada devido ao mau funcionamento desses genes (FOSTER, 2006).

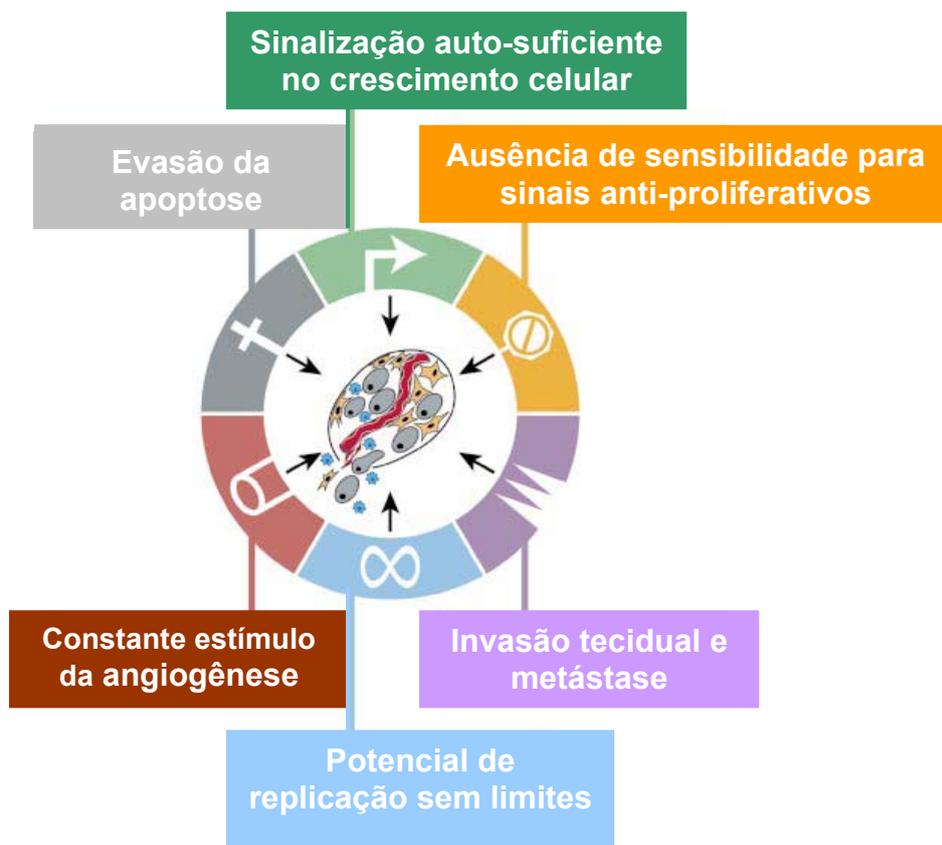


Figura 1: Características adquiridas comuns aos vários subtipos de células cancerosas. Adaptado de HANAHAN & WEINBERG (2000).

Durante a divisão celular podem ocorrer mutações no DNA que levam às alterações nas vias metabólicas que controlam a funcionalidade dos genes. A complexidade da regulação gênica na proliferação celular incita algumas questões. Como por exemplo: quantas vias regulatórias devem ser alteradas para que uma célula seja classificada como neoplásica? As mutações que ocorrem nas vias regulatórias que controlam a proliferação celular são as mesmas em qualquer célula? Quais dessas vias oncogênicas operam apenas no metabolismo primário da célula e quais recebem a influência de sinais vindos do microambiente onde se encontra o tecido alterado? Atualmente, podemos afirmar a existência de fatores de risco que induzem essas mutações. Esses fatores de risco são encontrados no meio ambiente (80%) ou são hereditários (INCA, 2008). No meio ambiente, encontramos um grande número

de fatores de risco, como o meio em geral (água, terra, ar, solo), o ambiente ocupacional, o ambiente social, o ambiente cultural e o ambiente de consumo. Em todos esses ambientes encontramos substâncias com potencial mutagênico para o DNA das células. Essas substâncias são chamadas de carcinógenas, e o processo de injúria do DNA induzido pelos carcinógenos é chamado de carcinogênese.

A carcinogênese pode ser definida como um processo de etapas múltiplas, gerando nas células uma transformação maligna irreversível devido às mutações sofridas pelo DNA. O processo de carcinogênese pode ser induzido por substâncias químicas, energia radioativa e/ou vírus (FLEMING, 2003; KUMAR *et al.*, 2004). Os carcinógenos químicos são designados de não-letais, pois apesar de danificarem o código genético, não levam a célula à morte. Essa célula alterada sofre expansão clonal e progride para a formação de um tumor maligno. Existem três fases para a carcinogênese química: estágio de iniciação, estágio de promoção e estágio de progressão (Figura 2). A fase de iniciação é conhecida como o primeiro estágio da carcinogênese, onde as células sofrem o efeito da substância carcinogênica que provoca modificações de seus genes. Nesta fase, as células encontram-se geneticamente alteradas, tornando-se mutantes e potencialmente capazes de dar origem a um tumor. Se a mutação da célula iniciada não sofrer reparo, ou não entrar em apoptose, a célula passa para a fase de promoção sem chance de retornar a ser uma célula saudável. A iniciação isolada, no entanto, não é suficiente para a formação do tumor. No estágio de promoção, as células geneticamente alteradas sofrem a ação de substâncias classificadas como oncopromotoras, cuja principal característica é a proliferação da célula iniciada, contribuindo para o desenvolvimento de mutações adicionais, e finalmente ocorrendo a formação do neoplasma maligno (neoplasia). Para que ocorra essa transformação da célula iniciada em célula maligna, é necessário um longo e contínuo contato com o agente oncopromotor. Já no estágio de progressão, é observada a multiplicação descontrolada da célula com o acúmulo de mutações múltiplas, ocorrendo a formação de tumores invasivos com capacidade de gerar metástases. Essa fase é caracterizada por um

processo irreversível onde o câncer está instalado no organismo e evolui até as primeiras manifestações clínicas da doença (ALMEIDA *et al.*, 2005).

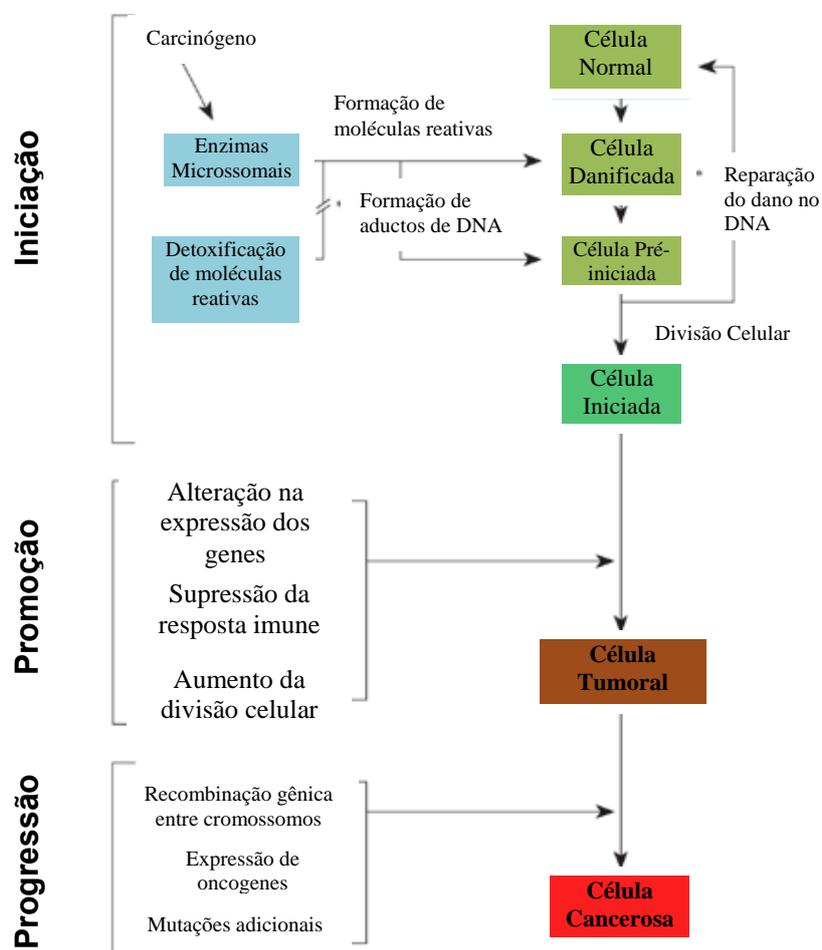


Figura 2: Fases da carcinogênese.

1.2. Quimioterapia do Câncer e Alvos Terapêuticos

Existem três principais tipos de tratamento para o câncer: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Recentemente, têm sido utilizados também a fotorradiação com derivados hematoporfíricos e a imunoterapia como adjuvantes no tratamento de tumores malignos (POTTERAT & HAMBUEGER,

2008). A técnica cirúrgica pode erradicar o tumor totalmente, mas existe o risco de metástase (SAVAGE *et al.*, 2007). Além disso, tumores classificados como inoperáveis podem comprometer a qualidade de vida do paciente por induzir manifestação de queixas álgicas. Essas queixas podem ser discretas, mas em sua grande maioria são de alto grau, levando o paciente usar de analgésicos com potentes efeitos colaterais (GASPARINI & SARAIVA, 2004).

A radioterapia compreende a emissão de raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios-X e até prótons e mésons pi negativos. Geralmente é usada em conjunto com a cirurgia para incremento da terapia (FRANCESCHINI *et al.*, 2007). Mesmo utilizada de forma isolada, a radioterapia tem grande eficiência em diminuir grandes tumores ou até mesmo sua recorrência e o risco de metástase. Entretanto, o tratamento por radiação é sujeito a severas limitações, mesmo utilizando-se a terapia por fotorradiação.

Já a imunoterapia estimula o próprio sistema imune do paciente para o combate do câncer, no caso de vacinas anticâncer, ou utiliza-se a introdução de citocinas naturais, como interferon- γ (IFN- γ) ou Interleucina-2 (IL-2), para ampliar as defesas do organismo. Mas apesar dos resultados promissores em laboratórios, a imunoterapia ainda é utilizada apenas como tratamento adjuvante, especialmente para destruir células neoplásicas residuais após remoção cirúrgica do tumor e evitar o processo de metástase (LO *et al.*, 2008; KHAWLI *et al.*, 2008).

Os métodos de tratamento citados acima conseguem curar apenas um terço dos pacientes devidos a vários fatores, como o desenvolvimento de micrometástases. Sendo assim, é necessária a prática da quimioterapia, pois com esse tipo de tratamento podemos contar com uma abordagem mais sistêmica para a completa recuperação do paciente (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A história da quimioterapia antineoplásica confunde-se com a história da primeira guerra mundial, quando o gás mostarda (figura 3), um composto sulfurado com alto poder tóxico, foi utilizado pelas forças aliadas dos Estados Unidos. O gás mostarda faz parte de um grupo de compostos, os denominados, mostardas de enxofre. Todas as mostardas de enxofre possuem

dois grupos cloroetila (-CH₂CH₂-Cl) ligados a um átomo de enxofre. As alterações no sangue e na medula óssea de pacientes intoxicados pelo gás foram reportadas pela primeira vez por Krumbhaar (1919). O efeito máximo na depressão de células produzidas na medula óssea pelo gás mostarda pode ser observado duas semanas após o primeiro contato. As mortes dos pacientes foram atribuídas por pneumonia associadas com leucopenias. A autópsia revelou atrofia dos órgãos linfóides e do tecido testicular, assim como a hipoplasia da medula óssea. Os resultados sugeriam uma atividade supressora nas células em constante divisão e, finalmente, em 1929, Berenblum demonstrou que o gás mostarda era anticarcinogênico (BERENBLUM & RILEY-SMITH, 1929). Com o passar dos anos, muitas substâncias quimioterápicas foram isoladas, caracterizadas e comercializadas. Atualmente, um verdadeiro universo de substâncias com potencial anticâncer são estudadas em laboratórios de todo o mundo.

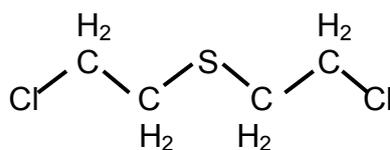


Figura 3: Estrutura química do gás mostarda, droga precursora da quimioterapia anticâncer.

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas, quanto células normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrintestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções. Um fator importante para o êxito da quimioterapia é a precocidade no diagnóstico do tumor, que deve ter entre 10⁹ e 10¹² células tumorais, ou seja, um tumor com tamanho inferior a 1 cm. Existem diversos mecanismos que estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula maligna, e a maior parte deles interferem na divisão celular. Sendo assim, esclarecer as reações bioquímicas envolvidas nesse

evento é de grande importância para um melhor entendimento da atividade anticâncer de muitos quimioterápicos.

O ciclo celular (figura 4) é uma intrincada seqüência de eventos que permite as células crescerem e se multiplicarem. Os dois tipos de genes que possuem um importante papel no ciclo celular, e conseqüentemente no desenvolvimento do câncer, são os oncogenes (Her2/neu, Ras, c-Myc) e genes supressores (p53 e o Rb) (FRANCO *et al.*, 2008). Os oncogenes estimulam o crescimento celular que geralmente se inicia com a liberação de fatores de crescimento de uma única célula. Estes fatores ligam-se aos seus receptores na membrana da própria célula. Sinais moleculares são transmitidos então através da membrana às proteínas citoplasmáticas, que por sua vez induzem a liberação de fatores da transcrição para dentro do núcleo. Esta seqüência de eventos estimula a célula a entrar em seu ciclo de divisão. A função dos genes supressores, por outro lado, é impedir a continuidade do ciclo celular, ou porque o tecido não necessita mais de reposição de células ou para impedir que a célula maligna evolua para formação de um tumor (VERMEULEN *et al.*, 2003).

A célula que não está se replicando apresenta-se na fase G₀. Nesta fase, o DNA apresenta-se super-enovelado com atividade nuclear baixa. Estímulos para o crescimento e proliferação direcionam a célula para a fase G₁, onde se observa a preparação da célula para a multiplicação (VERMEULEN *et al.*, 2003). Da fase G₁, a célula passa para a fase S, onde ocorre a síntese e conseqüente duplicação do DNA. Da fase S a célula entra pela fase G₂ e se prepara para a mitose (M), onde ocorre a divisão celular propriamente dita. As células filhas tumorais ou neoplásicas, não retornam à fase G₀. Ao terminar a fase M, retornam para a fase G₁ iniciando um novo ciclo que resultará em mais multiplicação celular (FOSTER, 2007).

Os eventos ocorridos durante todo o ciclo celular são controlados por proteínas chamadas de Quinases Dependentes de Ciclinas (CDK). As ciclinas são proteínas reguladoras das CDKs, as quais formam os mecanismos responsáveis pela progressão do ciclo celular. Por exemplo, a ciclina E tem um papel central na transdução da resposta mitogênica a diversos hormônios,

citocinas e fatores de crescimento. A expressão transitória da ciclina E após um estímulo mitogênico provoca uma série de eventos em cascata que terminam com a síntese de DNA com posterior replicação celular (MARQUES & BUZAID, 2004).

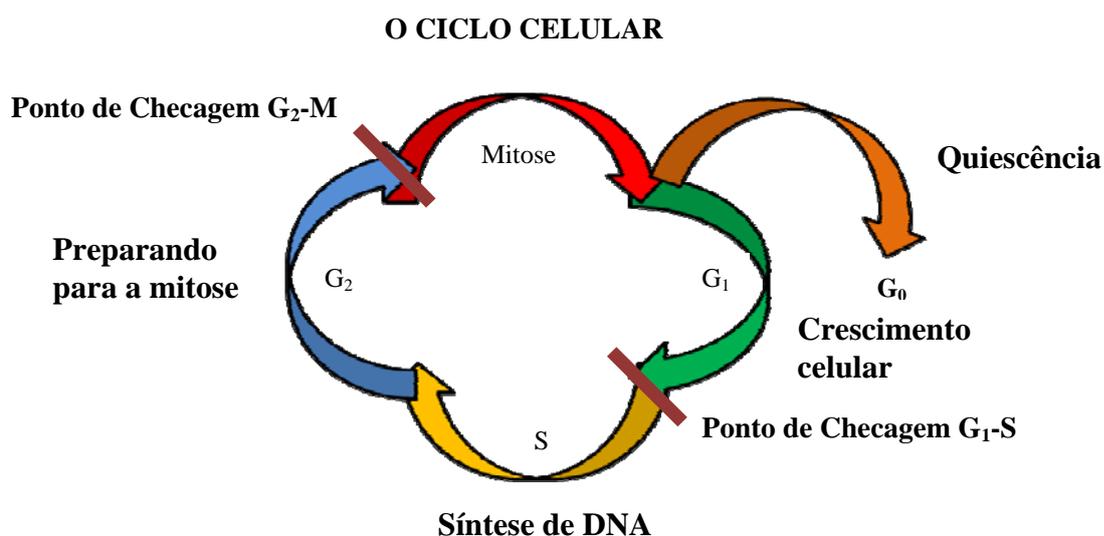


Figura 4: O ciclo celular e sua modulação pelos pontos de checagem nas suas diferentes fases até a completa divisão celular (Fonte: FOSTER, 2007).

As CDKs são expressas principalmente enquanto o ciclo celular passa da fase G₁ para S e da fase G₂ para a fase M (HARTWELL & KASTAN, 1994; LIEBERMANN *et al.*, 1995). As CDKs são formadas por uma ciclina (proteína estrutural) e por uma quinase (enzima). As CDK1 (CDC2), CDK2 e CDK4 são expressas nos mamíferos, assim como a ciclina D, a ciclina E, a ciclina A e a ciclina B (HARTWELL & KASTAN, 1994).

A atividade das CDKs é modulada por proteínas inibitórias do ciclo celular, conhecidos pelas inibidoras de CDK (CKI). Atualmente são conhecidas duas famílias distintas de CKIs: a família das INK4, que incluem a p15, a p16, a p18, a p19 (inibem a CDK4 e CDK6); e a família Cip/Kip, que inclui a p21, a p27 e a p57 (inibem o complexo ciclina-CDK) (VERMEULEN *et al.*, 2003).

Alterações nas proteínas inibitórias que interferem na fase G₁ e S do ciclo celular mostraram-se comuns na maioria dos cânceres (MOLINARI, 2000).

As células que estão expostas às lesões nos genes controladores do ciclo celular podem progredir para malignidade nos estágios iniciais da carcinogênese (DIXON *et al.*, 1997). Entretanto, eficientes mecanismos moleculares de controle minimizam essa progressão de três formas: reparo do DNA, supressão da atividade de oncogenes ou morte celular. Um dos genes supressores mais conhecidos e estudados na literatura é o p53. Ele já foi descrito como o “guardião do genoma” (KIRSCH & KASTAN, 1998), uma vez que esse gene exerce uma importante atividade inibitória na proliferação de células mutantes. As mutações nos genes supressores que controlam os pontos de checagem permitem que as células alteradas continuem a progredir no ciclo celular, causando por fim, o desenvolvimento de tumores (FOSTER, 2006). A morte celular, por sua vez, pode ser de duas formas distintas. A primeira seria a necrose, caracterizada pelo inchaço da célula e sua rápida degeneração. A segunda seria a apoptose, caracterizada pela redução do volume celular acompanhado da ausência do rompimento da membrana plasmática e posterior fragmentação do DNA (GUIMARÃES & LINDEN, 2004). Vários genes estão envolvidos no processo de apoptose, como bax, c-Myc e o p53 (KIRSCH & KASTAN, 1998). Suas atividades no processo de apoptose podem variar, incluindo a expressão de receptores Fas e Fas-ligante na membrana celular e a liberação do *citocromo c* mitocondrial (WEINBERG, 1996). A apoptose é um processo fisiológico altamente organizado que leva as células sem sucesso no reparo do seu DNA à morte. Disfunções nos mecanismos da via apoptótica pré-dispõem ao câncer em dois níveis. O primeiro seria a mutação nos genes indutores da apoptose, levando as células mutantes, que seriam eliminadas pela apoptose, a sobreviverem. O segundo seria a adaptação da célula para se proliferar por “seleção Darwiniana” em um ambiente não favorecedor (FOSTER, 2006). Após o escape de todos esses mecanismos, a célula maligna não pode mais voltar a ser uma célula normal e precisa ser eliminada.

Após uma abordagem detalhada do ciclo celular, pode-se entender como os diferentes quimioterápicos funcionam e qual a sua real importância no tratamento do câncer.

Segundo Katzung (2004), os quimioterápicos são divididos basicamente em dois tipos: Os de Ciclo Celular Específicos (CCE) e os de Ciclo Celular Não-Específicos (CCNE). Os quimioterápicos CCE são divididos em: agentes antimetabólitos, agentes hormonais, alcalóides da vinca, antibióticos naturais, epipodofilotoxinas e taxanos. Já os quimioterápicos CCNE são separados em: agentes alquilantes, análogos da platina, antraciclinas e alguns antibióticos antitumorais (tabela 1). Cada uma dessas classes de fármacos liga-se em um alvo celular impedindo a descontrolada divisão da célula neoplásica e inibindo o crescimento do tumor.

Tabela 1. Os agentes antineoplásicos e sua inter-relação com o ciclo-celular (adaptado de ALMEIDA *et al.*, 2005)

| Agentes Ciclo-Celular Específicos (CCE) | Agentes Ciclo-Celular Não Específicos (CCNE) |
|---|---|
| <p>Agentes Antimetabólitos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Análogo do ácido fólico • Antagonistas das pirimidinas • Análogos das purinas e inibidores correlatos <p>Agentes Hormonais</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adrenocorticosteróides • Progestinas • Estrogênios e Androgênios • Antiestrogênios e Antiandrogênios • Análogo do hormônio liberador de gonadotropina • Inibidor da aromatase • Inibidor do hormônio peptídico <p>Produtos Naturais</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alcalóides vegetais <ul style="list-style-type: none"> Alcalóides da vinca Podofilotoxinas (Epipodofilotoxinas) Paclitaxel (Taxol) | <p>Produtos Naturais</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos naturais <ul style="list-style-type: none"> Antraciclinas Mitomomicina Dactinomicina Plicamicina Bleomicina • Alcalóides pirrolizidínicos <p>Complexos de Coordenação de Platina</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cisplatina (cis-DDP) • Carboplatina (CBDCA) <p>Agentes Alquilantes Diversos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mostardas nitrogenadas • Nitrossuréias • Triazenos • Alquil sulfonatos |

1.3. Produtos Naturais

As primeiras descrições sobre produtos naturais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Este papiro, que foi descoberto e publicado por Georg Ebers, foi traduzido pela primeira vez em 1890 por H. Joachin, descrevendo um grande número de drogas de natureza animal ou vegetal que poderiam tratar até 100 diferentes doenças (VILELA, 1977). Até hoje, produtos naturais provindos de plantas ou animais são utilizados em todo mundo para o tratamento de diferentes patologias. Infecções microbianas, inflamação, dor, febre e outras enfermidades do ser humano podem ser controladas pelo uso de produtos sintetizados por outros organismos (PINTO *et al.*, 2002).

Segundo Chin (2006), o real valor de um produto natural pode ser considerado usando três critérios: (1) a taxa de introdução de novas entidades químicas com ampla diversidade estrutural, incluindo seu potencial para modelo de outras substâncias sintéticas ou semi-sintéticas; (2) o número de doenças que essa substância pode tratar e (3) sua freqüência de uso no tratamento da patologia indicada. A análise de produtos naturais, ou drogas relacionadas de produtos naturais, entre 1981 e 2002 mostra que essas substâncias compreendem 28% de todas as entidades químicas lançadas no mercado (NEWMAN *et al.*, 2003). Além disso, 24% dessas novas entidades químicas foram sintetizadas ou modificadas a partir das propriedades farmacológicas de produtos naturais (NEWMAN *et al.*, 2000). A combinação dessas duas porcentagens (52% de todas as novas entidades químicas) sugere que os produtos naturais são importantes fontes de novas drogas. Além disso, caracterizam-se de fácil manipulação para modificação química na formação de derivados químicos.

Um apanhado das prescrições médicas em todo o mundo demonstra que os produtos naturais, e drogas relacionadas, são usados para tratar 87% de todas as doenças humanas, incluindo seu uso como antibióticos, anticancerígenos, anticoagulantes, antiparasitários, imunossuppressores, entre outros (NEWMAN *et al.*, 2003). Ainda não temos produtos naturais, ou drogas relacionadas, para 7 categorias de drogas, incluindo: anestésicos,

antianginosos, antihistaminicos, ansiolíticos, diuréticos, hipnóticos e quelantes ou antídotos. No caso dos agentes antibacterianos, os produtos naturais fizeram contribuições significantes para o tratamento de diversas infecções. Das 90 drogas desse tipo que se tornaram comercialmente disponíveis nos Estados Unidos ou foram aprovadas em todo o mundo, cerca de 79% são originadas de produto natural (CHIN *et al.*, 2006).

Para a indústria farmacêutica, o interesse nas vendas de produtos naturais ainda parece ser mais vantajoso. Os produtos naturais, ou as substâncias relacionadas, encabeçaram 40% de vendas de medicamentos em 2000, sendo 24% de vendas em 2001 e 26% de vendas em 2002 (BUTLER *et al.*, 2004). Um bom exemplo dos ganhos com as vendas de uma droga provinda de um produto natural é o paclitaxel. Considerada uma droga anticâncer de grande importância clínica, esse medicamento teve um rendimento estimado em U\$1,6 bilhões em 2000. Se somarmos com as vendas de outras drogas anticâncer derivadas de produtos naturais como o taxano, docetaxel, e os derivados da camptotecina, irinotecano e topotecano, esses medicamentos compreendem um terço de todas as drogas anticâncer vendidas em todo o mundo. Essas vendas renderam pelo menos U\$3 bilhões em 2002 para as indústrias farmacêuticas (THAYER, 2003; OBERLIES & KROLL, 2004).

Dentre os organismos mais estudados para extração de produtos naturais com valor terapêutico estão as plantas terrestres, especialmente aquelas classificadas como plantas superiores. Essas plantas têm uma história longa no uso do tratamento de diversas patologias humanas. Diversas espécies bem conhecidas, incluindo o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), a mirra (espécie do gênero *Commiphora*), e o látex da cápsula da papaia (*Papaver somniferum*), foram as primeiras descritas nas tabuletas da argila de Mesopotâmia em 2600 a.c., e são consideradas as precursoras no estudo das plantas medicinais. A morfina, a codeína, a noscapina (um narcótico), e a papaverina são drogas desenvolvidas a partir da *P. somniferum* e são usadas até hoje na clínica médica. A carbenoxolona sódica, um derivado semi-sintético do ácido glicirretínico encontrado no alcaçuz, é prescrita para o tratamento de úlceras gástricas e duodenais em vários países (DEWICK, 2002).

Historicamente, as plantas como ferramentas terapêuticas ajudaram introduzir novas entidades químicas na medicina moderna. Especialmente aquelas de uso popular foram as fontes preliminares para a descoberta de muitos fármacos de uso clínico. Fabricant e Farnsworth (2001) relataram que 80% de 122 drogas derivadas de plantas foram descobertas devido ao seu uso popular para tratamento de doenças. Alguns exemplos de medicamentos derivados de plantas mais recentes aprovados pelo “Food and Drug Administration” (FDA) estão representados na figura 5.

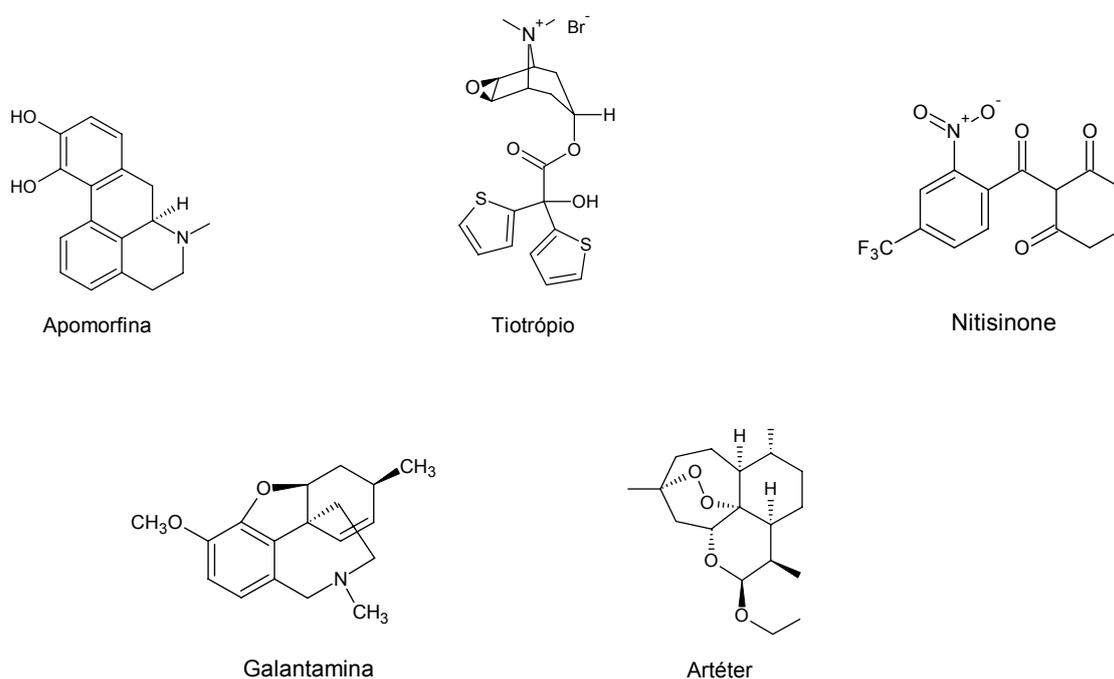


Figura 5: Novos medicamentos desenvolvidos a partir de plantas terrestres (CHIN, 2006).

A busca por agentes com propriedades antitumorais iniciou-se em 1950 com a descoberta e o desenvolvimento comercial dos alcalóides da Vinca (vimblastina e vincristina, figura 6) isoladas da *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae). Primariamente, essa planta era utilizada para tratamento de diabetes melito, mas durante as pesquisas pré-clínicas que conduziram essas substâncias como hipoglicemiantes orais, foi observado que seu extrato reduzia a contagem de células brancas e induzia depressão da medula óssea em ratos. Em seguida, o extrato mostrou-se ativo contra leucemia linfocítica em

ratos, e atualmente seus princípios ativos são utilizados com sucesso para tratamento do câncer (NEWMAN & CRAGG, 2007).

Como consequência dessas descobertas, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) iniciou um extensivo programa de coleta de plantas a partir de 1960, focalizando principalmente as plantas de regiões temperadas. Esse programa conduziu à descoberta de promissoras moléculas, incluindo os taxanos e as camptotecinas (Figura 7), que mostram um amplo espectro de atividade citotóxica (CASSADY & DOUROS, 1980). Os estudos clínicos que desenvolveram essas drogas como quimioterápicos na prática clínica perduraram por um período de 30 anos, iniciado nos anos sessenta e finalizado apenas na década de 90 (CASSADY *et al.*, 2004). Este programa de coleta foi encerrado em 1982, mas com o desenvolvimento de novas tecnologias para a prática de “*screening*” os pesquisadores foram levados a reiniciar o programa de coletas, e também de outros organismos, em 1986, com o foco nas plantas de regiões tropicais e subtropicais (CRAGG & NEWMAN, 2005).

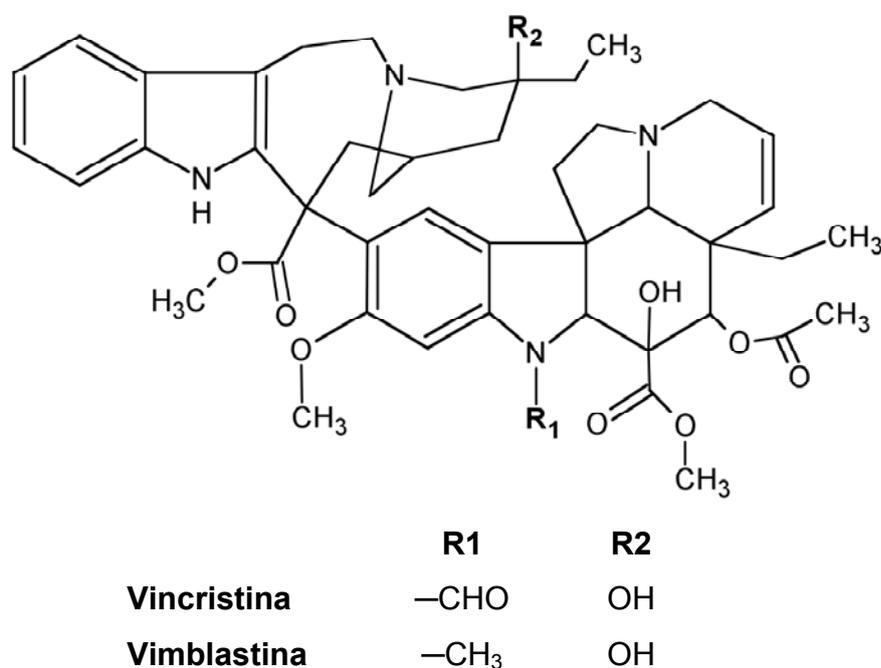


Figura 6: Estrutura química da Vimblastina e da Vincristina isoladas de *Catharanthus roseus*.

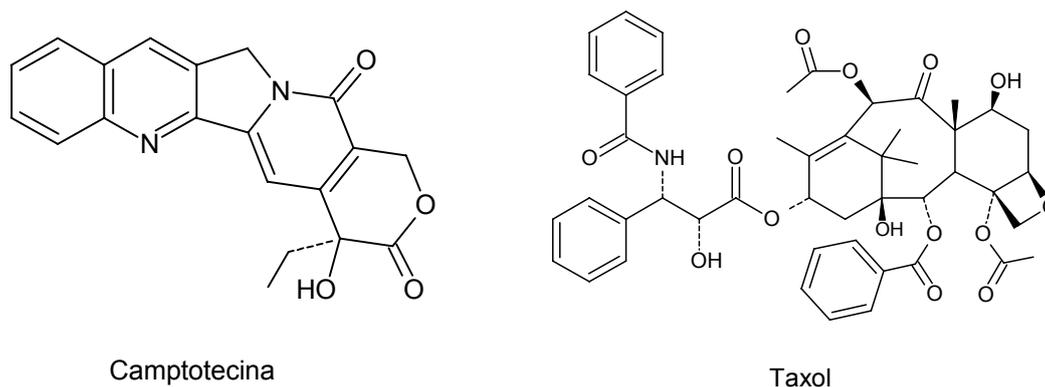


Figura 7: Produtos naturais de plantas terrestres com importante atividade anticâncer desenvolvidas pelo NCI a partir do programa de coletas.

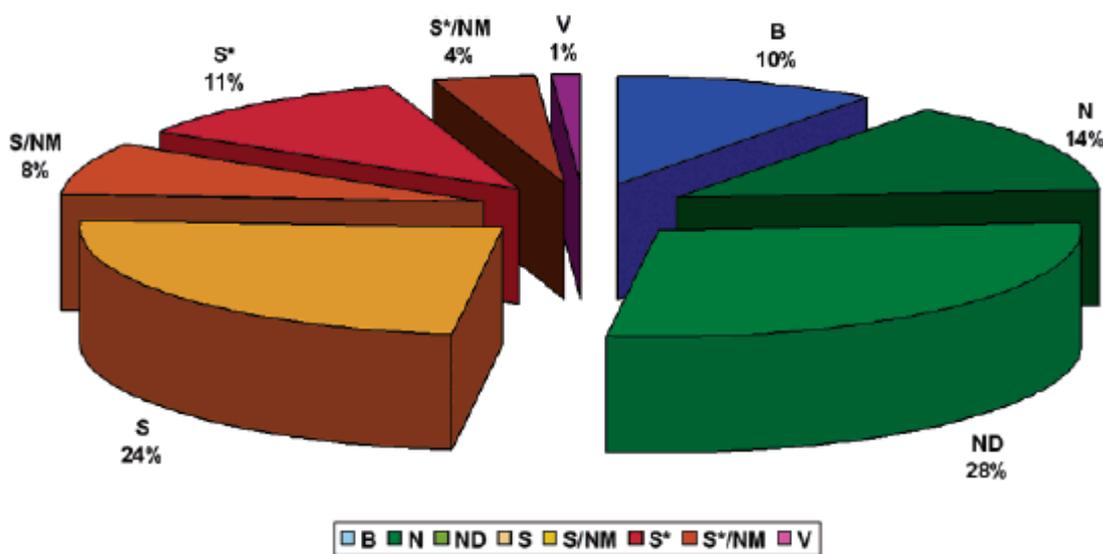


Figura 8: Porcentagem do tipo de drogas anticâncer descobertas desde 1940 até 2006. S (sintéticas); S/NM (Sintética, mas mimetiza a ação de um produto natural); S* (Sintética, mas o esqueleto inicial foi de um produto natural); S*/NM (Sintética, mas o esqueleto inicial foi de um produto natural e mimetiza a sua ação); V (Vacina); B (Produto biológico, peptídeo ou proteína com mais de 45 resíduos de aminoácidos isolados de um organismo ou sintetizado em laboratório); N (Produto natural); ND (Derivado de produto natural com modificações semissintéticas). Retirado de Newman e Cragg, (2005).

Diversas novas entidades químicas isoladas de plantas terrestres são metabólitos secundários que estão atualmente sendo submetidas a ensaios clínicos para terapia anticâncer. Newman e Cragg (2007) relatam que entre 1940 e 2006, 42% do número total de drogas anticâncer descobertas são produtos naturais ou derivados desses produtos (figura 8). Alguns exemplos (figura 9) dessas drogas em fase de estudo são a combretastatina A4, homoharringtonine, 3-*o*-angelato de ingenol, fenoxodiol e flavopiridol.

A combretastatina A4, isolada da *Combretum cafferum* (Combretaceae), uma planta medicinal da África do Sul, gerou em laboratório o fosfato de combretastatina A4 e o AVE-8062 (CIRLA & MANN, 2003; PINNEY *et al.*, 2005). Estes compostos estão em estudos de fase II em vários países da União Européia. Seu mecanismo de ação consiste em ligar-se à tubulina, levando o tumor a sofrer mudanças morfológicas celulares e vasculares (WEST & PRICE, 2004; YOUNG & CHAPLIN, 2004).

A homoharringtonina, por sua vez, é um alcalóide isolado da *Cephalotaxus harringtonia* encontrado na China (POWELL *et al.*, 1970). Estudos indicam que possui atividade contra malignidades hematológicas por inibir a síntese de proteína na célula neoplásica (KANTARJIAN *et al.*, 2001).

O 3-*o*-angelato de ingenol é um análogo da diterpenóide ingenol obtido originalmente da *Euphorbia peplus*, também considerado um agente promissor na quimioterapia para o câncer de pele, cujo mecanismo de ação é a ativação da Proteína Kinase C (KEDEI *et al.*, 2004; OGBOURNE *et al.*, 2004).

O fenoxodiol é um análogo sintético da daidzeína, uma conhecida isoflavona isolada do grão de soja (*Glycine max*), está sendo desenvolvido para a terapia do câncer de colo do útero, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de rins, e câncer de vagina. Seu mecanismo de ação consiste na indução da apoptose devido à inibição de proteínas anti-apoptóticas, incluindo o XIAP e ALETA (KAMSTEEG *et al.*, 2003). Atualmente, o Fenoxodiol está sendo submetido a estudos clínicos nos Estados Unidos e na Austrália (CONSTANTINO *et al.*, 2003).

O flavopiridol é uma droga classificada como sintética, mas a base de sua estrutura é um produto natural chamado de rohitukine. Esse flavonóide é considerado o responsável pela atividade antiinflamatória e imunomoduladora do extrato da *Dysoxylum binectariferum* Hook. f. (Meliaceae), que por sua vez está filogeneticamente relacionada com a *Dysoxylum malabaricum* Bedd., usada para o tratamento da artrite reumatóide. O flavopiridol possui atividade inibitória em receptores do tipo tirosina quinase e atividade inibitória potente no crescimento várias linhagens de carcinoma de mama e pulmão (SAUSVILLE *et al.*, 1999). Atualmente encontra-se nas fases I e II em diversos estudos clínicos, ou em combinação com outros agentes anticâncer contra leucemias, linfomas e outros tumores sólidos (CRAGG & NEWMAN, 2005).

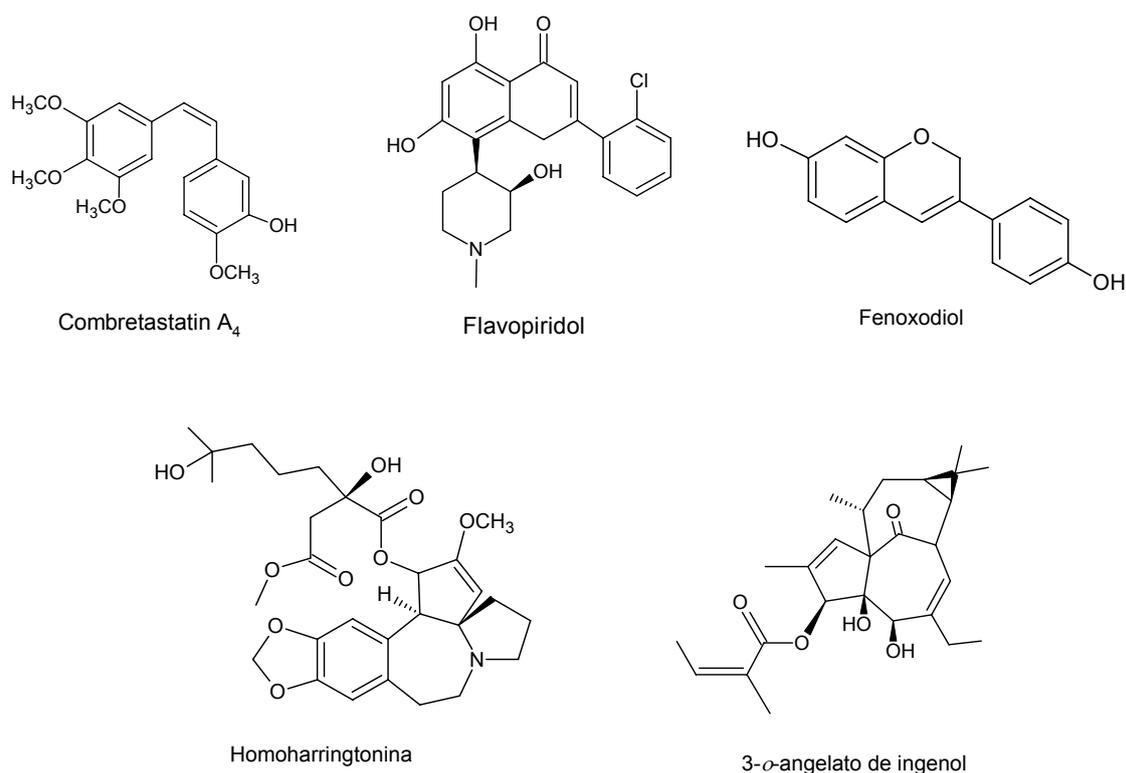


Figura 9: Novas moléculas isoladas ou derivadas de plantas terrestres com potencial anticâncer.

1.4. Lactonas Sesquiterpênicas

As Lactonas Sesquiterpênicas (LST) são terpenóides produzidos principalmente por representantes da família Asteraceae. Constituem uma diversa e singular classe de produtos naturais componentes de óleos essenciais, além de também serem encontradas em outros organismos, como fungos e bactérias (PICMAN, 1986). Uma característica das LST é a presença do anel α -metileno- γ -lactona (figura 10), incluindo outros grupos funcionais como hidroxilas, ésteres e epóxidos (PICMAN, 1986; ZHANG *et al.*, 2005). Diferenças na estrutura cíclica das LST permitem que elas sejam classificadas em quatro grupos distintos: os pseudoguaianolidos, os guaianolidos, os germacranolidos e os eudesmanolidos (PICMAN, 1986; ZHANG *et al.*, 2005) (figura 11).

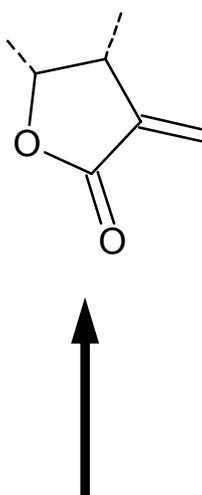


Figura 10: Anel α -metileno- γ -lactona característico de todas as lactonas sesquiterpênicas.

Numerosos estudos sugerem que esses metabólitos secundários exercem um importante papel na proteção de plantas contra organismos patógenos, herbívoros, insetos e mamíferos predadores, e eles também funcionam como agentes alelopáticos em competição com outras plantas. As atenções da comunidade científica voltaram-se para as LST pelo seu potencial

terapêutico fundamentado nas suas diversas atividades biológicas, como atividade antibacteriana, antifúngica, antiplasmódica, antiinflamatória, antihiperálgica, antiúlcera e antitumoral (SKALTSA *et al.*, 2000; IWALEWA *et al.*, 2003; NAVARRO-GARCÍA *et al.*, 2003; SAKAMOTO *et al.*, 2003; FELTENSTEIN *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2005).

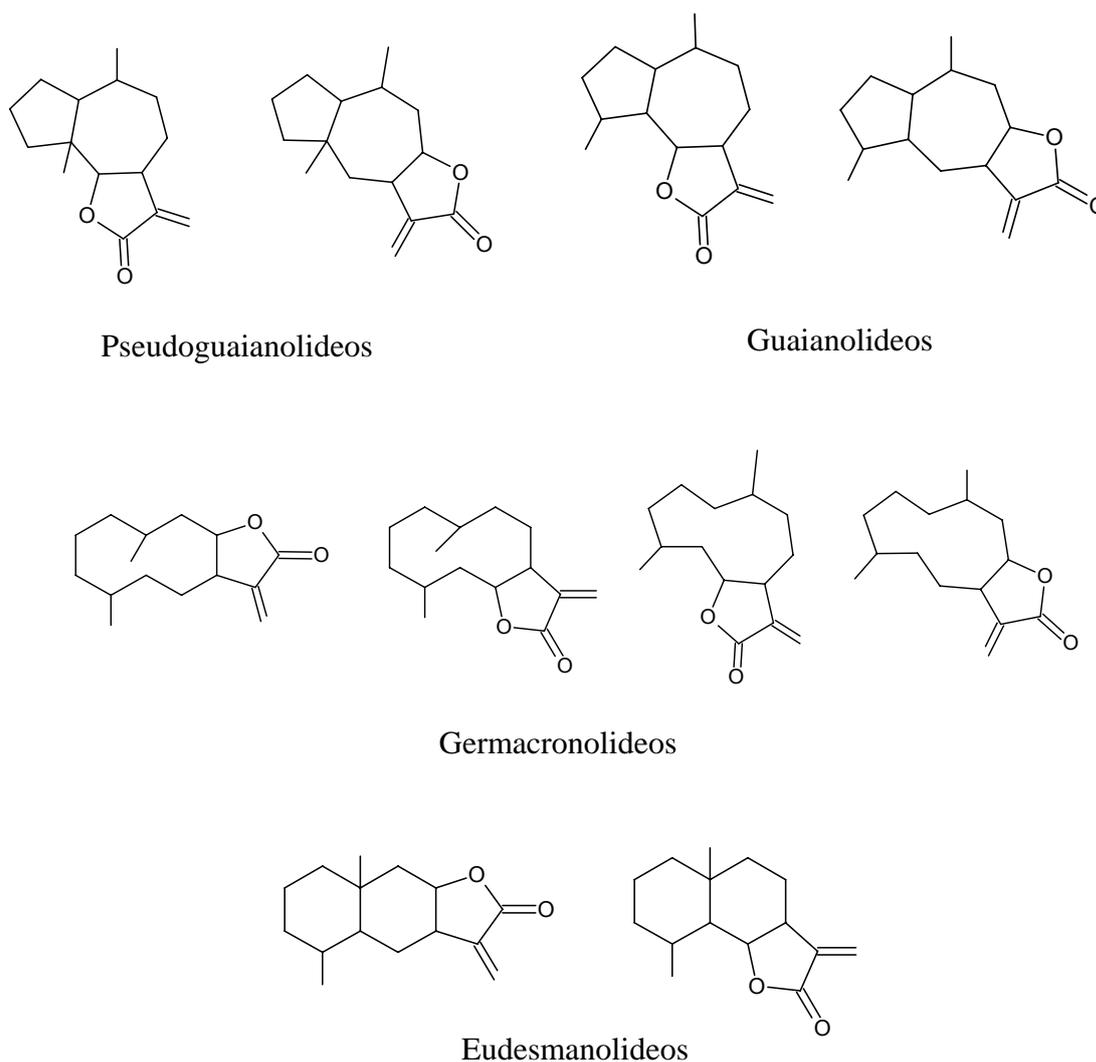


Figura 11: Esqueleto básico da estrutura das diferentes lactonas sesquiterpênicas.

No que concerne a atividade antitumoral, as LST formam o maior grupo de compostos com essa atividade (ROBLES *et al.*, 1995). A maioria dos compostos com essa atividade vem de LST oriundas de plantas da família Asteraceae, embora algumas com a mesma atividade tenham sido isoladas de outras famílias como: Magnoliaceae, Apiaceae e eventualmente uma espécie de fungo (PICMAN, 1986). A relação estrutura atividade das lactonas tem sido estudada em vários modelos. Hartwell e Abbott (1969) concluíram que muitas lactonas com atividade antitumoral possuíam um grupo α -metileno- γ -lactona. Posteriormente foi constatado que esse grupo funcional era requisito para tal atividade, revelando uma estreita relação entre a estrutura e a atividade biológica das LST (SUN *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2003; ENRIZ *et al.*, 1994; GIORDANO *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 2005).

O mecanismo de ação das atividades biológicas das LST continua sendo alvo de intensa pesquisa. Os primeiros estudos sugerem que as LST inibem o crescimento tumoral por alquilação seletiva de macromoléculas que regulam o ciclo celular, e o alvo para tal atividade seriam grupos sulfidrilas encontrados nessas moléculas regulatórias (Kupchan, 1974). Posteriormente foi demonstrado que as LST inibem a síntese de DNA, especialmente a DNA polimerase e a timidilato sintase em células tumorais (LEE *et al.*, 1977; HALL *et al.*, 1978). De fato, Zhang e colaboradores (2005) reforçam que elementos estruturais das lactonas sesquiterpênicas como α,β - ou α,β,γ -carbonilas insaturadas, como α -metileno- γ -lactonas ou ciclopentonas $\alpha-\beta$ insaturadas reagem com nucleófilos, especialmente grupos sulfidril, por adição de Michael. Neste contexto, proteínas como a glutathione seriam alvos preferenciais para as LST, o que justifica a atividade pró-oxidante observada para algumas lactonas como a partenolida (WEN *et al.*, 2002).

Recentemente, o mecanismo de ação proposto para outras ações biológicas das LST é a inibição do fator de transcrição NF- κ B (RÜNGELER *et al.*, 1999, SIEDLE *et al.*, 2004) e Map kinase (HWANG *et al.*, 1996). O NF- κ B é um mediador central na resposta imunológica, pois regula a síntese de Interleucinas pró inflamatórias como a IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- α , bem como modula o gene da ciclooxygenase 2 (assim como a Map kinase), óxido nítrico

sintase, imunorreceptores, moléculas de adesão e fatores de crescimento hematopoético. A inibição farmacológica desse fator de transcrição pode explicar a potente atividade antiinflamatória e antiúlcera exercida pelas LST (ENRIZ *et al.*, 1994, GIORDANO *et al.*, 1992, SCHRODER *et al.*, 1990, HALL *et al.*, 1980). Além disso, o NF-kB também possui papel central no crescimento e diferenciação celular, bem como na indução de apoptose, e tem se revelado um interessante alvo na quimioterapia do câncer (KARIN & LIN, 2002; KARIN *et al.*, 2004).

As lactonas modulam a atividade do sistema imunológico por inibir a ativação de linfócitos T citotóxicos, a síntese de elastase em neutrófilos, produção de óxido nítrico (NO), e a expressão do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (TANIGUCHI *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1999; SIEDLE *et al.*, 2002). Outros achados mostram que a helenalina (figura 12) diminuiu o edema de pata em ratos induzido por carragenina, e suprimiu o crescimento de células neoplásicas (HALL *et al.*, 1980). A partenolida e a encelina (figura 12) mostraram potentes efeitos inibitórios na expressão dos genes do TNF e da ciclooxigenase (HWANG *et al.*, 1996). A cinaropicrina (figura 12), derivada da *Saussurea lappa*, suprime a produção de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α e a IL-8, bem como a liberação de fator relaxante derivado do endotélio (NO). Além disso, também diminui fortemente a estimulação mitogênica e a proliferação de linfócitos TCD4⁺ e de Linfócitos TCD8⁺ (GERTSCH *et al.*, 2003).

Apesar de todo o potencial farmacológico das LST, têm sido observados vários efeitos tóxicos induzidos por essas substâncias, principalmente no sistema nervoso central e no sistema imunológico. As LST demonstraram toxicidade no sistema sensorial em embriões de galinha e induziram encefalomalacia nigrostriatal eqüina, conhecida como a doença de Parkinson em cavalos, por diminuição da glutatona mitocondrial acompanhada pelo aumento de radicais livres que induzem um dano nas membranas celulares da substância negra (STEVENS *et al.*, 1990, ROBLES *et al.*, 1997). As LST também induzem forte reação alérgica (PICMAN, 1986, MOLLER *et al.*, 2002, WARSHAW & ZUG, 1996). Foi reportado que alguns óleos naturais que fazem

parte de cosméticos e perfumes derivados de plantas medicinais oriundas do oriente que possuem LST podem induzir dermatite de contato (MITCHEL, 1974; MITCHELL & EPSTEIN, 1974). Além disso, as LST ainda podem ter efeito imunotóxico, induzindo supressão da síntese de IL-2 por linfócitos T CD4⁺ (HUMAR *et al.*, 2003) e supressão da atividade de neutrófilos (SIEDLE *et al.* 2003).

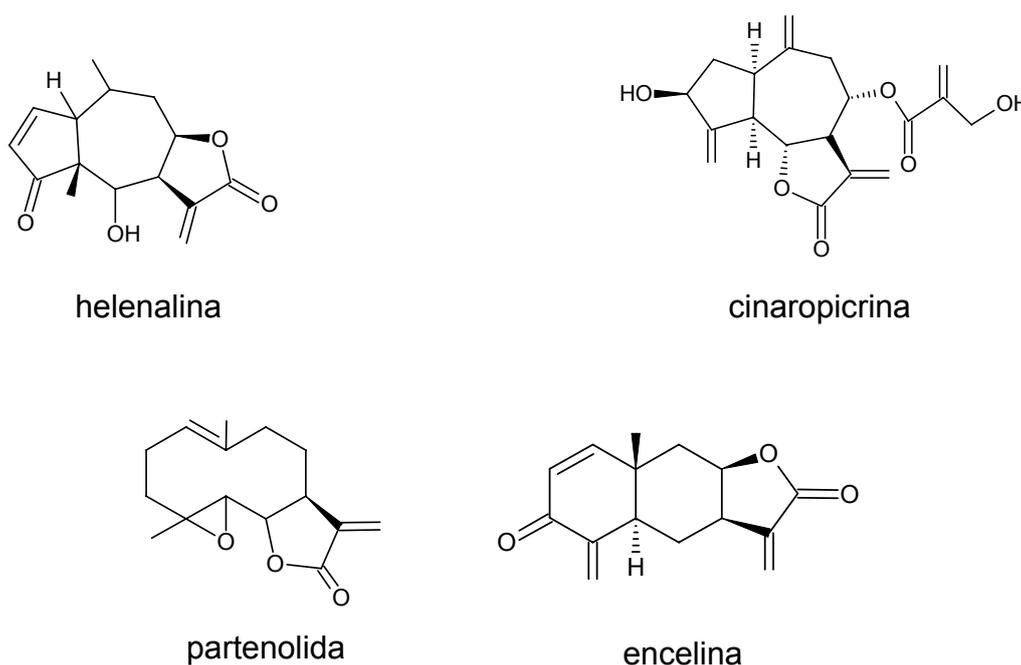


Figura 12: Estrutura molecular de algumas lactonas sesquiterpênicas bioativas.

O germacranolido furanoheliangolideo 15-deoxigoiazensolido (Figura 13) é uma lactona sesquiterpênica isolada de diversas espécies da subtribo *Lychnophorinae* (tribo *Vernonieae*, família das *Asteraceae*). Santos e colaboradores (2004) demonstraram que o goiazensolido (Figura 13), outra lactona com estrutura similar ao 15-deoxigoiazensolido contendo uma oxidação no carbono 15, era fortemente citotóxica a várias linhagens de células tumorais. Além disso, furanoheliangolidos parecem modular o processo inflamatório

através da inibição do fator de transcrição nuclear NF- κ B, por alquilação seletiva da sua subunidade p65 (RÜNGELER *et al.*, 1999). Os furanoheliangolidos mais potentes pertencem a classe do goiazensolido. A centraterina (Figura 13) e o goiazensolido isolados de extratos glandulares de plantas apresentam potente atividade anti-inflamatória via inibição de NF- κ B *in vivo* (RÜNGELER *et al.*, 1999; SAKAMOTO *et al.*, 2003).

Em estudos recentes do nosso grupo de pesquisa foi avaliada a genotoxicidade do 15-deoxigoiazensolido utilizando linhagens de bactérias e leveduras (Vasconcellos *et al.*, 2007). Neste estudo, foi demonstrado que o 15-deoxigoiazensolido é mutagênico em leveduras possivelmente devido a sua intercalação no DNA e efeitos pró-oxidantes como depleção de glutathiona o que exacerba o dano ao material genético. Esses efeitos e a similaridade estrutural como o composto citotóxico goiazensolido sugerem que o 15-deoxigoiazensolido também possua atividade em células tumorais, entretanto não existem dados na literatutra a esse respeito.

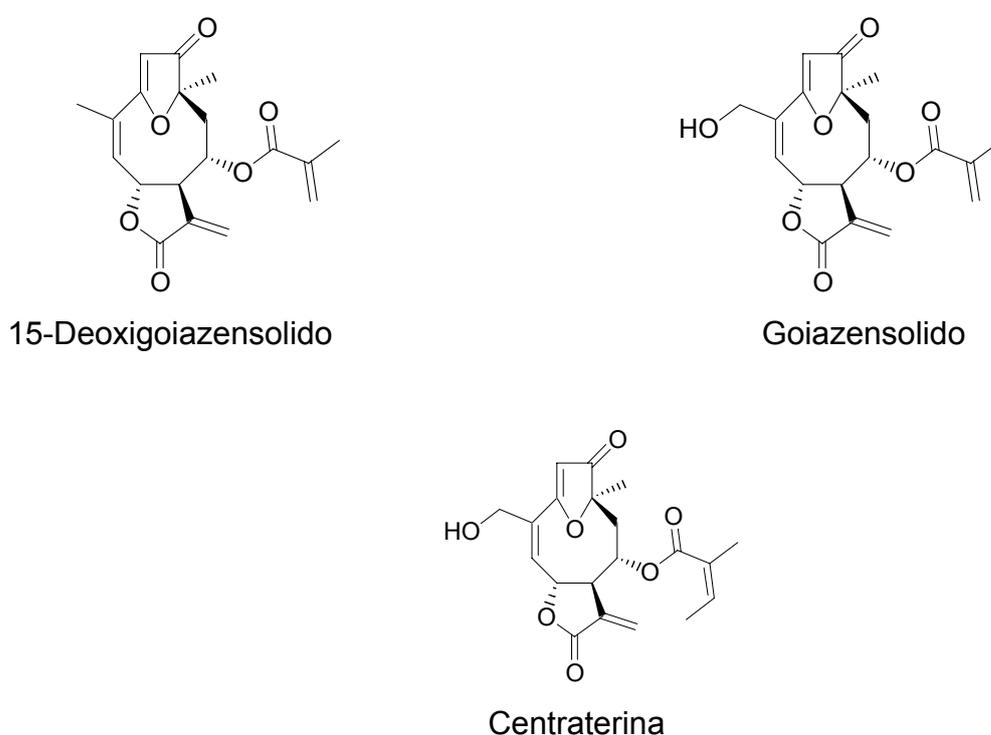


Figura 13: Estrutura química de germacronolido furanoheliangolidos da classe do goiazensolido.

Devido às suas propriedades anticâncer, as LST mostram-se grandes promissoras para uso na quimioterapia. Os futuros desafios estão focados, principalmente, em duas alternativas: o uso “solo” dessas substâncias como agentes quimioterápicos, procurando diminuir seus efeitos tóxicos e aumentar seu potencial antineoplásico a partir do estudo de sua estrutura-atividade, e a utilização dessas moléculas associadas a outros quimioterápicos. Para tanto, estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* são necessários para um melhor esclarecimento do seu mecanismo de ação e de seus possíveis efeitos tóxicos no organismo.

2 . OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar as propriedades anticâncer da lactona sesquiterpênica 15-deoxigoiazensolido, em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do 15-deoxigoiazensolido em diferentes linhagens de células tumorais.
- Avaliar o mecanismo de ação do 15-deoxigoiazensolido, utilizando a linhagem tumoral HL-60 como modelo.
- Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* e a toxicidade do 15-deoxigoiazensolido em animais transplantados com tumor Sarcoma 180 e carcinossarcoma de Walker 256.
- Avaliar o potencial alergênico do 15-deoxigoiazensolido em camundongos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais utilizados

3.1.1. Equipamentos

- Agitador de placa, MLW modelo Thys 2
- Agitador vortex, AD8850
- Balança analítica, GEHAKA AG200
- Balança pra pesar animais, Filizola
- Banho-Maria, MOD. 105 DI DELLTA
- Centrífuga centimicro, FANEM Modelo 212
- Centrífuga de lâminas, Shandon Shouthern Cytospin
- Centrífuga de placas Eppendorf, Modelo Centrifuge 5403
- Centrífuga excelsa Baby I, FANEM Modelo 206
- Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte Mini
- Contador manual, Division of Bexton, Dickinson and Company
- Destilador de água
- Deonizador de água Mili-Q, Millipore
- Espectrofotômetro de placas, DTX 880 multimode detector, Beckman Coulter
- Espectrômetro de massas, Micromass, Quattro Micro™
- Fluxo laminar, VECO
- HTS (*High throuput screeing* biomek 3000), Beckman Coulter
- Incubadora de células (CO2 Water-Jacket Incubator), NUAIRES TS Autoflow
- Microscópio de fluorescência, Olympus BX41
- Microscópio óptico, Metripex Hungray PZO-Labimex Modelo Studar lab
- Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot
- Micrótomo – SLEE - MANZ BR1
- Pipetas automáticas, Gilson

3.1.2. Reagentes

- Ácido clorídrico (HCl), Vetec
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), Proquímios
- Bicarbonato de Sódio, Dinâmica
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), Sigma
- Brometo de Etídio, Sigma
- Cloreto de sódio (NaCl), Vetec
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Vetec
- Etanol, Vetec
- Formaldeído, Dinâmica
- Fosfato de sódio, Labsynth
- Hematoxilina 0,1%, Labsynth
- Hidróxido de sódio (NaOH), VETEC
- Iodeto de propídeo, Sigma
- Meio de cultura para células RPMI ou DMEM, Cultilab
- Metanol, Vetec
- Rodamina 123, Sigma
- Soro fetal bovino (SFB), Cultilab
- Tripsina, Cultilab
- Tris – Base, Proquímios
- Triton X – 100, Isofar

3.1.3. Fármacos

- 5 – Fluorouracil, Sigma
- Doxorubicina, Sigma
- Estreptomicina, Cultilab
- Gentamicina, Novafarma
- Penicilina, Cultilab

3.1.4. Isolamento do 15-deoxigoiazensólido

O 15-deoxigoiazensólido (figura 13) foi isolado do extrato diclorometano das folhas de *Minasia alpestris* através de cromatografia preparativa em CLAE (ODS-Shimadzu, coluna 5.0mm^o—250mm, MeOH–H₂O, λ = 260 nm, fluxo de 8 mL/min). A estrutura da molécula isolada foi comparada à estrutura padrão por RMN e espectrometria de massa de alta resolução conforme descrito em estudo anterior (CROTTI *et al.*, 2005). Todo esse procedimento foi realizado no laboratório do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.2. Células

3.2.1. Linhagens Celulares Utilizadas

As linhagens celulares utilizadas para avaliação da atividade citotóxica foram obtidas do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos – (NCI-EUA) e estão listadas quanto à origem e tipo histológico na tabela 2.

Tabela 2: Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*

| Linhagem | Tipo Histológico | Origem |
|------------|------------------------------|--------|
| CEM | Leucemia linfocítica | Humana |
| HL-60 | Leucemia promielocítica | Humana |
| K-562 | Leucemia mielocítica crônica | Humana |
| Molt-4 | Leucemia linfoblástica | Humana |
| HCT-8 | Carcinoma de cólon | Humana |
| MDA-MB-435 | Melanoma | Humana |
| PC-3 | Carcinoma de próstata | Humana |
| B16 | Melanoma | Murina |

3.2.2. Tumores Experimentais

As linhagens celulares dos tumores Sarcoma 180 e Carcinossarcoma de Walker foram fornecidas pelo Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

3.3. Animais

Foram utilizados Camundongos Swiss machos de 7 a 10 semanas de vida, pesando entre 25 e 30g, e ratos albinos Wistar fêmeas, pesando de 120 a 140g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos em colônia fechada no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. O protocolo de estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará.

3.4. Experimentos *in vitro*

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

3.4.1.1. Manutenção das Células

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

3.4.1.2. Ensaio do MTT

Este ensaio é utilizado para determinar citotoxicidade, proliferação e ativação celular. É uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromida (MTT), um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias ativas das células vivas (MOSMANN, 1983).

3.4.1.2.1. Procedimento Experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram plaqueadas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL, para células suspensas e 1×10^5 células/mL para células aderidas. O 15-deoxigoiázensólido, assim como a doxorrubicina, foi incubado durante 72 h juntamente com a suspensão de células. Após o período de 69 h de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200 μ L da solução de MTT a 0,5 mg/mL, tendo sido reincubada por mais 3 h, em estufa a 37°C e 5 % CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10min), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi resuspenso em 150 μ L de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm.

3.4.1.2.2. Análise dos Dados

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. Foi plotado o gráfico absorbância x concentração e determinado as suas CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50 % do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism.

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

3.4.2.1. Viabilidade Celular - Exclusão por Azul de Tripán

O teste de exclusão por azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância testada. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível dessa maneira observar uma coloração azulada nas células mortas.

3.4.2.1.1. Procedimento Experimental

Células da linhagem HL-60, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, foram incubadas por 24 h com o 15-deoxigioazensolido e examinadas ao microscópio de inversão. Foram utilizadas as seguintes concentrações 0,25; 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$. Foi retirado 90 μL da suspensão de células e adicionado a 10 μL do azul de tripan. As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer. A Doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (como descrito em Veras *et al.*, 2004).

3.4.2.1.2. Análise dos Dados

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

3.4.2.2. Inibição da Síntese de DNA – BrdU

A bromodeoxiuridina (BrdU) é uma base nitrogenada análoga a Timidina. Quando as células estão sintetizando DNA o BrdU é incorporado no lugar da timina. A detecção do BrdU incorporado nas células é feita por imunocitoquímica.

3.4.2.2.1. Procedimento Experimental

Três horas após a adição do BrdU na cultura de células HL-60 ($0,3 \times 10^6$ cels/mL), lâminas para cada amostra foram preparadas e postas para secar por 2 h. Após o período de secagem foram fixadas em metanol: ácido acético (7:1,5) por 5 minutos. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 minutos a 70°C e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram circuladas com caneta hidrofóbica e incubadas com anticorpo primário e deixadas na geladeira durante a noite em câmara úmida. As células foram incubadas com anticorpo secundário biotinado por 20 minutos e, em seguida, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 minutos. Foi adicionado o cromógeno DAB por 1-5 minutos e, em seguida, removido com água destilada. A contracoloração das células foi realizada com hematoxilina da Hanks a 0,1% (como descrito em Veras *et al.*, 2004). Foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,25, 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$. A Doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo

3.4.2.2.2. Análise dos Dados

Duzentas células foram contadas diferenciando-as entre núcleo marrom (incorporaram o BrdU) e não-marrom. O percentual de células marcadas em marrom entre os diferentes grupos foi comparado por ANOVA seguida de Student Newman Keuls com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

3.4.2.3. Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

O método de coloração pelo brometo de etídio / laranja de acridina (McGAHON *et al.*, 1995) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da coloração diferencial por fluorescência e baseia-se na revelação das células (controle e tratadas) com a concentração de brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA) ao nível do núcleo. A laranja de acridina intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas. O brometo de etídio é incorporado majoritariamente por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA corando-o de laranja; ligando-se fracamente ao RNA, que se mostrará com uma coloração vermelha. As células viáveis com membrana intacta apresentaram núcleo uniformemente corado de verde pela LA; O BE marca muito fracamente ou muitas vezes não marca, pois dificilmente atravessa a membrana não lisadas. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentaram manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE; morfológicamente observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células em necrose (lesão de membrana) apresentam um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e não há formação de corpos apoptóticos. Possivelmente, as membranas plasmáticas permaneçam intactas durante o fenômeno apoptótico até os últimos estágios quando se tornam permeáveis aos solutos normalmente retidos (KUMMAR *et al.*, 2004).

3.4.2.3.1. Procedimento Experimental

Foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,25, 0,5 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A Doxorubicina (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi usada como controle positivo. Após a incubação (24 h), a suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 3 min em baixa rotação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 μL de solução de PBS. Em seguida, 1 μL da solução de BE:LA foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células

transferido para uma lâmina e montado com lamínula e em seguida levadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares (como descrito em GENG *et al.*, 2003).

3.4.2.3.2. Análise dos Dados

Foram contadas 300 células, em duplicata, cada amostra para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas) e montadas lâminas que foram fotografadas para o registro visual dos efeitos. O percentual de células viáveis, necróticas ou apoptóticas entre os diferentes grupos foi comparado por ANOVA seguida de Student Newman Keuls com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

3.4.2.4. Determinação da Integridade de Membrana por Citometria de Fluxo

A análise da integridade da membrana plasmática é uma importante ferramenta para estudar o tipo de morte celular, visto que apenas na necrose ela apresenta-se precocemente alterada. O teste se baseia na capacidade do iodeto de propídeo (IP), hidrofílico, penetrar em célula cuja membrana esteja rompida e após a ligação ao DNA emitir alta fluorescência quando é excitado pelo laser de argônio (488 nm). A célula com membrana íntegra emite baixa fluorescência. Deste modo, este método permite avaliar a viabilidade celular através da verificação da integridade da membrana plasmática (MACKLIS & MADISON, 1990).

3.4.2.4.1 Procedimento Experimental

A determinação da integridade da membrana celular foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o PI como agente fluorogênico. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O

controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância.

As células HL-60 foram plaqueadas na densidade de 3×10^5 células/mL com diferentes concentrações do 15-deoxigoiázensólido (0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$). Uma alíquota de 50 μL foi recolhida 24 h após a incubação com a substância. As células foram diluídas com a solução de PI (2 $\mu\text{g/mL}$ em PBS), na ausência de luz e a 37 °C, e, após 5 minutos, analisadas por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

3.2.4.4.2. Análise dos Dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de n experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

3.2.4.5. Determinação do Potencial Transmembrânico da Mitocôndria

A mitocôndria é responsável pela iniciação da via intrínseca da apoptose. Quando bcl-2/xl é liberado da membrana externa da mitocôndria, forma-se um poro permitindo a saída de H^+ , causando despolarização mitocondrial, e também seguida de fatores como citocromo *c*, Smac/Diablo, dentre outros. A rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, é seqüestrado pra dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto que as mitocôndrias despolarizadas terão menor afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor

fluorescência. Deste modo, este ensaio foi utilizado para a investigação da apoptose por parte da substância em estudo através da observação da alteração do potencial transmembrânico mitocondrial (MARCHETTI *et al.*, 1996).

3.2.4.5.1. Procedimento Experimental

A determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria da célula foi avaliada por citometria de fluxo utilizando a rodamina 123 como agente fluorogênico. A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância.

As células HL-60 foram plaqueadas na densidade de 3×10^5 células/mL com diferentes concentrações do 15-deoxigoiazensólido (0,5 µg/mL e 1 µg/mL). Uma alíquota de 50 µL foi recolhida 24 h após a incubação com a substância. As células foram diluídas com a solução de rodamina 123 (1 µg/mL em PBS), na ausência de luz e a 37°C, e, após 15 minutos. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspensionado em PBS e reincubado por 30 minutos e, então, analisadas por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

3.2.4.5.2. Análise dos Dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de n experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

3.2.4.6. Determinação do Conteúdo de DNA Nuclear da Célula

As diferentes fases do ciclo celular podem ser determinadas a partir do conteúdo de DNA que elas apresentam. Deste modo, o resultado da distribuição do conteúdo em DNA nuclear de uma população de células pode dar-se em G₀/G₁, S e G₂/M (SHAPIRO, 1985; CIBAS, 1995).

Para determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula foi utilizado o PI como agente fluorogênico. Esse teste baseia-se na capacidade do PI se ligar ao DNA. Inicialmente a membrana plasmática das células é lisada por um detergente para que o PI possa se ligar ao núcleo. Assim, as fases do ciclo celular foram determinadas através do conteúdo do DNA que elas apresentavam (MELAMED *et al.*, 1979; SHAPIRO, 1985; CIBAS, 1995).

3.2.4.6.1. Procedimento Experimental

A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o PI como agente fluorogênico. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância.

As células HL-60 foram plaqueadas na densidade de 3 x 10⁵ células/mL com diferentes concentrações do 15-deoxigoiazensólido (0,5 µg/mL e 1 µg/mL). Uma alíquota de 50 µL foi recolhida 24 h após a incubação com a substância. As células foram diluídas com a solução de lise contendo o PI (0,1 % de citrato de sódio, 0,1 % de triton X-100 e 2 µg/mL iodeto de propídeo em PBS), na ausência de luz e a 37°C, e, após 30 minutos, analisadas por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

3.2.4.6.2. Análise dos Dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de n experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

3.5. Experimentos *in vivo*

3.5.1. Manutenção dos Tumores

3.5.1.1. Sarcoma 180

Os animais doadores de tumor foram sacrificados por deslocamento cervical após 10 dias do implante tumoral. Foram retiradas as células tumorais da cavidade peritoneal utilizando seringa estéril. Em seguida o conteúdo aspirado foi colocado em tubo cônico, com 1 % de gentamicina. O material coletado, uma vez homogeneizado, foi corado com azul de tripan e colocado em câmara de Neubauer para avaliar a viabilidade e fazer a contagem celular. O homogenato foi diluído para a concentração de $2,0 \times 10^6$ células tumorais/mL e inoculado 500 μ L por via subcutânea em camundongos *swiss*. Após 10 dias de evolução, o tumor foi retirado dos animais doadores e o procedimento acima referido foi repetido.

3.5.1.2. Carcinossarcoma de Walker 256

Foi utilizado o carcinossarcoma de Walker 256 com 8 a 10 dias de implante em ratos albinos Wistar. O rato doador ou de manutenção foi sacrificado com éter etílico e feita na região do tumor assepsia com álcool iodado. Em seguida foram realizadas a incisão com remoção da epiderme do animal e posterior retirada do tumor através de pinça e tesoura. O tumor foi colocado em placa de Petri contendo solução de Ringer lactato com 1 % de

gentamicina. Após a retirada de partes necrosadas, foram selecionados fragmentos tumorais de aproximadamente 2 a 3 mm de diâmetro, sendo estes transferidos para outra placa de petri contendo a mesma solução. Os fragmentos tumorais foram triturados com tesoura, peneirados e a solução restante foi submetida ao teste de viabilidade celular por azul de tripan e colocado em câmara de Neubauer para avaliar a viabilidade e fazer a contagem celular. O homogenato foi diluído para a concentração de $1,0 \times 10^6$ células tumorais/mL e inoculado 1 mL por via subcutânea em ratos Wistar. Após 10 dias de evolução, o tumor foi retirado dos animais doadores e o procedimento acima referido foi repetido.

3.5.2. Experimentos com Sarcoma 180

3.5.2.1. Avaliação da Sobrevida e do Crescimento Tumoral

Para implantação do tumor sólido, 0,5 mL da solução preparada contendo células do tumor Sarcoma 180 foi injetado via subcutânea na axila esquerda de cada camundongo. Os animais foram inoculados com $1,0 \times 10^6$ células, em seguida foram divididos aleatoriamente em grupos (n=10) e tratados após 24 horas com doses de lactona por via intraperitoneal nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 mg/m² (1,67, 3,34, 8,36 e 21,45 mg/Kg), enquanto o controle negativo recebeu o veículo utilizado para solubilização da droga (DMSO 2 %). Houveram ainda 6 reforços das mesmas doses de lactona em dias alternados, sendo ainda medido o volume do tumor até a sua morte, quando foram retirados tumor, baço, fígado e rins para avaliação histopatológica.

O tratamento das substâncias testadas foi realizado de acordo com o cálculo da superfície corporal:

$$\text{Superfície (m}^2\text{)} = 0,008416 \sqrt{P(\text{Kg}) \times h(\text{cm})}$$

onde:

P = peso do animal

h = comprimento do animal da cabeça ao início da cauda

O volume do tumor (mm^2) foi calculado a partir da fórmula:

$$\text{Volume do tumor (cm}^3\text{)} = (D \times d^2)/2$$

onde:

D = diâmetro maior (cm)

d = diâmetro menor (cm)

3.5.2.2. Avaliação da Atividade Antitumoral

Quatro grupos de camundongos foram inoculados com 2×10^6 células tumorais por via subcutânea na região axilar. Vinte e quatro horas após a inoculação das células, os animais foram tratados com 5 mg/m^2 ($1,67 \text{ mg/Kg}$), e 10 mg/m^2 ($3,34 \text{ mg/Kg}$) de lactona, 50 mg/m^2 ($21,45 \text{ mg/Kg}$) de 5-FU (controle positivo) e veículo (controle negativo) respectivamente durante 7 dias consecutivos por via intraperitoneal. Dez dias após o início do tratamento, os animais foram sacrificados para a pesagem do tumor, baço, fígado e rins e posterior análise histopatológica.

O percentual de inibição do crescimento tumoral foi feito de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = [A - B / A] \times 100$$

onde;

A: é a média dos pesos dos tumores do grupo controle;

B: é a média dos pesos dos tumores do grupo tratado.

3.5.2.3. Análise Histopatológica

Ao final de cada experimento foram retirados os órgãos: baço, fígado, rins, além do tumor e armazenados em formaldeído 10 % para posterior exame histológico. Os materiais foram cortados em pequenos fragmentos e submetidos à desidratação e diafanização, e em seguida cortados, numa espessura de 5 μm . Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio óptico.

As lâminas usadas em nosso estudo foram confeccionadas pelo Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará.

3.5.3. Experimentos com Carcinossarcoma de Walker 256

3.5.3.1. Avaliação da Atividade Antitumoral

Quatro grupos de ratos Wistar foram inoculados com $1,0 \times 10^6$ células tumorais por via subcutânea na região axilar. Vinte e quatro horas após a inoculação das células, os animais foram tratados com 5 mg/Kg e 10 mg/Kg de lactona, 10 mg/Kg de 5-FU (controle positivo) e veículo (controle negativo) respectivamente durante 7 dias consecutivos por via intraperitoneal. Dez dias após o início do tratamento, os animais foram sacrificados para a pesagem do tumor, fígado, rins e baço.

O percentual de inibição do crescimento tumoral foi feito de acordo com a mesma fórmula descrita acima.

3.5.4. Análise Estatística

Os dados dos pesos dos tumores e órgãos foram comparados por ANOVA seguida de Student Newman Keuls, considerando um nível de significância de 5 %. Para análise da sobrevida foi utilizado o teste de Kaplan Meyer e as curvas obtidas comparadas através do χ^2 .

3.5.5. Determinação da Síntese de IgE Anti-Lactona

3.5.5.1. Imunização dos Animais

Para avaliar o potencial alergênico da lactona sesquiterpênica 15-deoxigoiazensolido, três grupos de 5-7 camundongos “Swiss” fêmeas com 25 a 30 g foram utilizados para o experimento, sendo o primeiro grupo imunizado pela via subcutânea com 100 μ g de lactona, aplicando-se um reforço da mesma dose 21 dias após a primeira imunização. O grupo controle positivo utilizou-se a Ovalbumina e o grupo controle negativo foi utilizado solução salina 0,9 %. A coleta de sangue foi realizada no 28° dia.

3.5.5.2. Obtenção dos Antissoros

As amostras de sangue foram coletadas com pipetas Pasteur por punção no plexo retro-orbital dos camundongos. O sangue foi deixado em repouso durante uma hora à temperatura ambiente para a retração do coágulo após o que o soro foi recolhido e centrifugado a 3.000 g por 5 minutos para que as hemácias fossem separadas e desprezadas. Em seguida, o antissoro obtido foi armazenado a 20°C.

3.5.5.3. Sorologia: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Os antissoros foram submetidos ao teste de ELISA indireto (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de acordo com Pereira e Guedes (2005). Para esse ensaio, as placas de marca “Cultilab” foram sensibilizadas com 10 μ g de Ovalbumina diluída em 100 μ L de solução salina em cada poço ou 10 μ g de 15-deoxigoiazensolido diluído em 100 μ L de água destilada contendo 2 % de DMSO. As placas foram incubadas por 18 horas a uma temperatura de 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de lavagem (salina de NaCl 0,9 % contendo Tween-20 a 0,05 %) e bloqueadas por 2 h a uma temperatura de 37°C em solução de bloqueio (solução salina

contendo 5 % de leite Molico). Após a lavagem das placas, foi realizada uma diluição seriada dos antíseros obtidos dos camundongos imunizados, sendo a diluição inicial 1:10 em 200 μ L de solução de bloqueio nos devidos poços e as placas foram incubadas por 18 horas a uma temperatura de 4°C. As placas foram novamente lavadas com solução de lavagem e em seguida cada poço foi adicionado o conjugado IgE anti-mouse ligado à peroxidase, em uma diluição de 1:500 em solução de bloqueio a uma temperatura de 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas com solução salina 0,9 % contendo Tween-20 0,05 %. A revelação foi desenvolvida pela a adição de orthophenylenediamine (OPD) após a placa ter sido incubada por 20 minutos a temperatura de 37°C. A intensidade da reação foi avaliada espectofotometricamente em um comprimento de onda de 490 nm com um espectofotômetro BECKMAN COUTER.

3.5.5.4. Análise dos Resultados

Os dados das absorvâncias dos três grupos foram comparados por ANOVA seguida de Student Newman Keuls, considerando um nível de significância de 5 %.

4. RESULTADOS

4.1. Estudos *in vitro*

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

O potencial citotóxico da lactona sesquiterpênica 15-deoxigoiazensólido foi avaliado em oito linhagens de células tumorais (HL-60, CEM, K-562, Molt-4, HCT-8, MDA-MB-435, PC3 e B-16) através do método do MTT, após 72 horas de exposição. A tabela 3 apresenta os valores de CI_{50} obtidos. O 15-deoxigoiazensólido mostrou potente atividade antitumoral em todas as linhagens testadas com CI_{50} variando de 0,09 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem CEM a 0,56 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem K-562. Importante ressaltar a linhagem MDA-MB-435 por ter a maior sensibilidade à lactona quando comparado à doxorrubicina (controle positivo). Para este ensaio, foram consideradas ativas aquelas substâncias que apresentaram $CI_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$ (FÁVARO *et al.*, 1990).

Tabela 3: Atividade citotóxica da lactona sesquiterpênica 15-deoxigoiazensólido em linhagens de células tumorais após 72 horas de incubação. A tabela apresenta os valores de CI_{50} e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prism. Doxorubicina foi usada como controle positivo.

| Linhagem | Doxorrubicina | 15-deoxigoiazensólido |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
| CEM | 0,02 | 0,09 |
| | 0,01 – 0,02 | 0,08 – 0,10 |
| HL-60 | 0,02 | 0,12 |
| | 0,01 - 0,02 | 0,11 – 0,12 |
| K-562 | 0,14 | 0,56 |
| | 0,09 – 0,22 | 0,41 – 0,76 |
| Molt-4 | n.t. | 0,14 |
| | | 0,11 – 0,17 |
| HCT-8 | 0,04 | 0,10 |
| | 0,03 -0,05 | 0,09 – 0,10 |
| MDA-MB-435 | 0,48 | 0,18 |
| | 0,34 – 0,65 | 0,03 – 0,94 |
| PC-3 | 0,24 | 0,39 |
| | 0,38 – 0,68 | 0,24 – 0,63 |
| B16 | 0,03 | 0,45 |
| | 0,02 – 0,04 | 0,32 – 0,63 |

n.t.=não testado

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

4.2.1 - Viabilidade Celular em HL-60

A análise da viabilidade celular em linhagem leucêmica de HL-60 por exclusão de azul de tripan, depois de 24 horas de exposição, demonstra que a lactona sesquiterpênica 15-deoxigoiazensolido causou uma significativa redução ($p < 0,05$) no número de células viáveis nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de 24,0; 32,3 e 53,5 %, respectivamente (Figura 14). A doxorrubicina foi testada como controle positivo na concentração de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ causando 38,5 % de redução no número de células viáveis para HL-60.

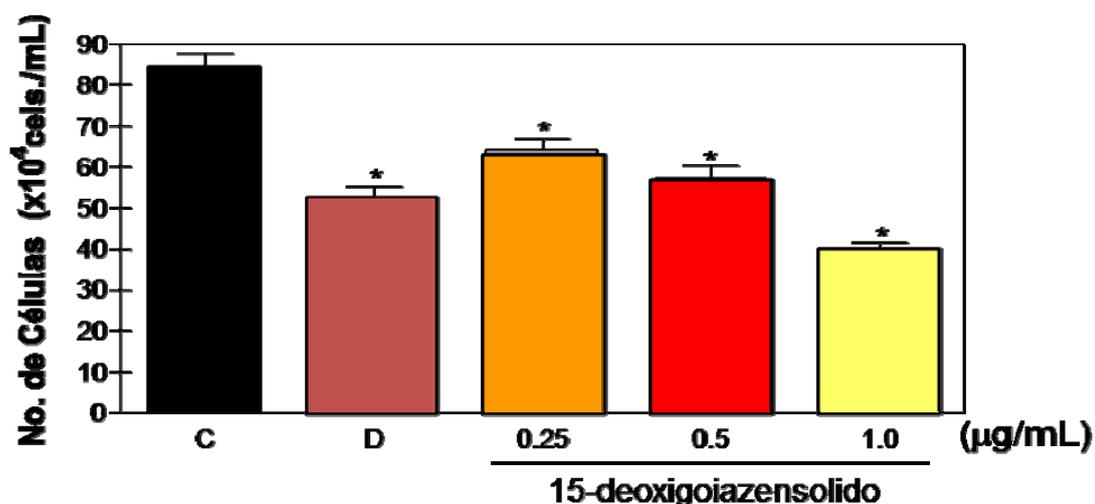


Figura 14: Efeito do 15-deoxigoiazensolido na viabilidade das células leucêmicas HL-60, determinado por exclusão de azul de tripan depois de 24 horas de incubação. O controle negativo foi realizado na presença do veículo usado para diluir a droga (C). Doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls test.

4.2.2. Inibição da Síntese de DNA – Incorporação de BrdU

Neste ensaio, foi avaliada a capacidade proliferativa das células tratadas em comparação as não-tratadas pela incorporação de BrdU no DNA. A figura 15 apresenta o efeito do 15-deoxigoizensolido na inibição da síntese de DNA em células leucêmicas (HL-60) depois de 24 horas de exposição. A concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 33,4 % da síntese de DNA ($p < 0,05$). Nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 0,25 $\mu\text{g/mL}$ não houve inibição significativa da síntese de DNA. A doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo e causou inibição de 37,3 % da síntese de DNA.

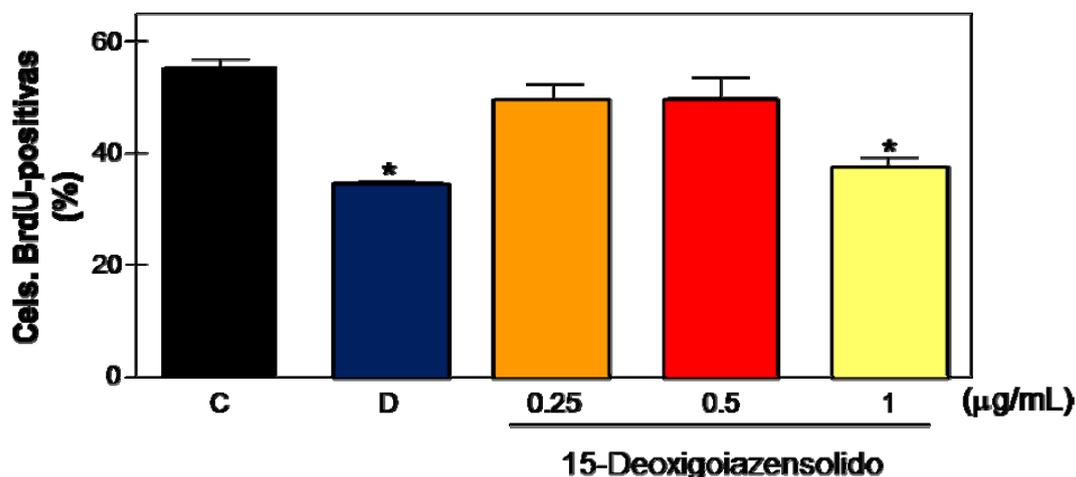


Figura 15: Efeito do 15-deoxigoizensolido na incorporação do 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) em células leucêmicas HL-60 depois de 24 horas de incubação. O controle negativo foi realizado na presença do veículo usado para diluir a droga (C). Doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ comparado com o controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls test.

4.2.3. Análise Morfológica – Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

Após as células leucêmicas HL-60 terem sido tratadas com 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ da lactona sesquiterpênica por 24 horas, ocorreu um significativo aumento do número de células apoptóticas (Figura 16). A apoptose induzida pelo 15-deoxigoiazensolido ocorreu de forma dependente da concentração ($p < 0,05$). Da mesma forma, as células tratadas com doxorubicina apresentaram características de células apoptóticas. O controle experimental apresentou ocasionais células apoptóticas e raras células necróticas.

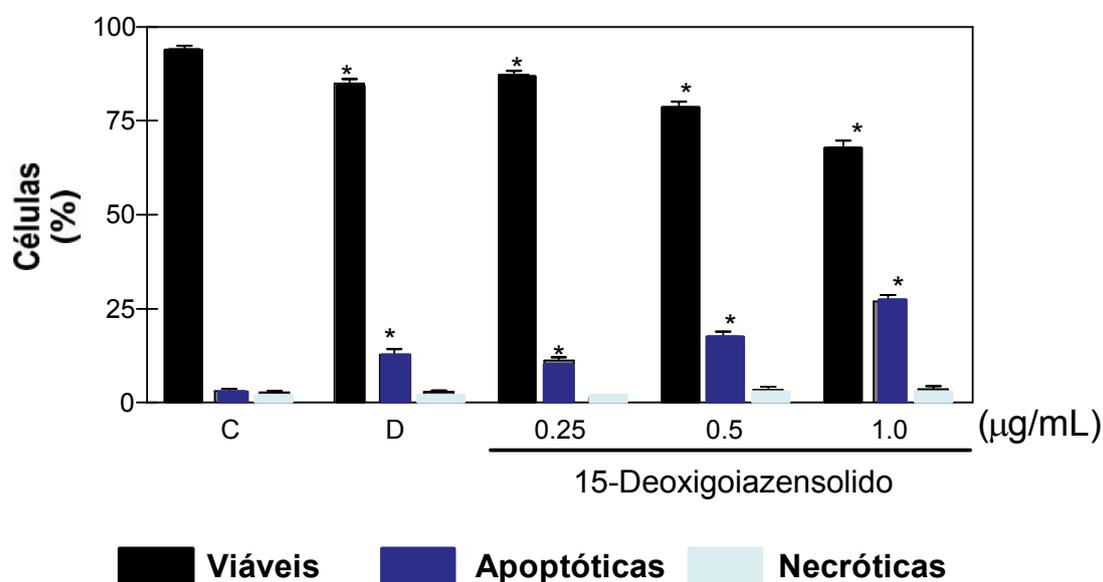
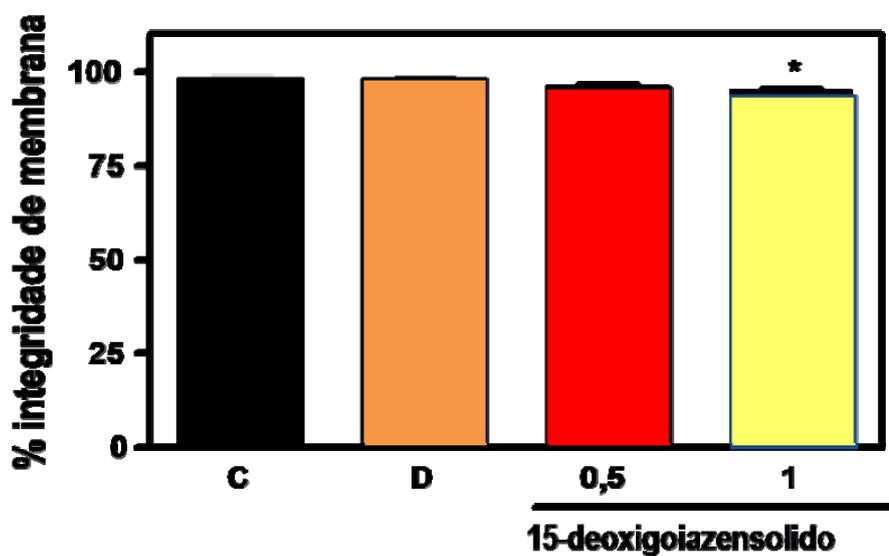


Figura 16: Efeito do 15-deoxigoiazensolido em células leucêmicas HL-60, analisado pela coloração por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina depois de 24 horas de incubação. O controle negativo foi realizado na presença do veículo usado para diluir a droga (C). Doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls test.

4.2.4. Determinação da Integridade de Membrana por Citometria de Fluxo

Neste ensaio, as células da linhagem HL-60 tratadas com a lactona sesquiterpênica e o controle são incubados com iodeto de propídeo, que emite fluorescência e é capaz de se ligar ao DNA, desde que a membrana plasmática da célula esteja danificada permitindo a entrada desse composto para o citoplasma. Como mostra a figura 17A, a integridade da membrana plasmática foi alterada pelo 15-deoxigoiazensólido na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de solução. Não houve alteração da integridade da membrana na dose de 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Não foi observada redução significativa do número de células nas concentrações testadas (figura 17B).

A



B

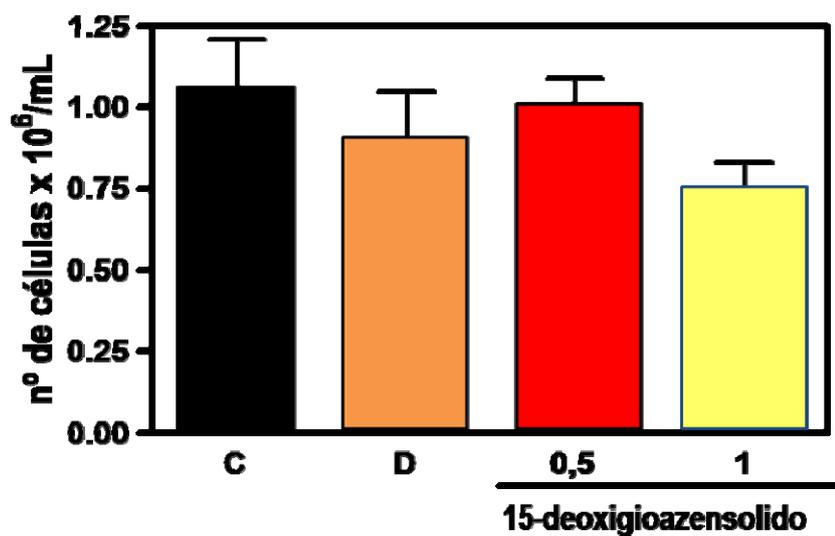


Figura 17: Viabilidade das células da linhagem HL-60 tratadas com 15-deoxioazensolido avaliada por citometria de fluxo. A – Porcentagem da integridade da membrana; B – Número absoluto de células viáveis. As células foram tratadas com iodeto de propídeo e a leitura foi feita numa faixa de comprimento de onda de 560-580nm. Os dados correspondem a media \pm E.P.M. de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ ANOVA seguida de Student Newman Keuls.

4.2.5. Determinação do Conteúdo de DNA Nuclear da Célula

Nesse ensaio, as células da linhagem HL-60 dos grupos controle e tratados com o 15-deoxigoiensólido foram incubadas com uma solução contendo triton X-100 e iodeto de propídeo. O Triton X-100 lisa a membrana celular e o iodeto de propídeo se liga no DNA. As células contendo núcleos íntegros emitem alta fluorescência, e as células com condensação da cromatina e DNA fragmentado emitem baixa fluorescência. Como pode ser observado na tabela 4, a fragmentação de DNA aumentou de 1,46 % no grupo controle para 9,79 % no grupo tratado na concentração de 1 µg/mL. Além disso, na fase G₀/G₁, observamos uma diminuição de 44,92 % no grupo controle para de 35,94 % em células tratadas na concentração de 1 µg/mL de 15-deoxigoiensólido. A figura 18 ilustra os resultados obtidos.

Tabela 4 – Análise do Ciclo Celular/conteúdo de DNA por citometria de fluxo. As células HL-60 foram tratadas com Doxorrubicina (controle positivo), e 15-Deoxigoiensólido em diferentes doses. Os dados representam a média de três experimentos.

| substância | concentração | Sub G ₀ /G ₁ | G ₀ /G ₁ | S | G ₂ /M |
|---------------|--------------|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Controle | - | 1,46 ± 0,33 | 44,92 ± 1,91 | 22,00 ± 3,28 | 24,42 ± 1,44 |
| Doxorrubicina | 0,3 µg/mL | 66,74 ± 3,51^a | 19,66 ± 5,42^a | 9,46 ± 6,58^a | 2,69 ± 1,03^a |
| Lactona | 0,5 µg/mL | 2,30 ± 0,82 | 46,22 ± 2,41 | 21,42 ± 4,25 | 20,61 ± 3,39 |
| Lactona | 1,0 µg/mL | 9,79 ± 5,58^a | 35,94 ± 5,43^a | 23,48 ± 4,43 | 26,68 ± 3,32 |

^a p < 0,01 comparado ao controle pelo teste ANOVA seguindo do Teste de Dunnet.

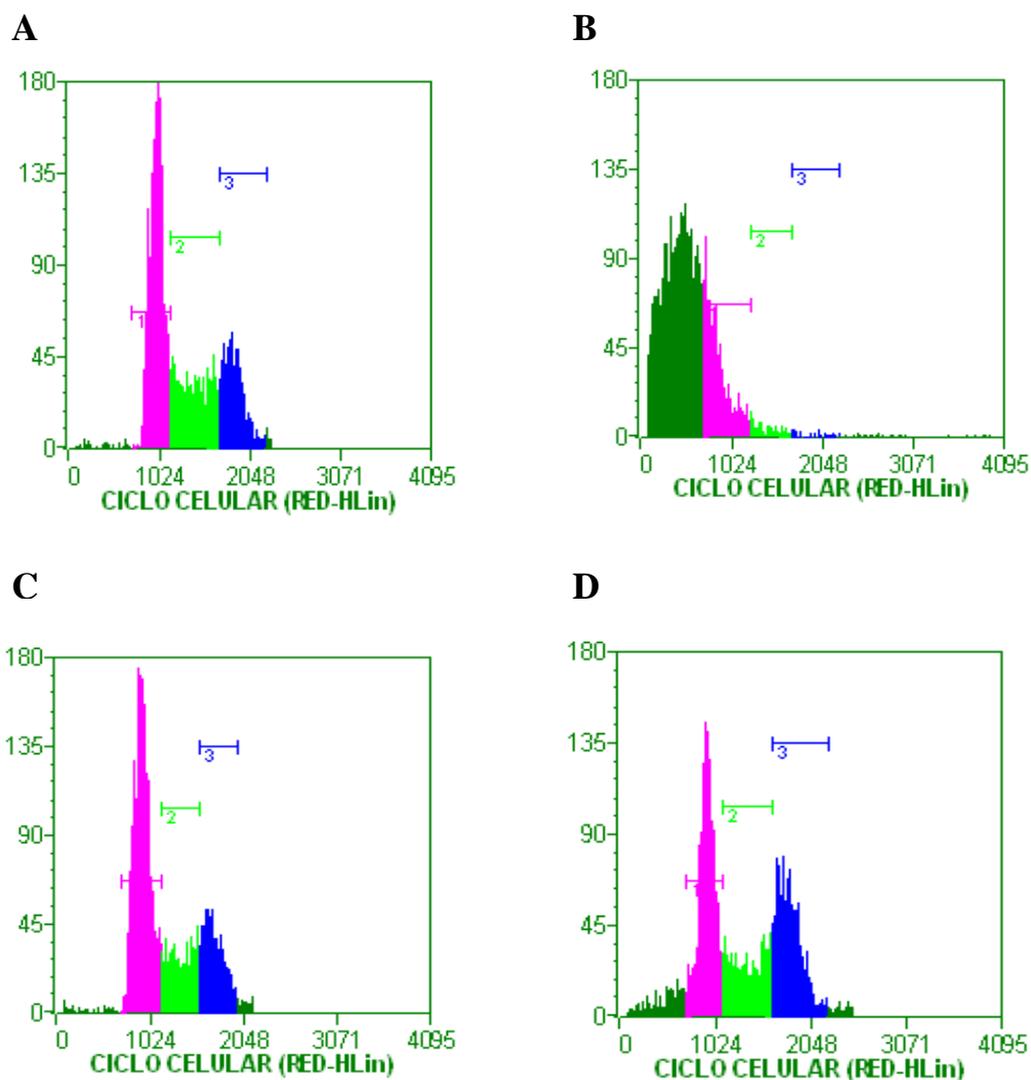


Figura 18: Histogramas do DNA obtidos por citometria de fluxo. As células HL-60 foram tratadas com DMSO (A), Doxorubicina 0,3 $\mu\text{g/mL}$ (B), 15-deoxigoiazensolido 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (C), 15-deoxigoiazensolido 1 $\mu\text{g/mL}$ (D). A fluorescência foi medida pelo canal FL2 (560-580nm) que captura a fluorescência laranja avermelhado do Iodeto de propídeo. Foram contados 5000 eventos/amostra. G₀/G₁. | S. | G₂/M. |

4.2.6. Despolarização da Mitocôndria

Nesse ensaio, as células foram incubadas com rodamina 123, um corante catiônico e permeável a membrana celular que é sensível a alterações no potencial transmembrânico da mitocôndria. O 15-deoxigoiazensolido na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostrou-se capaz de induzir despolarização mitocondrial, enquanto que a dose de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não apresentou a mesma atividade (Figuras 19 e 20).

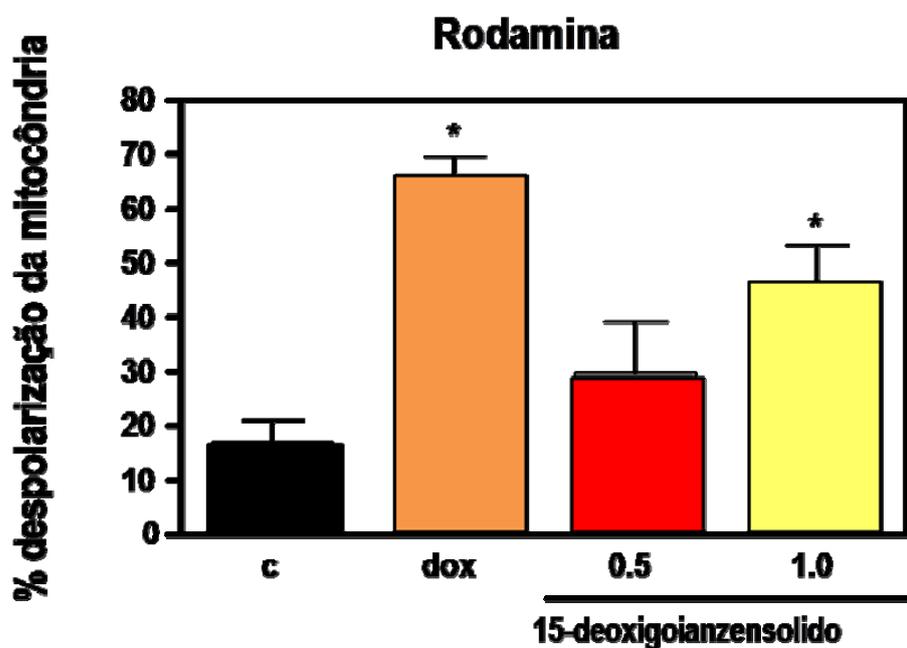


Figura 19: Avaliação da despolarização da mitocôndria por citometria de fluxo em células da linhagem HL-60 tratadas com 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 15-deoxigoiazensolido. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os resultados foram mostrados como a média e o erro obtidos de 2 experimentos. A Doxorubicina (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi usada como controle positivo. * $p < 0,05$ ANOVA seguida de Student Newman Keuls.

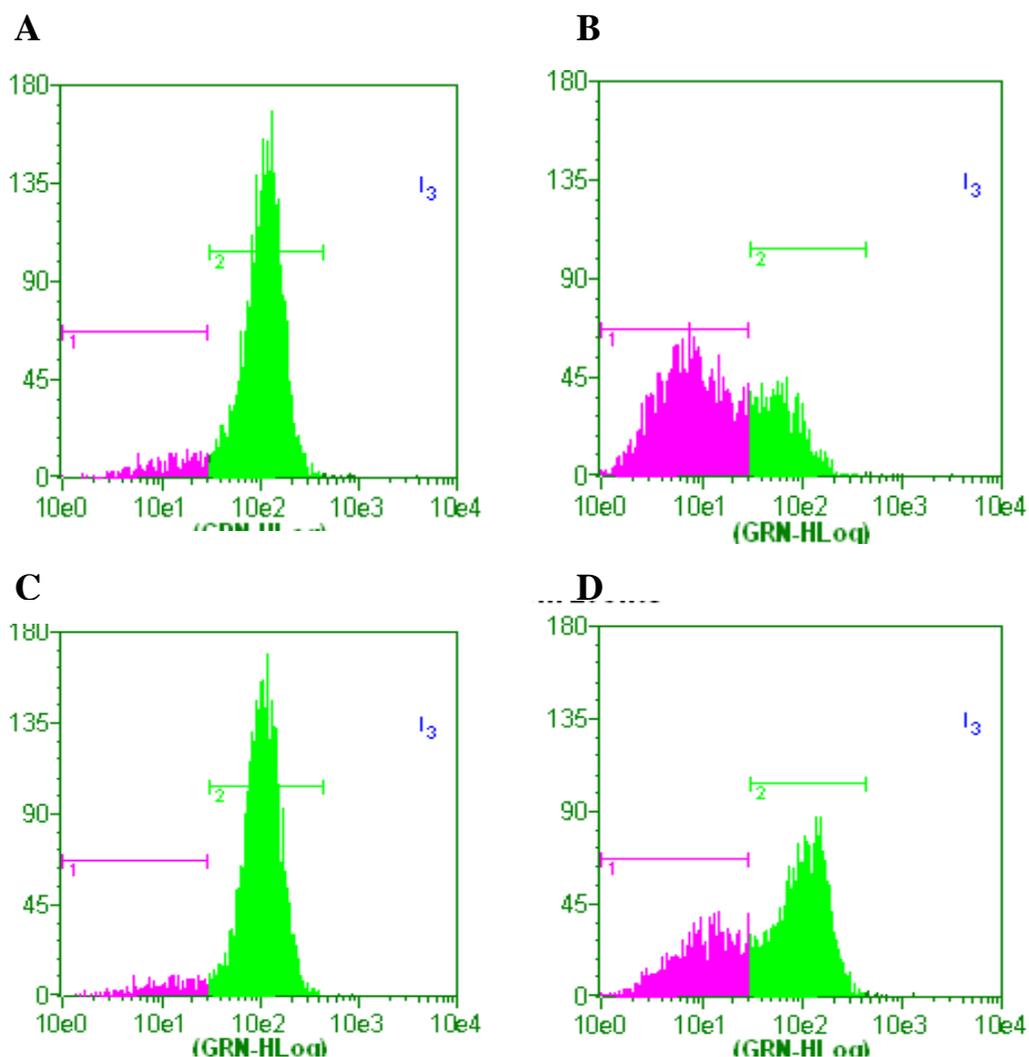


Figura 20: Histogramas da despolarização da mitocôndria obtidos por citometria de fluxo. As células HL-60 foram tratadas com DMSO (A), Doxorubicina 0,3 $\mu\text{g/mL}$ (B), 15-deoxigoazensolido 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (C), 15-deoxigoazensolido 1 $\mu\text{g/mL}$ (D). A fluorescência foi medida pelo canal FL2 (560-580 nm) que captura a fluorescência laranja avermelhado do iodeto de propídeo. Foram contados cinco mil eventos/amostra. Mitocôndrias despolarizadas. █ Mitocôndrias normais. █

4.3. Experimentos *in vivo*

4.3.1. Estudos com Sarcoma 180

4.3.1.1. Avaliação da Sobrevida e do Crescimento Tumoral

A figura 21 mostra a curva de sobrevida dos animais tratados com o 15-deoxigoiázensólido em diferentes doses. Apesar de observarmos uma tendência na diminuição da sobrevida dos grupos tratados com a maior dose (50 mg/m² ou 21,45 mg/Kg), não houve diferença estatística entre as médias de sobrevida em relação ao grupo controle. A figura 22 mostra que o 15-deoxigoiázensólido exerce um efeito dose-resposta de inibição do crescimento tumoral. Após 15 dias do início do tratamento, o grupo controle apresentou um volume tumoral de $10,41 \pm 1,26 \text{ cm}^3$, enquanto que os animais tratados com o 15-deoxigoiázensólido nas doses de 5, 10, 25 e 50 mg/m² (1,67, 3,34, 8,36 e 21,45 mg/Kg) mostraram uma inibição de $43.48 \pm 10.81\%$, $72.10 \pm 5.44\%$ ($p < 0,05$), $79.60 \pm 6.54\%$ ($p < 0,05$), $88.19 \pm 6.29\%$ ($p < 0,05$) no volume tumoral respectivamente.

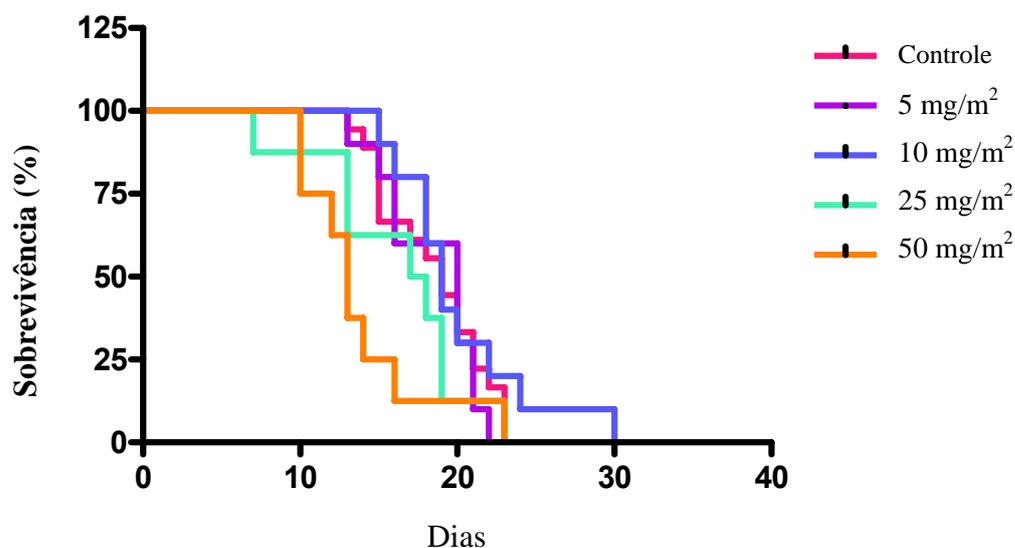


Figura 21: Curva de Sobrevivência de camundongos inoculados com sarcoma 180 submetidos ao tratamento de diferentes doses da lactona sesquiterpênica 15-deoxigoiázensólido. As doses foram administradas em dias alternados num total de 6 aplicações. A sobrevivência foi analisada pelo programa de Kaplan-Meier.

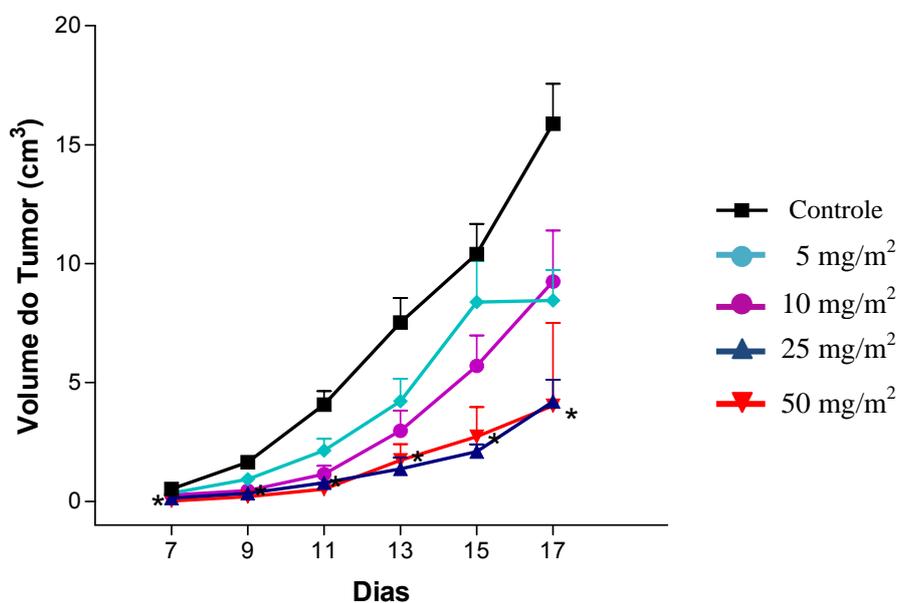


Figura 22: Curva do crescimento tumoral do sarcoma 180 em camundongos tratados com diferentes doses de Lactona Sesquiterpênica 15-deoxigoiázensólido (* $p < 0,05$).

4.3.1.2. Avaliação da Atividade Antitumoral

A figura 24 mostra o peso do tumor dos animais tratados com 5 e 10 mg/m² (1,67 e 3,34 mg/Kg) de lactona durante 7 dias consecutivos. O gráfico revela que os animais tratados com 10 mg/m² tiveram o peso do tumor 49,39 % menor que o controle negativo. O grupo controle (5-FU 50 mg/m²) positivo também obteve o peso do tumor menor que o peso do tumor do grupo controle (44,30 %). Não houve diferença estatística entre o peso dos órgãos (fígado, baço e rim) (figura 23).

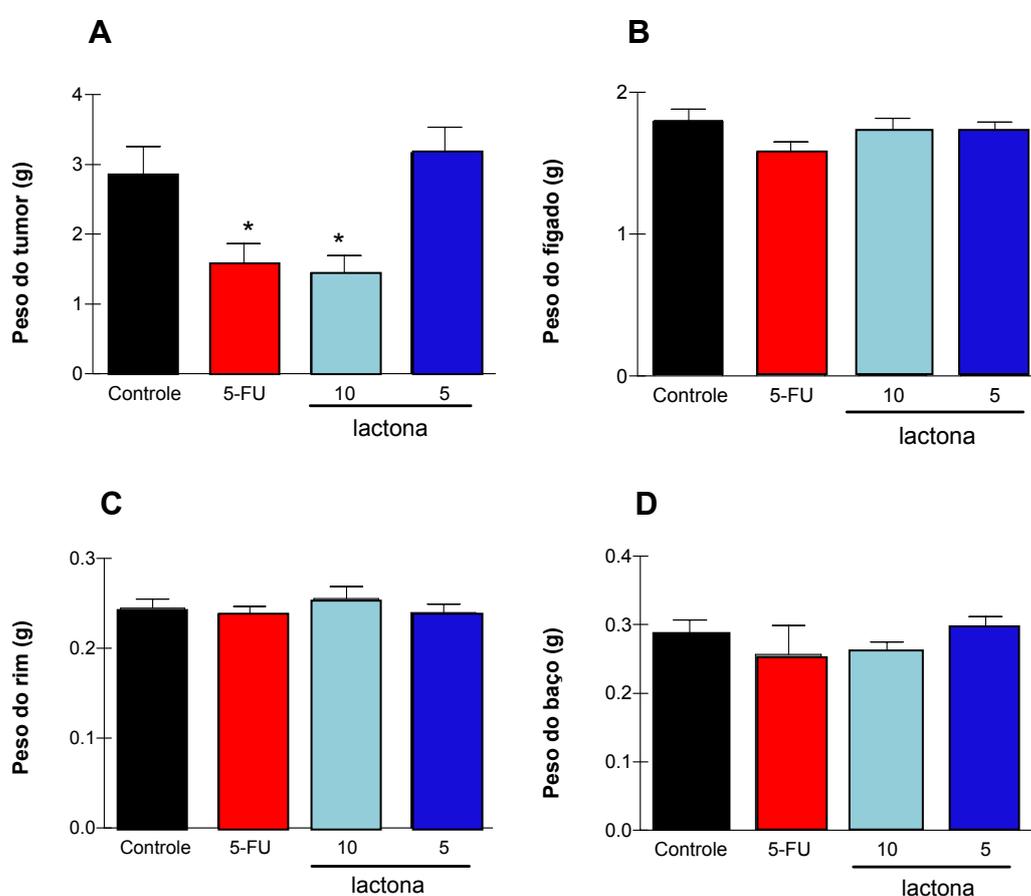


Figura 23: Peso tumor sarcoma 180 (A), Fígado (B), Rins (C) e Baço (D) de camundongos tratados durante 7 dias consecutivos com 5 mg/m² e 10 mg/m² da lactona sesquiterpênica 15-deoxigoiazensolido. Após 10 dias do início de tratamento os animais foram sacrificados e o tumor e órgãos retirados para pesagem. O 5-FU (50 mg/m²) foi utilizado como controle positivo. * p < 0,05, ANOVA seguida de Student Newman Keuls.

4.3.1.3. Avaliação da Toxicidade e das Alterações Histopatológicas

No grupo tratado com 5 mg/m² durante 7 dias consecutivos, o baço apresentou aspecto normal. No rim constatou-se estrutura glomerular normal e hemorragia glomerular, além de trechos hemorrágicos e discreta tumefação turva do epitélio dos túbulos proximais e distais. O fígado apresentou tumefação turva dos hepatócitos em graus variados, focos inflamatórios, hiperplasia das células de kupffer e esteatose em microgotas (Figura 24B).

No grupo tratado com 10 mg/m² durante 7 dias consecutivos o baço apresentou aspecto normal. No rim observou-se hemorragia glomerular e tubular, tumefação turva do epitélio tubular e raros cilindrohialinos, além de necrose tubular aguda focal (Figura 24D). No fígado, verificou-se congestão portal e da veia centrolobular, tumefação turva dos hepatócitos em graus variados, focos inflamatórios e hiperplasia das células de kupffer; além de esteatose de microgotas e necrose focal dos hepatócitos (Figura 24C).

O fígado é vulnerável a uma grande variedade de insultos metabólicos, tóxicos, microbianos, circulatórios e neoplásicos. Ele apresenta um repertório limitado de respostas a esses eventos nocivos. Em nosso experimento, nos dois grupos tratados observou-se a resposta hepática de degeneração e acúmulo intracelular, caracterizada, pela tumefação turva dos hepatócitos e pela esteatose de microgotas (acúmulo intracelular de pequenas gotículas de gordura). Por fim, constatou-se a morte celular, evidenciada pela necrose focal dos hepatócitos no grupo tratado com 10 mg/m². Entretanto, todas essas alterações podem ser consideradas reversíveis.

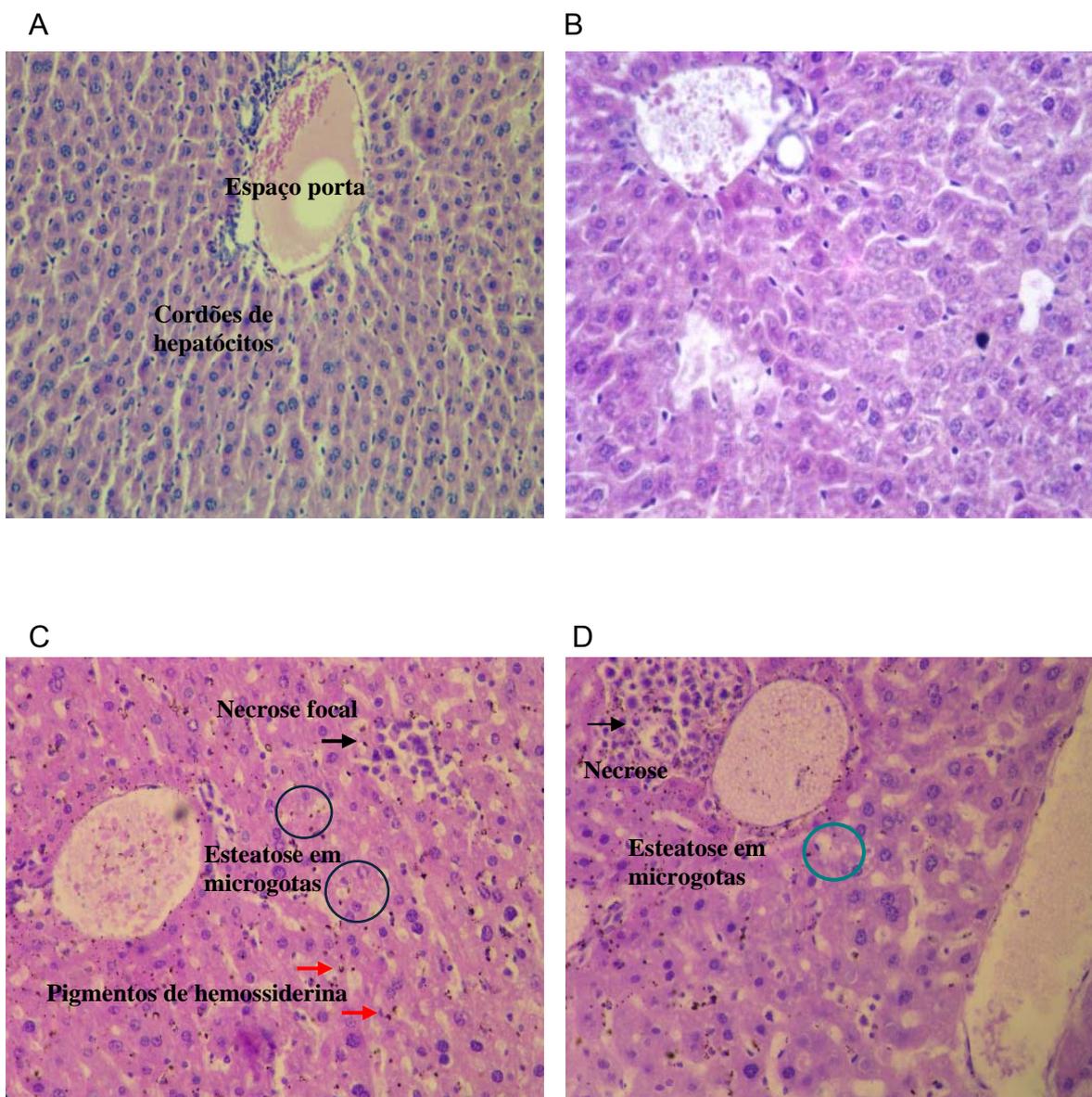


Figura 24: Fotomicrografia do fígado dos camundongos após 7 dias consecutivos de tratamento com 15-deoxigoiagensólido. O grupo controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 2 %). Grupo controle positivo tratado com 5-FU 50 mg/m² (B), grupo tratado com 15-deoxigoiagensólido 10 mg/m² (C) e grupo tratado com 15-deoxigoiagensólido 5 mg/m² (D).

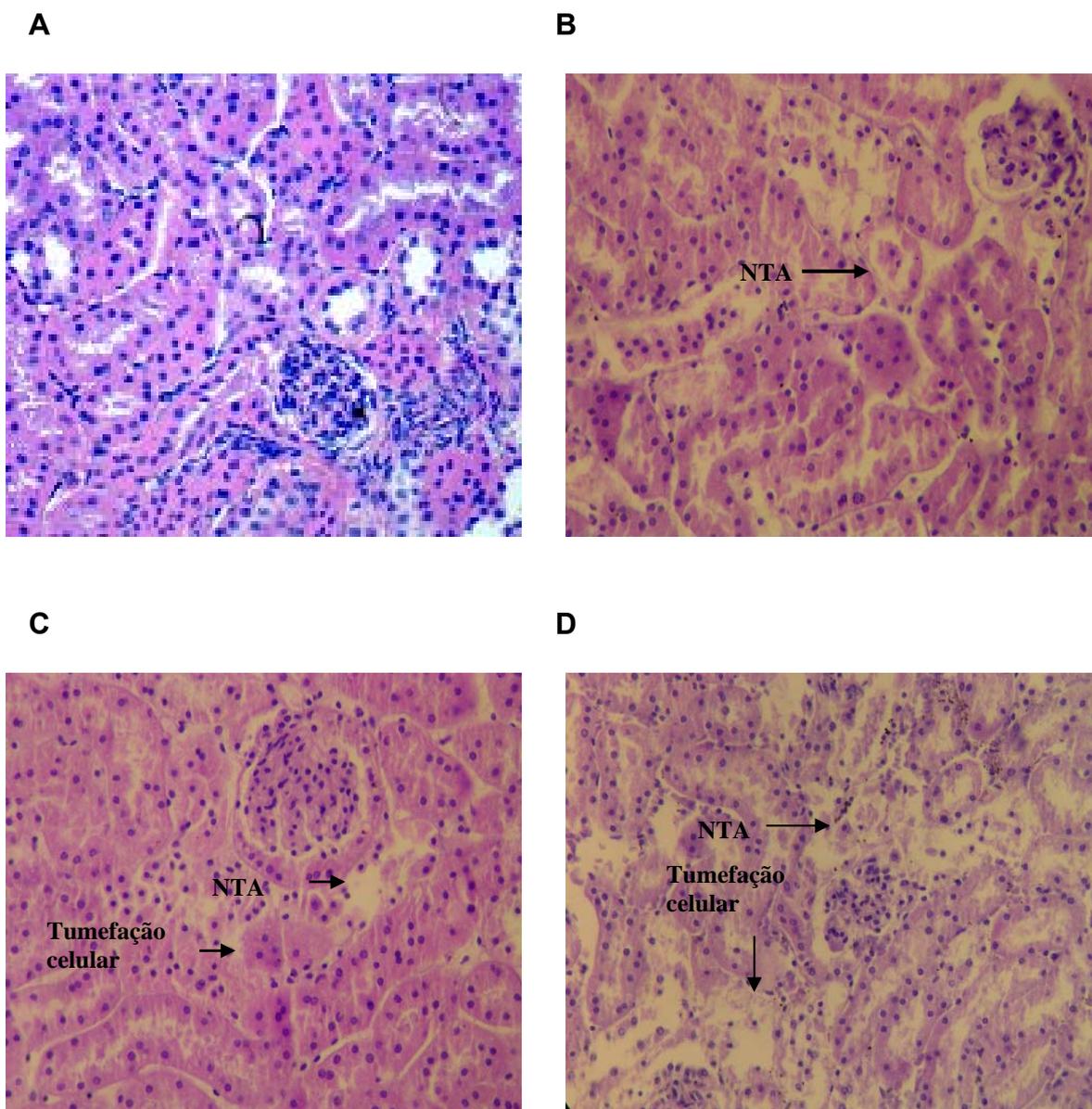


Figura 25: Fotomicrografia do rim dos camundongos após 7 dias consecutivos de tratamento com 15-deoxigoiagensolido. O grupo controle negativo (A) foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 2 %). Grupo controle positivo tratado com 5-FU 50 mg/m² (B), grupo tratado com 15-deoxigoiagensolido 10 mg/m² (C) e grupo tratado com 15-deoxigoiagensolido 5 mg/m² (D).

4.3.2. Estudos com Carcinossarcoma de Walker 256

4.3.2.2. Avaliação da Atividade Antitumoral

A figura 25 mostra o peso do tumor dos animais tratados com 5 e 10 mg/Kg de lactona sesquiterpênica durante 7 dias consecutivos. O gráfico revela que os animais tratados com 10 mg/Kg de lactona sesquiterpênica tiveram o peso do tumor 38,80% menor que o controle negativo. Já os animais tratados com 5 mg/Kg da lactona sesquiterpênica mostrou inibição de 34,05 % do peso tumoral. Ainda com relação ao peso do tumor, não houve diferença entre os animais tratados com as doses de 5 e 10mg/Kg de 15-deoxigoiázensólido e o grupo controle positivo (5-FU 10 mg/Kg). Não houve diferença estatística entre o peso dos órgãos (fígado, baço e rim) (figura 25).

A tabela 5 resume os achados da atividade antitumoral do 15-deoxigoiázensólido nos diferentes esquemas de tratamento utilizando os dois modelos murinos, sarcoma 180 e carcinossarcoma de Walker 256.

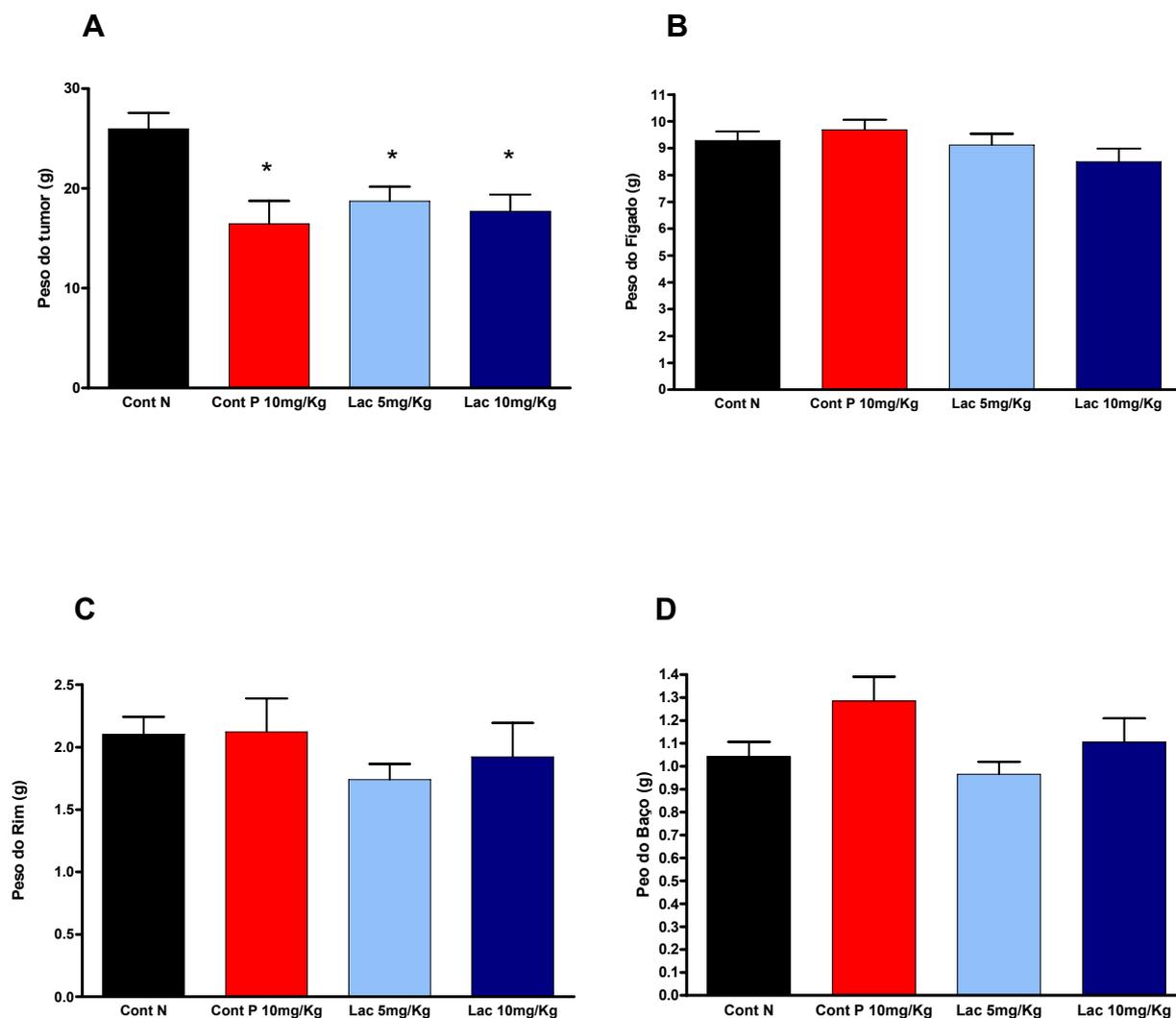


Figura 26: Peso do tumor de Walker 256 (A), Fígado (B), Rins (C) e Baço (D) em ratos Wistar tratados durante 7 dias consecutivos com 5 mg/Kg e 10 mg/Kg de lactona sesquiterpênica 15-deoxigiazensolido. Após 10 dias do início de tratamento os animais foram sacrificados e o tumor retirado para pesagem. O 5-FU (10 mg/Kg) foi utilizado como controle positivo. * $p < 0,05$, ANOVA seguida de Student Newman Keuls.

Tabela 5 – Resumos da atividade antitumoral *in vivo* do 15-deoxigoiazensolido e do 5-Fluorouracil (controle positivo) em modelos murinos.

| Droga | Dose | Dias tratamento | Modelo | Inibição do crescimento tumoral (%) |
|-----------------------|----------------------|-----------------|---------------------------|-------------------------------------|
| 15-Deoxigoiazensolido | 5 mg/m ² | 1,3,5,7,9 | Sarcoma 180 | 43.48 ± 10.81 |
| 15-Deoxigoiazensolido | 10 mg/m ² | 1,3,5,7,9 | Sarcoma 180 | 72.10 ± 5.44 |
| 15-Deoxigoiazensolido | 25 mg/m ² | 1,3,5,7,9 | Sarcoma 180 | 79.60 ± 6.54 |
| 15-Deoxigoiazensolido | 50 mg/m ² | 1,3,5,7,9 | Sarcoma 180 | 88.19 ± 6.29 |
| 5-Fluorouracil | 50 mg/m ² | 1,2,3,4,5,6,7 | Sarcoma 180 | 44,30 ± 9.74 |
| 15-Deoxigoiazensolido | 5 mg/m ² | 1,2,3,4,5,6,7 | Sarcoma 180 | -11.34 ± 12.65 |
| 15-Deoxigoiazensolido | 10 mg/m ² | 1,2,3,4,5,6,7 | Sarcoma 180 | 49.39 ± 8.8 |
| 5-Fluorouracil | 10 mg/kg | 1,2,3,4,5,6,7 | Carcinossarcoma de Walker | 44.66 ± 10.8 |
| 15-Deoxigoiazensolido | 5 mg/kg | 1,2,3,4,5,6,7 | Carcinossarcoma de Walker | 34.05 ± 6.90 |
| 15-Deoxigoiazensolido | 10 mg/kg | 1,2,3,4,5,6,7 | Carcinossarcoma de Walker | 38.80 ± 7.94 |

4.3.3. Avaliação da síntese de anticorpos IgE anti-lactona

Os animais imunizados com o 15-deoxigoiazensolido não sintetizaram IgE específica contra a lactona 28 dias após a primeira imunização quando comparado ao grupo controle (Figura 26).

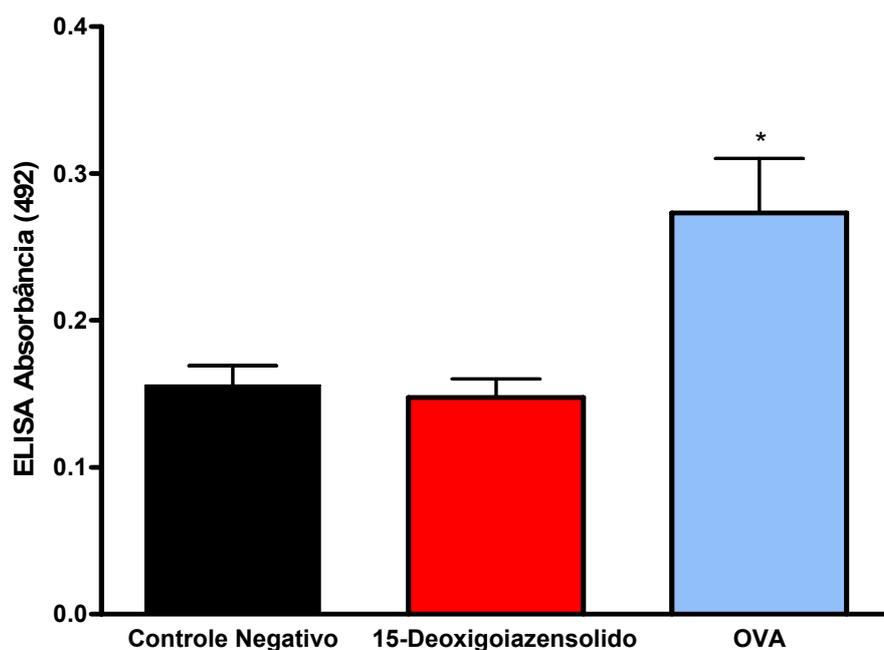


Figura 27: Síntese de anticorpos IgE anti-Lactona em camundongos imunizados com 100 µg de 15-deoxigoiazensolido por via subcutânea. Os animais receberam reforço da mesma dose 21 dias após a primeira imunização e o sangue foi retirado no 28º dia para análise da síntese de IgE por ELISA. Ovalbumina foi utilizada como controle positivo. * $p < 0,01$.

5. DISCUSSÃO

Vários fatores estão envolvidos na escolha de um medicamento ideal para o tratamento do câncer. Entre eles, o mais importante provavelmente é a qualidade de vida do paciente durante a quimioterapia. Efeitos colaterais provenientes do uso da droga; como diarreia, alopecia, anemias, úlceras orais ou intestinais, trombocitopenia, imunossupressão com conseqüente infecções oportunistas, podem ser um fator limitante para a continuidade do tratamento e por isso o paciente pode optar pelo seu término. O aumento da sobrevida do paciente portador de um tumor aliado com o aumento de sua qualidade de vida torna-se, então, um grande desafio para os oncologistas.

Na tentativa de encontrar a droga ideal, inúmeras moléculas com potencial quimioterápico foram descobertas a partir de plantas terrestres, animais marinhos e até mesmo de microorganismos (NEWMAN & CRAGG, 2007; DEMBITSKY, 2008; BANERJEE *et al.*, 2008). Com o aprimoramento da metodologia de cultura de células foi possível o desenvolvimento de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos que possibilitaram o desenvolvimento da metodologia para triagem *in vitro*. Com esse objetivo, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos desenvolveu um painel de células cancerígenas que, atualmente, conta com 60 linhagens oriundas de oito tipos de tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário, cérebro) e do sistema hematopoiético (leucemia). Dessa maneira, essa metodologia permite a avaliação em diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade. Outra vantagem dessa triagem é a rapidez e eficiência do método, que em apenas quatro dias pode avaliar um número elevado de drogas (SKEHAN, 1990; RUBINSTEIN, 1990; MONKS, 1991). Dessa forma, os métodos de triagem *in vitro* utilizando-se da cultura de células tumorais humanas são os mais utilizados para a descoberta e desenvolvimento de novas drogas nos tempos atuais (ITHARAT, 2004).

O presente trabalho avaliou inicialmente a atividade citotóxica da lactona sesquiterpênica (LST) 15-deoxigoiazensolido em linhagens leucêmicas, carcinomas de mama, cólon, próstata e melanoma pelo método do MTT. Em

todas as linhagens, a lactona apresentou-se ativa com CI_{50} abaixo de 4 $\mu\text{g/mL}$, o que classifica essa droga como um promissor agente anticâncer (FÁVARO *et al.*, 1990). Na linhagem MDA-MB-435 (linhagem humana para melanoma), a lactona obteve uma CI_{50} de 0,18 $\mu\text{g/mL}$, 2,6 vezes mais potente que a da doxorrubicina. A doxorrubicina é um antibiótico com potente atividade anticâncer utilizada com certo grau de sucesso em leucemias linfoblásticas e mielocíticas, além de cânceres de mama. Seu mecanismo de ação consiste em se intercalar entre as bases da dupla fita de DNA causando clivagens, além de inibir a atividade da topoisomerase II e estimular a geração de radicais livres, o que compromete o bom funcionamento da membrana celular (FILYAK *et al.*, 2008). Dessa forma, a doxorrubicina torna-se um excelente controle positivo para testes de novas drogas anticâncer.

A linhagem HL-60 é um dos modelos de neoplasia *in vitro* mais amplamente estudados (GRZANKA *et al.*, 2003). Em 1977, Collins e colaboradores isolaram de células a partir do sangue periférico de um paciente com leucemia promielocítica aguda e iniciaram a manutenção dessa cultura. A linhagem é caracterizada pela presença de neutrófilos promielocíticos, proeminente assincronia na relação núcleo/citoplasma, exibem atividade fagocitária e quimiotática, além de serem capazes de formar colônias em meio de cultura semi-sólido. Uma vez observada uma potente atividade citotóxica da LST na linhagem HL-60, utilizamos essa cultura para avaliar seu mecanismo de ação utilizando os métodos do azul de tripan, síntese de DNA por incorporação do BrdU, análise de viabilidade por coloração de laranja de acridina/brometo de etídio, análise de viabilidade celular e integridade de membrana por citometria de fluxo, fragmentação do DNA e alteração no potencial transmembrânico da mitocôndria.

O método do azul de tripan em células HL-60 é um ensaio de viabilidade celular que quantifica as células capazes de excluir o corante ácido azul de tripan para fora da célula (célula viável). Se a célula absorve o corante, temos um forte indicativo de dano na membrana plasmática que culmina na morte celular (célula não-viável) (CHAROENPORNSOOK *et al.* 1998; HYNES *et al.*, 2003; MINERVINI *et al.* 2004).

O 15-deoxigoiazensolido causou uma significativa redução de 24,0; 32,3 e 53,5 % ($p < 0,05$) no número de células viáveis nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 14), demonstrando uma ação antiproliferativa dose-dependente da LST. Essa atividade foi confirmada no teste de incorporação do BrdU. A concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de 15-deoxigoiazensolido foi a única que inibiu significativamente a síntese de DNA (33,4 % de inibição).

Uma vez que a ação antiproliferativa do 15-deoxigoiazensolido está consolidada, procuramos esclarecer o seu mecanismo de ação em células tumorais. Vários trabalhos mostram que a atividade anticâncer das LST podem ocorrer por 3 maneiras: indução da apoptose por estresse oxidativo, modulação dos mecanismos de controle do ciclo celular e/ou indução da diferenciação celular (TSIFTSOGLU *et al.*, 2003). O mecanismo antitumoral compartilhado por todas as LST é a indução da apoptose em células neoplásicas (PATEL *et al.*, 2000; DIRSCH *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2001; CHO *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2005).

A morte celular programada foi observada pela primeira vez há 50 anos e, inicialmente, foi chamada de necrose de redução. Este tipo de morte celular é complementar à mitose na regulação da proliferação celular. Em virtude do seu importante papel na homeostasia do organismo, em 1971 este fenômeno recebeu o nome de "Apoptosis" (KERR *et al.*, 1972). Apoptose, ou morte celular programada, refere-se ao processo de morte em células eucarióticas com características morfológicas e bioquímicas distintas da necrose. Suas principais características incluem a redução no tamanho da célula, condensação da cromatina, geralmente com fragmentação do núcleo e do DNA, manutenção da integridade da membrana plasmática e fagocitose do material celular, podendo acontecer em processos normais e patológicos (KRYSKO *et al.*, 2008). A apoptose ocorre no sistema imune, sistema nervoso para garantir a homeostase orgânica e anormalidades nos seus níveis desencadeiam doenças: a sua inibição gera hiperplasia ou auto-imunidade, enquanto que a sua exacerbação ocasiona doenças degenerativas (SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1994; GIOVANNETTI *et al.*, 2008).

A transformação tecidual reflete um desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular. Sendo assim, a perda da apoptose, por si só, é relevante na carcinogênese e a sua perfeita compreensão, bem como a de seus mecanismos reguladores, permitiria o estabelecimento de uma terapêutica tumoral mais eficiente. (SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1994)

A desregulação no processo de apoptose é um dos fatores responsáveis para tumorigênese (HENGARTNER, 2000) e a ativação desse processo em células neoplásicas é um dos principais mecanismos para a atividade antitumoral de uma droga. O 15-deoxigoiazensolido induz apoptose nas células tratadas como evidenciado inicialmente pelo método do brometo de etídio e acridina laranja (BE/AL). A análise por citometria de fluxo corrobora esses resultados, uma vez que as células tratadas conservavam sua integridade de membrana, mas já apresentavam DNA fragmentado, características de células em processo de apoptose.

A morte celular por apoptose envolve dois principais mecanismos: a via do receptor de morte celular e a via da mitocôndria (ZHANG *et al.*, 2005). A via do receptor de morte celular ocorre após a ligação do ligante em seu receptor na membrana plasmática. A via consiste inicialmente na ativação das caspase 8 que leva à ativação em cascata de várias caspases efetoras, entre elas a caspase 3 (SARTORIUS *et al.*, 2001). Vários ligantes estão envolvidos nessa sinalização. Entre eles, os mais importantes são o Ligante do Fas, o TNF e o Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF (TRAIL). Por outro lado, a via da mitocôndria é regulada por sinais intracelulares que culminam na morte celular provocado pelo dano ao DNA. Muitas LST, como partenolida, custonolida e a helenalina induzem apoptose em células tumorais por estimular a perda do potencial de membrana mitocondrial. Essa alteração leva à liberação de proteínas com atividade apoptótica, como o citocromo c e Smac, do interior de mitocôndrias que juntamente com a caspase 9 e a Apaf-1 ativam a caspase 3 e levam a célula tumoral à morte (HENGARTNER, 2000).

Apesar dos detalhes do mecanismo molecular envolvidos na ativação da apoptose pelas LST ainda não estarem completamente elucidados, é sabido que o anel α -metileno- γ -lactona de sua estrutura exerce um papel fundamental

nesse processo. Em 1970, Kupchan e colaboradores fizeram a seguinte citação sobre a relação estrutura-atividade das LST: "...a reação do anel α -metileno- γ -lactona, e de outros sistemas conjugados com grupos sulfidrilas, provavelmente exercem uma influência significativa nos mecanismos onde esses compostos induzem seus efeitos biológicos".

Os tióis constituem uma classe de compostos orgânicos caracterizados pela presença do grupo sulfidril (-SH). No microambiente intracelular, os tióis biológicos (biotióis) podem ser classificados em tióis livres de baixo peso molecular, como a glutathiona, e tióis de alto peso molecular. As funções dos biotióis incluem: manutenção da estrutura tridimensional de proteínas e enzimas chave para o bom funcionamento do metabolismo celular, controle do status redox intracelular e atividade antioxidante. O anel α -metileno- γ -lactona liga-se aos tióis orgânicos celulares, resultando em alquilação dos resíduos sulfidrilas (-SH). Essa reação, conhecida como Adição de Michael (ZHANG *et al.*, 2005), leva a uma mudança na estrutura tridimensional e na capacidade dessas moléculas alvo de exercerem suas funções. A glutathiona é um dos tióis orgânicos mais estudados e é o principal alvo do anel α -metileno- γ -lactona. Muitas LST, como a vernolepina, a helenalina, a elefantopina, a costulida, a eriofertopina, a repina e a partenolida exercem seu efeito apoptótico a partir da alquilação e depleção de glutathiona e outros grupos tióis orgânicos (WEN *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2004; RUNGELER *et al.*, 1999; CHOI *et al.*, 2002). Vasconcellos e colaboradores (2007) demonstraram que o próprio 15-deoxigoiazensólido também induz depleção de glutathiona intracelular em cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. A glutathiona possui atividade antioxidante nas células para evitar potenciais danos oxidativos provindos de espécies reativas do oxigênio naturalmente produzidas no metabolismo celular. Uma vez que a glutathiona é inibida pelo anel α -metileno- γ -lactona das lactonas sesquiterpênicas, ocorre uma ruptura do status redox intracelular e conseqüentemente observamos um estresse oxidativo, levando ao aumento de espécies reativas do oxigênio e promoção de um dano oxidativo no DNA. Além disso, a excessiva quantidade de espécies reativas do oxigênio e a ruptura do status redox estimulam o início da apoptose pela via da mitocôndria. Ocorre, então, liberação de proteínas pró-apoptóticas mitocondriais, como citocromo c

e Smac, e subsequente ativação de caspases, finalmente levando a célula à morte. A ativação dessa via foi explorada em nosso trabalho. Como podemos observar na figura 20 e 21, a rodamina desloca-se para o interior das mitocôndrias das células da linhagem HL-60 na presença do 15-deoxigoiazensólido na concentração de 1 µg/mL após alterações no potencial transmembrânico, gerando eventos que emitem menor fluorescência quando analisados pela citometria de fluxo. A despolarização mitocondrial é um indicativo de apoptose induzida pelo 15-deoxigoiazensólido, o que corrobora com os resultados anteriormente analisados.

Devido à alta reatividade que os grupos sulfidrilas possuem com ao anel α -metileno- γ -lactona das LST, muitas enzimas tornam-se alvos moleculares direto dessas moléculas. Duszenko e colaboradores (1982) demonstraram que a LST pentalonolactona inibe a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, enzima que participa do metabolismo aeróbico dos carboidratos. Beekman e colaboradores (1997) demonstraram que a helenalina e a tenulina inibem a atividade da DNA polimerase, supressão da síntese protéica e bloqueio da cadeia transpotadora de elétrons. Em outro trabalho, Hall e colaboradores (1988) mostram que as LST diminuem o “pool” intracelular disponível de deoxirribonucleosídeo trifosfato (dNTPS) necessário para a síntese de DNA. Outros estudos utilizando LST mostram a atividade inibitória dessas drogas em várias enzimas que participam do metabolismo do ácido nucléico, como a inosina monofosfato desidrogenase, purina sintetase, diidrofolato redutase e a ribonucleosídeo redutase (HALL *et al.*, 1980; HALL *et al.*, 1983; PAGE *et al.*, 1987; GRIPPO *et al.*, 1992). Como relatado anteriormente, nossos resultados demonstram que o 15-deoxigoiazensólido inibe a síntese de DNA quando analisado pelo teste do BrdU na concentração de 1 µg/mL. Portanto, as enzimas que participam do processo de síntese de DNA nas células da linhagem HL-60 podem também ser alvo do 15-deoxigoiazensólido. Essas ações demonstram que as LST possuem vários alvos para impedir a proliferação celular e conseqüentemente tornam-se um instrumento de grande valia na terapêutica anticâncer.

Já é bem compreendido que o desenvolvimento tumoral está intimamente associado com a desregularização dos mecanismos de controle do ciclo celular através da hiperatividade de quinases dependentes de ciclinas (CDK) e/ou inibição dos inibidores de CDK, resultando na ininterrupção e proliferação celular descontrolada. Portanto, drogas que possam regular o ciclo celular são de grande importância e extremamente promissoras para a terapia anticâncer. Wen e colaboradores (2002) demonstraram o potencial da partenolida na paralisação do ciclo celular no ponto de checagem G₂/M. Outra LST, a cinaropicrina, mostrou atividade antiproliferativa na fase G₁/S (CHO *et al.*, 2004). O 15-deoxigoiazensólido induziu diminuição das células em G₀/G₁ acompanhada de um aumento do número de células com DNA fragmentado na dose de 1 µg/mL quando avaliado por citometria de fluxo. Essa alteração, concomitante com a pequena perda da integridade da membrana celular, indica que as células nessas fases do ciclo (G₀/G₁) seriam mais sensíveis aos efeitos do 15-deoxigoiazensólido, levando-as a um processo de apoptose. As doses de 0,25 e 0,5 µg/mL não foram capazes de alterar a quantidade de DNA fragmentado, mostrando mais uma vez sua ação dose dependente.

Outro importante mecanismo para as ações das LST é a inibição do fator de transcrição NF-κB (BORK *et al.*, 1997; LYSS *et al.*, 1997; HEHNER *et al.*, 1999; KOO *et al.*, 2001; KARIN & LIN, 2002). Sua ativação depende de vários estímulos como o TNF, UV, interleucinas, endotoxinas, entre outras. A ativação do NF-κB está relacionada com a regulação da resposta inflamatória, diferenciação e crescimento celular e atividade anti-apoptótica (KARIN & LIN, 2002).

A via de sinalização do NF-κB é constitutivamente ativada nas células tumorais e induz uma superexpressão de várias proteínas antiapoptóticas, como os Inibidores da Apoptose (IAPs), Bcl-2 e proteínas inibitórias FLICE (FLIPs). Sua atividade em células cancerosas regula a transcrição de genes importantes para a invasão tumoral, metástase e resistência a quimioterápicos (KUCHARCZAK *et al.*, 2003). A Partenolida, a principal LST da *Tanacetum parthenium*, foi extensivamente estudada e é conhecida por induzir supressão da atividade do NF-κB por alquilação dos resíduos de cisteína presente em sua

estrutura (GARCIA-PIÑERES *et al.*, 2001; GARCIA-PIÑERES *et al.*, 2004). Tal mecanismo explica porque a partenolida é capaz induzir apoptose em células de câncer de mama (PATEL *et al.*, 2000), onde é encontrada uma elevada quantidade de NF- κ B ativado. Além disso, o pré-tratamento de células tumorais com partenolida inibe a via anti-apoptótica induzida pelo NF- κ B após ligação do TNF em seu receptor TNFR1 (SCHUTZE *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 2004). Esses resultados estimularam pesquisadores a investigar se as LST também possuem atividade antitumoral *in vivo*.

Estudos pré-clínicos utilizando-se de modelos animais para a análise da possível utilidade clínica de uma droga são de extrema importância, uma vez que a ação dos fármacos no organismo depende de diferentes fatores como sua lipossolubilidade, farmacocinética, metabolização, entre outros (PESSOA, 2000). Sendo assim, testes *in vivo* foram realizados com as LST na tentativa de utilizar seu potencial terapêutico em seres humanos. Extratos de muitas espécies do gênero *Artemisia* são utilizados por populações, principalmente do continente asiático, para o tratamento da malária, hepatite, câncer, processos inflamatórios e infecções bacterianas (ROBLES *et al.*, 1995; TAN *et al.*, 1998). Marco e Barbera (1990) estudaram o efeito antitumoral da Artemionolida, uma LST amplamente encontrada em plantas do gênero *Artemisia* da família *Compositae*, em várias linhagens murinas. Estudos posteriores indicaram a presença de quatro componentes bioativos da *Artemisia argyi*: Arteminolidas A, B, C e D. Essas LST são conhecidas por terem atividade inibitória da enzima farnesil transferase (FPTase), considerada uma importante proteína oncogênica sinalizadora Ras-dependente (LEE *et al.*, 2002). Dentre as quatro Arteminolidas, a do tipo C foi considerada a mais potente em inibir o crescimento tumoral de células de linhagem humana de pulmão e cólon utilizando-se um modelo xenográfico em camundongos “nude” (LEE *et al.*, 2003). Mais recentemente, Oka e colaboradores (2007) demonstraram que a partenolida inibe o crescimento de um carcinoma renal em um modelo murino por inibição do NF- κ B. O acúmulo de informações sobre sua atividade anticâncer e seu mecanismo de ação estimularam o uso da partenolida em estudo clínico de fase I em seres humanos (CURRY III *et al.*, 2004). Além do estudo da atividade antitumoral, a análise da farmacocinética das LST também

tem sido investigada. Em estudos preliminares, Curry III e colaboradores (2004) constataram que a partenolida, quando administrada em ratos por via oral nas doses de 4 mg/Kg e 40 mg/Kg, é detectada no plasma nas concentrações de 29,81 ng/mL e 41,96 ng/mL, respectivamente. O metabolismo de primeira passagem parece afetar em menor grau o 15-deoxigoiazensolido, uma vez que sua administração em ratos na dose de 30 mg/Kg pela via oral gerou uma detecção de 395,98 ng/mL no plasma (JABOR *et al.*, 2007).

Neste trabalho, avaliamos a capacidade do 15-deoxigoiazensolido de inibir o crescimento tumoral do sarcoma 180 em camundongos Swiss e do tumor de Walker 256 em ratos Wistar. O 5-fluorouracil (5-FU), um agente anticâncer de amplo espectro vastamente utilizado na clínica para o tratamento de tumores sólidos, foi usado como controle positivo. A figura 23a mostra que o tumor Sarcoma 180 foi inibido 49,39 % em relação ao grupo controle negativo na dose de 10 mg/m². Não houve inibição do tumor Sarcoma 180 na dose de 5 mg/m². O tumor de Walker 256 foi inibido 38,80 % na dose de 10 mg/Kg e 34,05 % na dose de 5 mg/Kg. Assim como o 15-deoxigoiazensolido, a Arctigenina, a Arctinina, a Arteminolida e a Eupatoriopicrina também são inibidoras tumorais *in vivo* e acredita-se que essa atividade venha a partir da inibição do NF-κB pelo anel α-metileno-γ-lactona, estrutura compartilhada por todas as LST (WOERDENBAG, 1986; TAKASAKI *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2003). Portanto, é possível que o 15-deoxigoiazensolido também exerça sua ação sobre o tumor Sarcoma 180 *in vivo* inibindo o NF-κB.

Investigações epidemiológicas e os resultados obtidos a partir de modelos animais mostram que muitas drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINES) reduzem o risco de formação de câncer de cólon (COUSSENS & WERB, 2001). O estudo da atividade antiinflamatória das LST também já foi bem explorado pelos pesquisadores. A inibição do NF-κB suprime a síntese de várias enzimas inflamatórias, como a ciclooxigenase Induzível e o Óxido Nítrico Sintase Induzível, e de citocinas inflamatórias como IL-2, IL-4, IL-8 e IL-12 em várias linhagens celulares quando são estimuladas por LPS, Interferon-α e/ou 12-*o*-tetradecanoilforbol-13-acetato (LEE *et al.*, 1999; FUKUDA *et al.*, 2001; WHAN *et al.*, 2001; KANG *et al.*, 2001; LI-WEBER *et al.*, 2002). Efeitos

similares são observados por outras LST, como a cinaropicrina (*Saussurea lappa*), quando administradas em cultura de leucócitos estimulados com LPS (CHO *et al.*, 2000). O vasto leque de ações do NF- κ B no metabolismo celular e sua importância para a sobrevivência das células colocam esse fator de transcrição como um alvo de grande valia na terapêutica anticâncer.

Um dos fatores que influenciam na decisão do paciente de dar continuidade à quimioterapia é o aumento da sobrevida e da qualidade de vida que a droga escolhida pode proporcionar. Apesar do grande número de trabalhos demonstrando a atividade antitumoral com LST, o aumento da sobrevida é ainda pouco relatado. Hladon e colaboradores (1975) investigaram a ação antitumoral *in vivo* da eupatoriopicrina, a principal LST encontrada na *Eupatorium cannabinum* L., e constataram um aumento da expectativa de vida dos animais. A partenina foi capaz de aumentar a sobrevida em um estudo realizado por Mew e colaboradores (1982) com camundongos fêmeas DBA/2J utilizando-se linhagens sólidas de mastocitoma, leucemia e rabdomiosarcoma. A partenolida associada ao Docetaxel aumentou a sobrevida de camundongos metastizados quando inoculados com a linhagem MDA-MB-231 de melanoma (SWEENEY *et al.*, 2005). Sendo assim, foi realizada nesse trabalho uma análise da sobrevida em camundongos Swiss inoculados com Sarcoma 180 tratados com diferentes doses de 15-deoxigoiazensolido. A curva de sobrevida dos animais na figura 21 mostra que o 15-deoxigoiazensolido não aumentou a sobrevida dos animais inoculados com o Sarcoma 180 em nenhuma das doses testadas (5, 10, 25 e 50 mg/m²). Entretanto, é possível perceber a inibição do aumento do volume tumoral em relação ao controle de maneira dose-dependente, o que estimula a sua utilização em combinação com outros quimioterápicos para diminuir seus efeitos tóxicos e proporcionar maior validade terapêutica.

A toxicidade das LST em mamíferos, e até em seres humanos, já tem sido relatada em outros trabalhos. A helenina reduz o peso corporal e a sobrevida de roedores devido à sua interferência no processo digestivo em animais (PICMAN *et al.*, 1986). Também foi relatado envenenamento de carneiro e cabra por hemenovina, uma LST provinda do *Hymenoxys*

richardsonii var. *floribunda* (IVIE *et al.*, 1976). A partenina presente na erva daninha *Parthenium hysterophorus* causa a morte do gado e de búfalos na Índia, gerando prejuízos na agricultura local (NARASHIMHAN *et al.*, 1977). A partenina ainda pode ser encontrada no leite de vacas, o que pode causar envenenamento em bezerros e no próprio ser humano (TOWERS, 1979). No homem, envenenamentos por LST devido ao consumo de pão feito a partir da farinha contaminada de sementes de plantas da família *Compositae* tem sido reportados (HERZ *et al.*, 1970). As LST ainda podem afetar a função de alguns órgãos. A partenina e a helenalina apresentam atividade cardiotoxica (PICMAN, 1986), enquanto a repina e a artemisina apresentam neurotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (FISHWICK *et al.*, 1995; ROBLES *et al.*, 1995). No presente trabalho, o 15-deoxigoiazensolido quando administrado a dose de 10 mg/m² e 5 mg/m² em camundongos induziu no fígado tumefação turva dos hepatócitos em graus variados, focos inflamatórios, hiperplasia das células de kupffer e esteatose em microgotas, o que caracteriza um forte indicativo da metabolização dessa molécula. As LST sofrem o processo de metabolização *in vivo*, uma vez que metabólitos de seus compostos são encontrados na bile e na urina de animais experimentais (HILL *et al.*, 1980; TERRY *et al.*, 1983; SCOTT *et al.*, 1994). O potencial hepatotóxico do 15-deoxigoiazensolido pode ser observado devido à presença de necrose focal, pigmentos de hemossiderina, característicos de hemorragia sinusoidal e hemólise, e presença de hepatócitos eosinofílicos indicando regeneração tecidual. Entretanto, a ausência de fibrose hepática demonstra que as alterações induzidas pelo 15-deoxigoiazensolido são consideradas reversíveis (JAESCHKE *et al.*, 2002). Por outro lado, observamos uma menor toxicidade nos rins, onde observamos hemorragia glomerular, trechos hemorrágicos e discreta tumefação turva do epitélio dos túbulos proximais e distais. A ocorrência de eventos localizados de necrose nefrotóxica focal não desperta grandes preocupações, visto que não foi configurado o quadro da síndrome tubular aguda.

Outro importante efeito tóxico das LST está relacionado com sua atividade imunomoduladora, entre elas a indução de hipersensibilidade. A hipersensibilidade é o termo aplicado às doenças mediadas por respostas imunológicas que acarretam em danos aos tecidos do hospedeiro. O sistema

imune pode apresentar quatro tipos de hipersensibilidades: tipo I (mediado por anticorpos IgE), tipo II (mediado por anticorpos IgG e IgM), tipo III (mediado por acúmulo de imunocomplexos) e tipo IV (mediado por linfócitos T). A maioria das reações de hipersensibilidades resulta em lesão tecidual mediada pela liberação de várias substâncias químicas que atraem e ativam outras células e moléculas responsáveis pela inflamação (HURTADO-NEDELEC *et al.*, 2008; MONTALTO *et al.*, 2008). Vários medicamentos podem desencadear reações de hipersensibilidades como os antibióticos, antiinflamatórios e antihipertensivos (MONTALTO *et al.*, 2008). As LST também podem estimular a liberação de moléculas que participam do processo inflamatório. A himenovina e a helenalina são potentes indutores da degranulação mastocitária, e o anel α -metileno- γ -lactona parece ser o responsável por tal reação (ELISSALDE *et al.*, 1983). A liberação de histamina e outros mediadores inflamatórios, como os eicosanóides, as citocinas e enzimas provindos da degranulação mastocitária pode levar a um processo alérgico conhecido como dermatite de contato. As LST contidas em produtos cosméticos, como perfumaria e óleos naturais derivados de plantas, são as grandes responsáveis pela dermatite de contato observada após seu uso em seres humanos (MOLLER *et al.*, 2002). Entre as espécies mais comuns indutoras dessa reação podemos citar a *Parthenium hysterophorus*, *Saussurea lappa*, *Laurus nobilis*, e outras espécies do gênero *Thapsia* e *Arnica*, (PICMAN, 1986). Sabendo-se do potencial alergênico das LST, este trabalho procurou verificar se o 15-deoxigoizensolido estimula a síntese de IgE específico em camungongos Swiss. A Imunoglobulina E é o anticorpo presente nas reações de hipersensibilidade do tipo I capaz de estimular a degranulação de mediadores alergênicos, após sua ligação cruzada, nos mastócitos (YAMASAKI & SAITO, 2008). Os resultados mostram que, na dose testada, o 15-deoxigoizensolido não induziu síntese de anticorpo IgE específico. Outros mecanismos podem estar envolvidos no desencadeamento da dermatite de contato, como por exemplo, a ativação de linfócitos T auxiliar do tipo 2 e liberação de IL-4 ou estimulação direta em receptores mastocitários indutores da degranulação.

Os resultados nesse trabalho demonstram uma potente ação anticâncer da LST 15-deoxigoiazensolido, sendo a apoptose seu provável mecanismo indutor na morte celular. Os mecanismos que levam sua ação antiproliferativa podem ser os mais variados, incluindo desde inibição de fatores de transcrição ou enzimas relacionadas com o ciclo celular, até a alquilação de tióis por adição de Michael, levando à ruptura do status redox. Além disso, as propriedades antitumorais *in vivo* também fazem com que o 15-deoxigoiazensolido seja considerado um excelente candidato para testes clínicos contra tumores sólidos.

6. CONCLUSÃO

A lactona sesquiterpênica 15-deoxigoiazensólido exerce potente efeito antiproliferativo em células neoplásicas. Quando avaliado seu mecanismo de ação, observa-se que as células tratadas entram em processo de morte celular por apoptose. Quando testadas em modelos tumorais *in vivo*, apresenta uma potente atividade antitumoral e inibição do crescimento do volume tumoral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDOR, R. W. Em Agrochemical from Natural Products; Godfrey, C. R. A., ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, 1994.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos específicos e não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY (AMC). What is cancer. 2006. Disponível em <http://www.cancer.org/docroot/cric/content/cric_2_6x_the_history_of_cancer_72.asp?sitearea=cric (11 of 11)8/1/2007 11:55:31> Acesso em 3 Jan. 2008.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sci.**, n. 78, p. 431-441, Set. 2005.

BANERJEE, S.; WANG, Z.; MOHAMMAD, M.; SARKAR, F. H.; MOHAMMAD, R. M. Efficacy of selected natural products as therapeutic agents against cancer. **J Nat Prod.**, v. 71, n. 3, p. 492-6, Mar. 2008.

BEEKMAN, A. C.; WOERDENBAG, H. J.; VAN UDEN, W.; PRAS, N.; KONINGS, A.W.; WIKSTRÖM, H. V. Stability of artemisinin in aqueous environments: impact on its cytotoxic action to Ehrlich ascites tumour cells. **J Pharm Pharmacol.**, v. 49, n. 12, p. 1254-8, Dez. 1997.

BERENBLUM, I.; RILEY-SMITH. The modifying influence of dichloroethyl sulphide on the induction of tumors in mice by tar. **Journ Phatol Bacteriol.**, v. 32, p. 424-434. 1929.

BERTRAM, J. S. The molecular basis of cancer. **Molecular Aspects of Medicine.**, v. 21, p. 1167-223, Dez. 2001.

BORK, P. M.; SCHMITZ, M. L.; KUHN, M.; ESCHER, C.; HEINRICH, M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure

sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kappaB. *FEBS Lett.*, v. 402, n. 1, p. 85-90, Jan. 1997.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod.*, v. 67, p. 2141 – 2153, Dez. 2004.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep.*, v. 22, p. 162-195, Abr. 2005.

BUTLER, M.; DAWSON, M. Cell culture. Blackwell, **Scientific Publications**, 1992.

CASSADY, J. M.; DOUROS, J. D. Anticancer Agents Based on Natural Product Models. (Eds.) Academic Press, New York. 1980.

CASSADY, J. M.; CHAN, K. K.; FLOSS, H. G.; LEISTNER, E. Recent developments in the Maytansinoid antitumor agents. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.*, v. 52, p. 1–26, Jan. 2004.

CHEN HC, CHOU CK, LEE SD, WANG JC, YEH SF. Active compounds from *Saussurea lappa* Clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res.*, v. 27, n. 1-2, p. 99-109, May, 1995.

CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. *AAPS J.*, v. 8, n. 2: E239-53, Abr. 2006.

CHO, J. Y.; BAIK, K. U.; JUNG, J. H.; PARK, M. H. In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. *Eur J Pharmacol.*, v. 398, n. 3, p. 399-407, Jun. 2000.

CHO, J. Y.; KIM, A. R.; JUNG, J. H.; CHUN, T.; RHEE, M. H.; YOO, E. S. Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone,

on the viability of leukocyte cancer cell lines. **Eur J Pharmacol.**, v. 492, n. 2-3, p. 85-94, Mai. 2004

CHOI, J. H.; SEO, B. R.; SEO, S. H.; LEE, K. T.; PARK, J. H.; PARK, H. J.; CHOI, J. W.; ITOH, Y.; MIYAMOTO, K. Costunolide induces differentiation of human leukemia HL-60 cells. **Arch Pharm Res.**, v. 25, n. 4, p. 480-4, Ago. 2002.

CIBAS, E. S. Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology. **Diagn Cytopathol.**, v. 13, n. 2, p. 166-71, Ago. 1995.

CIRLA, A.; MANN, J. Combretastatins: from natural products to drug discovery. **Nat Prod Rep.**, v. 20, p. 558-564, Dez. 2003.

CONSTANTINO, A. I.; MEHTA, R.; HUSBAND, A. Phenoxodiol, a novel isoflavone derivative, inhibits dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. **Eur J Cancer**, v. 39, p. 1012 - 1018, Mai. 2003.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammatory cells and cancer: think different! **J Exp Med.**, v. 193, n. 6, p. F23-6, Mar. 2001.

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

CROTTI, A. E.; LOPES, J. L.; LOPES, N. P. Triple quadrupole tandem mass spectrometry of sesquiterpene lactones: a study of goyazensolide and its congeners. **J Mass Spectrom.**, v. 40, n. 8, p. 1030-4, Ago. 2005.

CURRY, E. A. 3RD.; MURRY, D. J.; YODER, C; FIFE, K.; ARMSTRONG, V.; NAKSHATRI, H.; O'CONNELL, M.; SWEENEY, C. J. Phase I dose escalation trial of feverfew with standardized doses of parthenolide in patients with cancer. **Invest New Drugs**, v. 22, n. 3, p. 299-305. Aug. 2004.

DELEU, D.; HANSENS, Y.; NORTHWAY, M. G. Subcutaneous apomorphine: an evidence-based review of its use in Parkinson's disease. **Drugs Aging**, v. 21, p. 687-709. 2004.

DEMBITSKY, V. M. Bioactive cyclobutane-containing alkaloids. **Nat Med.**, v. 62, n. 1, p. 1-33, Jan. 2008.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2nd ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2002.

DIRSCH VM, STUPPNER H, VOLLMAR AM. Cytotoxic sesquiterpene lactones mediate their death-inducing effect in leukemia T cells by triggering apoptosis. **Planta Med.**, v. 67, n. 6, p. 557-9, Ago. 2001.

DIXON, S.; SORIANO, B. J.; LUSH, R. M.; BOMER, M. M.; FIGG, W. D. Apoptosis: its role in the development of malignancies and its potential as a novel therapeutic target. **The Ann of Pharmco.**, v. 31, p. 76-81, Jan. 1997.

DUSZENKO, M.; BALLA, H.; MECKE, D. Specific inactivation of glucose metabolism from eucaryotic cells by pentalenolactone. *Biochim Biophys Acta*, v. 714, n. 2, p. 344-50, Fev. 1982.

ELISSALDE, M. H.; IVIE, G. W.; ROWE, L. D.; ELISSALDE, G. S. Considerations of the structure of sesquiterpene lactones on biological activity: influence of the alpha-methylene-gamma-lactone moiety on mast cell degranulation. **Am J Vet Res.**, v. 44, n. 10, p. 1894-7, Out. 1983.

ENRIZ, R. D.; RODRIGUEZ, A. M.; JAUREGUI, E. A.; PESTCHANKER, M. J.; GIORDANO, O. S.; GUZMAN, J. Structure-activity relationship in the cytoprotective effect of helenalin and related compounds. **Drug Des Discov.**, v. 11, n. 1, p. 23-38, Jan. 1994.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ Health Perspect.**, v. 109, p. 69-75, Mar. 2001.

FÁVARO, O. C.; de OLIVEIRA, M. M.; ROSSINI, M. A.; KAMAKURA, C. R.; PINTO, A. V.; PINTO, M. do C. Seleção por meio de células KB de substâncias e extratos potencialmente ativos em quimioterapia do câncer. **An Acad Bras Cienc.**, v. 62, n. 3, p. 217-24, Sep. 1990.

FELTENSTEIN, M. W.; SCHÜHLY, W.; WARNICK, J. E.; FISCHER, N. H.; SUFKA, K. J. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of sesquiterpene lactones from Magnolia and Bear's foot. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 79, n. 2, p. 299-302, Out. 2004.

FILYAK, Y.; FILYAK, O.; SOUCHELNYTSKYI, S.; STOIKA, R. Doxorubicin inhibits TGF-beta signaling in human lung carcinoma A549 cells. **Eur J Pharmacol.**, 2008.

FISHWICK, J.; MCLEAN, W. G.; EDWARDS, G.; WARD, S. A. The toxicity of artemisinin and related compounds on neuronal and glial cells in culture. **Chem Biol Interact.**, v. 96, n. 3, p. 263-71, Jun. 1995.

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

FRANCESCHINI, G.; TERRIBILE, D.; MAGNO, S.; FABBRI, C.; D'ALBA, P. F.; CHIESA, F.; DI LEONE, A.; MASETTI, R. Update in the treatment of locally advanced breast cancer: a multidisciplinary approach. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, v. 11, n. 5, p. 283-9, Set-Out. 2007.

FRANCO, R.; SCHONEVELD, O.; GEORGAKILAS, A. G.; PANAYIOTIDIS, M. I. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. **Cancer Lett.**, v. 266, n. 1, p. 6-11, Jul. 2008.

FUKUDA, K.; AKAO, S.; OHNO, Y.; YAMASHITA, K.; FUJIWARA, H. Inhibition by costunolide of phorbol ester-induced transcriptional activation of inducible nitric oxide synthase gene in a human monocyte cell line THP-1. **Cancer Lett.**, v. 164, n. 1, p. 7-13, Mar. 2001.

GARCÍA-PIÑERES, A. J.; CASTRO, V.; MORA, G.; SCHMIDT, T. J.; STRUNCK, E.; PAHL, H. L.; MERFORT, I. Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. **J Biol Chem.**, v. 276, n. 43, p. 39713-20, Out. 2001.

GARCÍA-PIÑERES, A. J.; LINDENMEYER, M. T.; MERFORT, I. Role of cysteine residues of p65/NF-kappaB on the inhibition by the sesquiterpene lactone parthenolide and N-ethyl maleimide, and on its transactivating potential. **Life Sci.**, v. 75, n. 7, p. 841-56, Jul. 2004.

GASPARINI, J. R.; SARAIVA, R. A. Tratamento de dor em paciente com tumor sacralinoperável. Relato de caso. **Rev Bras Anestes.**, v. 54, n. 2, p. 252-260, mar/abr. 2004.

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

GERTSCH, J.; STICHER, O.; SCHMIDT, T.; HEILMANN, J. Influence of helenanolide-type sesquiterpene lactones on gene transcription profiles in Jurkat T cells and human peripheral blood cells: anti-inflammatory and cytotoxic effects. **Biochem Pharmacol.**, v. 66, n. 11, p. 2141-53, Dez. 2003.

GIORDANO, O. S.; PESTCHANKER, M. J.; GUERREIRO, E.; SAAD, Jr.; ENRIZ, R. D.; RODRIGUEZ, A. M.; JAUREGUI, E. A.; GUZMAN, J.; MARIA, A. O.; WENDEL, G. H. Structure-activity relationship in the gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. **J Med Chem.**, v. 35, n. 13, p. 2452-8, Jun. 1992.

GIOVANNETTI, A.; PIERDOMINICI, M.; DI IORIO, A.; CIANCI, R.; MURDACA, G.; PUPPO, F.; PANDOLFI, F.; PAGANELLI, R. Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases. **Curr Pharm Des.**, v. 14, n. 3, p. 253-68. 2008.

GRIPPO, A. A.; HALL, I. H.; KIYOKAWA, H.; MURAOKA, O.; SHEN, Y. C.; LEE, K. H. The cytotoxicity of helenalin, its mono and difunctional esters, and related sesquiterpene lactones in murine and human tumor cells. **Drug Des Discov.**, v. 8, n. 3, p. 191-206, Fev. 1992.

GRZANKA, A.; GRZANKA, D.; ORLIKOWSKA, M. Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines. **Biochem Pharmacol.**, v. 66, n. 8, p. 1611-7, Out. 2003.

GUIMARÃES, C. A.; LINDEN, R. Apoptosis and alternative deathstyles. **Eur J Biochem.**, v. 271, p. 1638-50, Mai. 2004.

HALL, I. H.; LEE, K. H.; IMAKURA, Y.; SIMS, D. Antitumor agents LXIII: the effects of microlenin on nucleic acid and protein syntheses of Ehrlich ascites cells. **J Pharm Sci.**, v. 72, n. 9, p. 1008-11, Set. 1983.

HALL, I. H.; LEE, K. H.; STARNES, C. O.; EIGEBALY, S. A.; IBUKA, T.; WU, Y. S.; KIMURA, T.; HARUNA, M. Antitumor agents XXX: Evaluation of alpha-methylene-gamma-lactone-containing agents for inhibition of tumor growth, respiration, and nucleic acid synthesis. **J Pharm Sci.**, v. 67, n. 9, p. 1235-9, Set. 1978.

HALL, I. H.; LEE, K. H.; WILLIAMS, W. L. JR.; KIMURA, T.; HIRAYAMA, T. Antitumor agents XLI: Effects of eupaformosanin on nucleic acid, protein, and anaerobic and aerobic glycolytic metabolism of Ehrlich ascites cells. **J Pharm Sci.**, v. 69, n. 3, p. 294-7, Mar. 1980.

HALL, I. H.; STARNES, C. O. Jr.; LEE, K. H.; WADDELL, T. G. Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. **J Pharm Sci.**, v. 69, n. 5, p. 537-43, Mai. 1980.

HALL, I. H.; WILLIAMS, W. L. JR.; GRIPPO, A. A.; LEE, K. H.; HOLBROOK, D. J.; CHANEY, S. G. Inhibition of nucleic acid synthesis in P-388 lymphocytic leukemia cells in culture by sesquiterpene lactones. **Anticancer Res.**, v. 8, n. 1, p. 33-42, Jan-Fev. 1988.

HALL, M. G.; WILKS, M. F.; PROVAN, W. M.; EKSBORG, S.; LUMHOLTZ, B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of NTBC [2-(2-nitro-4-fluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione] and mesotrione, inhibitors of 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) following a single dose to healthy male volunteers. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 52, p. 169-177, Ago. 2001.

HARTWELL, J. L.; ABBOTT, B. J. Antineoplastic principles in plants: recent developments in the field. **Adv. Pharmacol. Chemother.**, v. 7, n. 117-209. 1969.

HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell cycle control and cancer. **Science**, v. 266, p. 1821-8, Dez. 1994.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan. 2000.

HEHNER, S. P.; HOFMANN, T. G.; DRÖGE, W.; SCHMITZ, M. L. The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex. **J Immunol.**, v. 163, n. 10, p. 5617-23. Nov. 1999.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-6, Out. 2000.

HERZ, W. Effects of poisonous plants on livestock. Academic press, New York. 1978.

HILL, D. W.; BAILEY, E. M.; CAMP, B. J. Tissue distribution and disposition of hymenoxon. **J Agric Food Chem.**, v. 28, n. 6, p. 1269-73, Nov-Dec. 1980.

HLADOŃ, B.; DROZDZ, B.; HOLUB, M.; BOBKIEWICZ, T. Sesquiterpene lactones. XVI. In vitro studies on cytotoxic properties of sesquiterpene lactones in tissue cultures of human and animal malignant cells. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 23, n. 6, p. 845-55. 1975.

HUMAR, M.; GARCÍA-PIÑERES, A. J.; CASTRO, V.; MERFORT, I. Effect of sesquiterpene lactones on the expression of the activation marker CD69 and of IL-2 in T-lymphocytes in whole blood. **Biochem Pharmacol.**, v. 65, n. 9, p. 1551-63, Mai. 2003.

HURTADO-NEDELEC, M.; CHOLLET-MARTIN, S.; NICAISE-ROLAND, P.; GROOTENBOER-MIGNOT, S.; RUIMY, R.; MEYER, O.; HAYEM, G. Characterization of the immune response in the synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis, osteitis (SAPHO) syndrome. **Rheumatology (Oxford)**, v. 47, n. 8, p. 1160-7, Aug. 2008.

HWANG, D.; FISCHER, N. H.; JANG, B. C.; TAK, H.; KIM, J. K.; LEE, W. Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactones in macrophages correlates with the inhibition of MAP kinases. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 226, n. 3, p. 810-8, Set. 1996.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA). Fatores de risco. Ministério da saúde, Rio de Janeiro – RJ, 1996-2008. disponível em <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=13>. Acesso em 3 Jan. 2008.

IVIE, G. W.; WITZEL, D. A.; HERZ, W.; SHARMA, R. P.; JOHNSON, A. E. Isolation of hymenovin from *Hymenoxys richardsonii* (pingue) and *Dugaldia hoopesii* (orange sneezeweed). **J Agric Food Chem.**, v. 24, n. 3, p. 681-2, May-Jun. 1976.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P. G.; AMOOQUAYE, E.; BURKE, P. J.; SAMPSON, J.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 33-39, Jan. 2004.

IWALEWA, E. O.; IWALEWA, O. J.; ADEBOYE, J. O. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* less leaf. **J Ethnopharmacol.**, v. 86, n 2-3, p. 229-34, Jun. 2003.

JABOR, V. A.; DOS SANTOS, M. D.; BONATO, P. S.; GOUVEA, D. R.; LOPES N. P. A new high-performance liquid chromatography assay for the determination of sesquiterpene lactone 15-deoxygoyazensolide in rat plasma. **Anal Chim Acta**, v. 601, n. 2, p. 212-7, Out. 2007.

JAESCHKE, H.; GORES, G. J.; CEDERBAUM, A. I.; HINSON, J. A.; PESSAYRE, D.; LEMASTERS, J. J. Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicol Sci.**, v. 65, n. 2, p. 166-76, Fev. 2002.

JÚNIOR C. V. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quím. Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, Mai-Jun. 2003.

KAMSTEEG, M.; RUTHERFORD, T.; SAPI, E.; HANCZARUK, B.; SHAHABI, S.; FLICK, M.; BROWN, D.; MOR, G. Phenoxodiol – an isoflavone analog - induces apoptosis in chemoresistant ovarian cancer cells. **Oncogene**, v. 22, p. 2611-2620, Mai. 2003.

KANG, B. Y.; CHUNG, S. W.; KIM, T. S. Inhibition of interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages by parthenolide, a predominant sesquiterpene lactone in *Tanacetum parthenium*: involvement of nuclear factor-kappaB. **Immunol Lett.**, v. 77, n. 3, p. 159-63, Jul. 2001.

KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M.; SANTINI, V.; MURGO, A.; CHESON, B.; O'BRIAN, S. M. Homoharringtonine: history, current research, and future direction. **Cancer**, v. 92, p. 1591-1603, Set. 2001.

KARIN, M.; LIN, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. **Nat Immunol.**, v. 3, n. 3, p. 221-7, Mar. 2002.

KARIN, M.; YAMAMOTO, Y.; WANG, Q. M. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 3, n. 1, p. 17-26, Jan. 2004.

KEDEI, N.; LUNDBERG, D. J.; TOTH, A.; WELBURN, P.; GARFIELD, S. H.; BLUMBERG, P. M. Characterization of the interaction of ingenol 3-angelate with protein kinase C. **Cancer Res.**, v. 64, p. 3243-3255, Mai. 2004.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer.**, v. 26, n. 4, p. 239-57, Ago. 1972.

KHAWLI, L. A.; HU, P.; EPSTEIN, A. L. Cytokine, chemokine, and co-stimulatory fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. **Handb Exp Pharmacol.**, v. 181, p. 291-328. 2008.

KIM, Y. S.; KIM, J. S.; PARK, S. H.; CHOI, S. U.; LEE, C.O.; KIM, S. K.; KIM, Y. K.; KIM, S. H.; RYU, S. Y. Two cytotoxic sesquiterpene lactones from the leaves of *Xanthium strumarium* and their in vitro inhibitory activity on farnesyltransferase. **Planta Med.**, v. 69, n. 4, p. 375-7, Abr. 2003.

KINGHORN, A. D. The discovery of drugs from higher plants. **Biotechnology**, v. 26, p. 81-108. 1994.

KIRSCH, D. G.; KASTAN, M. B. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. **J Clin Oncol.**, v. 16, n. 9, p. 3158-68, Set. 1998.

KOO, T. H.; LEE, J. H.; PARK, Y. J.; HONG, Y. S.; KIM, H. S.; KIM, K. W.; LEE, J. J. A sesquiterpene lactone, costunolide, from *Magnolia grandiflora* inhibits NF-kappa B by targeting I kappa B phosphorylation. **Planta Med.**, v. 67, n. 2, p. 103-7, Mar. 2001.

KOUMIS, T.; SAMUEL, S. Tiotropium bromide: a new long-acting bronchodilator for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. **Clin Ther.**, v. 27, p. 377-392, Abr. 2005.

KRUMBHAAR, E. B. Role of the blood and the bone marrow in certain forms of gas poisoning. I. Peripheral blood changes and their significance. **J Am Med Assoc.**, v. 72, p. 39-41. 1919.

KRYSKO, D. V.; VANDEN BERGHE, T.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods.**, v. 44, n. 3, p. 205-21, Mar. 2008.

KUCHARCZAK, J.; SIMMONS, M. J.; FAN, Y.; GÉLINAS, C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. **Oncogene**, v. 22, n. 56, p. 8961-82, Dez. 2003.

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

KUPCHAN, S. M.; FESSLER, D. C.; EAKIN, M. A.; GIACOBBE, T. J. Reactions of alpha methylene lactone tumor inhibitors with model biological nucleophiles. **Science**, v. 168, n. 929, p. 376-8, Abr. 1970.

KUPCHAN, S. M. Novel natural products with antitumor activity. **Fed. Proc.**, v. 33, n. 11, p. 2288-95, Nov. 1974.

LEE, K. H.; HALL, I. H.; MAR, E.C.; STARNES, C.O.; ELGEBALY, S. A.; WADDELL, T. G.; HADGRAFT, R. I.; RUFFNER, C. G.; WEIDNER, I. Sesquiterpene antitumor agents: inhibitors of cellular metabolism. **Science**, v. 196, n 4289, p. 533-6, Abr. 1977.

LEE, H. J.; KIM, N. Y.; JANG, M. K.; SON, H. J.; KIM, K. M.; SOHN, D. H.; LEE, S. H.; RYU, J. H. A sesquiterpene, dehydrocostus lactone, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF-alpha in LPS-activated macrophages. **Planta Med.**, v. 65, n. 2, p. 104-8, Mar. 1999.

LEE, M. G.; LEE, K. T.; CHI, S. G.; PARK, J. H. Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrome C release. **Biol Pharm Bull.**, v. 24, n. 3, p. 303-6, Mar. 2001.

LEE, S. H.; LEE, M. Y.; KANG, H. M.; HAN, D. C.; SON, K. H.; YANG, D. C.; SUNG, N. D.; LEE, C. W.; KIM, H. M.; KWON, B. M. Anti-tumor activity of the farnesyl-protein transferase inhibitors arteminolides, isolated from Artemisa. **Bioorg Med Chem.**, v. 11, n. 21, p. 4545-9, Out. 2003.

LEE, S. H.; KIM, H. K.; SEO, J. M.; KANG, H. M.; KIM, J. H.; SON, K. H.; LEE, H.; KWON, B. M.; SHIN, J.; SEO, Y. Arteminolides B, C, and D, new inhibitors of farnesyl protein transferase from Artemisia argyi. **J Org Chem.**, v. 67, n. 22, p. 7670-5, Nov. 2002.

LIEBERMANN, D. A.; HOFFMAN, B.; STEINMAN, R. A. Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways. **Oncogene**, v. 11, p. 199-210, Jul. 1995.

LI-WEBER, M.; GIAISI, M.; TREIBER, M. K.; KRAMMER, P. H. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone parthenolide suppresses IL-4 gene

expression in peripheral blood T. **Eur J Immunol.**, v. 32, n. 12, p. 3587-97, Dez. 2002.

LO, A. S.; ZHU, Q.; MARASCO, W. A. Intracellular antibodies (intrabodies) and their therapeutic potential. **Handb Exp Pharmacol.**, v. 181, p. 343-73. 2008.

LYSS, G.; SCHMIDT, T. J.; MERFORT, I.; PAHL, H. L. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF-kappaB. **Biol Chem.**, v. 378, n. 9, p. 951-61, Set. 1997.

MACKLIS, J. D ; MADISON, R. D. Latex nanosphere delivery system (LNDS): novel nanometer-sized carriers of fluorescent dyes and active agents selectively target neuronal subpopulations via uptake and retrograde transport. **Brain Res.**, v. 522, n. 1, p. 90-8, Jul. 1990

MARCHETTI, P.; CASTEDO, M.; SUSIN, S. A.; ZAMZAMI, N.; HIRSCH, T.; MACHO, A.; HAEFFNER, A.; HIRSCH, F.; GEUSKENS, M.; KROEMER, G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. **J Exp Med.**, v. 184, n. 3, p. 1155-60, Sep. 1996.

MARCO, J. A.; BARBERA, O. In Studies in natural products chemistry. Elsevier. Amsterdam. 1990.

MARQUES, R.; BUZAID, A. C. Ciclina E e o câncer de mama. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 50, n. 3, p. 231-232, Set. 2004.

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

MELAMED, S.; WOOLLER, K. K.; CRAWFORD, W. A. Behavioural toxicology in occupational health. **Med J Aust.**, v. 1, n. 6, p. 227-30, Mar. 1979.

MERFORT I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. **Jour of Chromatography A**, v. 967, p. 115-130, Ago. 2002.

MEW, D.; BALZA, F.; TOWERS, G. H.; LEVY, J. G. Anti-tumour effects of the sesquiterpene lactone parthenin. *Planta Med.*, v. 45, n. 5, p. 23-7, Mai. 1982.

MILITÃO, G. C.; DANTAS, I. N.; PESSOA, C.; FALCÃO, M. J.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; CURI, R.; LIMA, T.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Induction of apoptosis by pterocarpans from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sci.**, v. 78, n. 20, p. 2409-17, Apr. 2006.

MITCHELL, J. C. Letter: Contact sensitivity to costusroot oil, an ingredient of some perfumes. **Arch Dermatol.**, v. 109, n. 4, p. 572, Abr. 1974.

MITCHELL, J. C.; EPSTEIN, W. L. Contact hypersensitivity to a perfume material, Costus Absolute. The role of sesquiterpene lactones. **Arch Dermatol.**, v. 110, n. 6, p. 871-3, Dez. 1974.

MITCHELL, G.; BARTLETT, D. W.; FRASER, T. E.; HAWKES, T. R.; HOLT, D. C.; TOWNSON, J. K.; WICHERT, R. A. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. **Pest Manag Sci.**, v. 57, p. 120-128, Fev. 2001.

MOLINARI M. Cell cycle checkpoints and their activation in human cancer. **Cell Prolif.**, v. 33, n. 5, p. 261-74, Out. 2000.

MOLLER, H.; SPIREN, A.; SVENSSON, A.; GRUVBERGER, B.; HINDSEN, M.; BRUZE, M. Contact allergy to the Asteraceae plant *Ambrosia artemisiifolia* L (ragweed) in sesquiterpene lactone-sensitive patients in southern Sweden. **Contact Dermatitis.**, v. 47, n. 3, p. 157-60, Set. 2002.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a

high-flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 83, p. 757-766, Jun. 1991.

MONTALTO, M.; SANTORO, L.; D'ONOFRIO, F.; CURIGLIANO, V.; VISCA, D.; GALLO, A.; CAMMAROTA, G.; GASBARRINI, A.; GASBARRINI, G. Classification of malabsorption syndromes. **Dig Dis.**, v. 26, n. 2, p. 104-11, Abr. 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 16, p. 55-63, Dez. 1983.

NARASIMHAN, T. R.; ANANTH, M.; SWAMY, M. N.; BABU, M. R.; MANGALA, A.; RAO, P. V. Toxicity of Parthenium hysterophorus L. to cattle and buffaloes. **Experientia**, v. 33, n. 10, p. 1358-9, Out. 1977.

NAVARRO-GARCÍA, V. M.; GONZALEZ, A.; FUENTES, M.; AVILES, M.; RIOS, M. Y.; ZEPEDA, G.; ROJAS, M. G. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. **J Ethnopharmacol.**, v. 87, n. 1, p. 85-8, Jul. 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat Prod Rep.**, v. 17, n. 3, p. 215-34, Jun. 2000.

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, n. 7, p. 1022-37, Jul. 2003.

OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. **J Nat Prod.**, v. 67, p. 129-135, Fev. 2004.

OGBOURNE, S. M. ; SUHRBIER, A.; JONES, B. Antitumor activity of 3-ingenyl angelate: plasma membrane and mitochondrial disruption and necrotic cell death. **Cancer Res.**, v. 64, p. 2833-2839, Abr. 2004.

OKA, D.; NISHIMURA, K.; SHIBA, M.; NAKAI, Y.; ARAI, Y.; NAKAYAMA, M.; AKAYAMA, H.; INOUE, H.; OKUYAMA, A.; NONOMURA, N. Sesquiterpene lactone parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of renal cell carcinoma by inhibiting the activation of NF-kappaB. **Int J Cancer.**, v. 120, n. 12, p. 2576-81, Jun. 2007.

PAGE, J. D.; CHANEY, S. G.; HALL, I. H.; LEE, K. H.; HOLBROOK, D. J. Inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase by sesquiterpene lactones. **Biochim Biophys Acta**, v. 926, n. 2, p. 186-94. Nov, 1987.

PATEL, N. M.; NOZAKI, S.; SHORTLE, N. H.; BHAT-NAKSHATRI, P.; NEWTON, T. R.; RICE, S.; GELFANOV, V.; BOSWELL S. H.; GOULET, R. J. JR.; SLEDGE, G. W. JR.; NAKSHATRI, H. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kappaB is enhanced by IkappaBalpha super-repressor and parthenolide. **Oncogene.**, v. 19, n. 36, p. 4159-69, Ago. 2000.

PEREIRA, M. R.; GUEDES, M. I. F. Imunização oral e alergenicidade induzida por proteínas de sementes de *Lablab purpureus* (L.) sweet em camundongos e sua modulação por carboidratos. **RBPS.**, v. 18, n. 2, p. 90-97, Abr. 2005.

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

PICMAN, A. K. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 3, p. 255-281. 1986.

PINNEY, K. G.; JELINEK, C.; EDVARDBSEN, K.; CHAPLIN, D. J.; PETTIT, G. R. The discovery and development of the combrestatins. In: Cragg, G. M.; Kingston, D. G. I.; Newman, D. J. eds. *Anticancer Agents from Natural Products*. Boca Raton, FL : CRC Press; p. 23- 46. 2005

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61. 2002.

POTTERAT, O.; HAMBURGER, M. Drug discovery and development with plant-derived compounds. **Prog Drug Res**, v. 65, p. 47-118. 2008.

POWELL, R. G.; WEISLEDER, D.; SMITH, C. R.; ROHWEDDER, W. K. Structures of harringtonine, isoharringtonine, and homoharringtonine. **Tetrahedron Lett.**, v. 11, p. 815-818, Mar. 1970.

RAJSKI, S. R.; WILLIAMS, R. M. DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. **Chem Rev.**, v. 98, n. 8, p. 2723-2796, Dez. 1998.

ROBLES, M.; AREGULLIN, M.; WEST, J.; RODRIGUEZ, E. Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. **Planta Med.**, v. 61, n. 3, p. 199-203, Jun. 1995.

ROBLES, M.; WANG, N.; KIM, R.; CHOI, B. H. Cytotoxic effects of repin, a principal sesquiterpene lactone of Russian knapweed. **J Neurosci Res.**, v. 47, n. 1, p. 90-7, Jan. 1997.

RUBINSTEIN, L. V.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; SIMON, R. M.; TOSINI, S.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; BOYD, M. R. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, p. 1113-1118, Jul. 1990.

RÜNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, H. L.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T. J. Inhibition of transcription factor NF-kappaB by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 2343-2352, Nov. 1999.

SAKAMOTO, H. T.; FLAUSTINO, D.; CASTELLANO, E. E.; STARK, C. B. W. ; GATES, P. J.; LOPES, N. P. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 693-695, Mai. 2003.

SANTOS, P. A.; AMARANTE, M. F.; PEREIRA, A. M.; BERTONI, B.; FRANÇA, S. C.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PEREIRA, M. R.; LOPES, N. P. Production of an antiproliferative furanoheliangolide by *Lychnophora ericoides* cell culture. **Chem Pharm Bull.**, v. 52, n. 12, p. 1433-5, Dez. 2004.

SARTORIUS, U.; SCHMITZ, I.; KRAMMER, P. H. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. **Chembiochem.**, v. 2, n 1, p. 20-9, Jan. 2001.

SAUSVILLE, E. A.; ZAHAREVITZ, D.; GUSSIO, R.; MEIJER, L.; LOUARN-LEOST, M.; KUNICK, C.; SCHULTZ, R.; LAHUSEN, T.; HEADLEE, D.; STINSON, S.; ARBUCK, S. G. Cyclin-dependent kinases: initial approaches to exploit a novel therapeutic target. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 82, n 2-3, p. 285-292, Mai-Jun. 1999.

SAVAGE, S. J.; WINGO, M. S.; HOOPER, H. B.; SMITH, M. T.; KEANE, T. E. Pathologically confirmed port site metastasis after laparoscopic radical prostatectomy: case report and literature review. **Urology**, v. 70, n. 6, p. 1222.e9-11, Dez. 2007.

SCHRODER, H.; LOSCHE, W.; STROBACH, H.; LEVEN, W.; WILLUHN, G.; TILL, U.; SCHROR, K. Helenalin and 11 alpha,13-dihydrohelenalin, two constituents from *Arnica montana* L., inhibit human platelet function via thiol-dependent pathways. **Thromb Res.**, v. 57, n. 6, p. 839-45, Mar. 1990.

SCHULZE-OSTHOFF, K.; WALCZAK, H.; DRÖGE, W.; KRAMMER, P. H. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. **J Cell Biol.**, v. 127, n. 1, p. 15-20, Out. 1994.

SHAPIRO, J. A. Mechanisms of DNA reorganization in bacteria. **Int Rev Cytol.**, v. 93, p. 25-56. 1985.

SCHÜTZE, S.; WIEGMANN, K.; MACHLEIDT, T.; KRÖNKE, M. TNF-induced activation of NF-kappa B. **Immunobiology.**, v. 193, n. 2-4, p. 193-203. Jul. 1995.

SCHULZE-OSTHOFF, K.; WALCZAK, H.; DRÖGE, W.; KRAMMER, P. H. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. **J Cell Biol.**, v. 127, n. 1, p. 15-20, Oct. 1994.

SCOTT, D. O.; BINDRA, D. S.; SUTTON, S. C.; STELLA, V. J. Urinary and biliary disposition of the lactone and carboxylate forms of 20(S)-camptothecin in rats. **Drug Metab Dispos.**, v. 22, n. 3, p. 438-42, May-Jun. 1994.

SIEDLE, B.; CISIELSKI, S.; MURILLO, R.; LÖSER, B.; CASTRO, V.; KLAAS, C. A.; HUCKE, O.; LABAHN, A.; MELZIG, M. F.; MERFORT, I. Sesquiterpene lactones as inhibitors of human neutrophil elastase. **Bioorg Med Chem.**, v. 10, n. 9, p. 2855-61, Set. 2002.

SIEDLE, B.; GUSTAVSSON, L.; JOHANSSON, S.; MURILLO, R.; CASTRO, V.; BOHLIN, L.; MERFORT, I. The effect of sesquiterpene lactones on the release of human neutrophil elastase. **Biochem Pharmacol.**, v. 65, n. 5, p. 897-903, Mar, 2003.

SIEDLE, B.; GARCIA-PINERES, A. J.; MURILLO, R.; SCHULTE-MONTING, J.; CASTRO, V.; RUNGELER, P.; KLAAS, C.A.; DA COSTA, F. B.; KISIEL, W.; MERFORT, I. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF-kappaB. **J Med Chem.**, v. 47, n. 24, p. 6042-54, Nov. 2004.

SKAL TSA, H.; LAZARI, D.; PANAGOULEAS, C.; GEORGIADOU, E.; GARCIA, B.; SOKOVIC, M. Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and

Centaurea attica. Antifungal activity. **Phytochemistry**, v. 55, n. 8, p. 903-8, Dez. 2000.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1118, Jul. 1990.

SUN, C.M.; SYU, W.J.; DON, M.J.; LU, J.J.; LEE, G.H. Cytotoxic sesquiterpene lactones from the root of *Saussurea lappa*. **J Nat Prod.**, v. 66, n. 9, p. 1175-80, Set. 2003.

STEVENS, K. L.; RIOPELLE, R. J.; WONG, R. Y. Repin, a sesquiterpene lactone from *Acroptilon repens* possessing exceptional biological activity. **J Nat Prod.**, v. 53, n. 1, p. 218-21, Jan-Fev. 1990.

SWEENEY, C. J.; MEHROTRA, S.; SADARIA, M. R.; KUMAR, S.; SHORTLE, N. H.; ROMAN, Y.; SHERIDAN, C.; CAMPBELL, R. A.; MURRY, D. J.; BADVE, S.; NAKSHATRI, H. The sesquiterpene lactone parthenolide in combination with docetaxel reduces metastasis and improves survival in a xenograft model of breast cancer. **Mol Cancer Ther.**, v. 4, n. 6, p. 1004-12, Jun. 2005.

TAKASAKI, M.; KONOSHIMA, T.; KOMATSU, K.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Anti-tumor-promoting activity of lignans from the aerial part of *Saussurea medusa*. **Cancer Lett.**, v. 158, n. 1, p. 53-9, Set. 2000.

TAN, R. X.; TANG, H. Q.; HU, J.; SHUAI, B. Lignans and sesquiterpene lactones from *Artemisia sieversiana* and *Inula racemosa*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 157-61. Sep. 1998.

TANIGUCHI, M.; KATAOKA, T.; SUZUKI, H.; URAMOTO, M.; ANDO, M.; ARAO, K.; MAGAE, J.; NISHIMURA, T.; OTAKE, N.; NAGAI, K. Costunolide and dehydrocostus lactone as inhibitors of killing function of cytotoxic T lymphocytes. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 59, n. 11, p. 2064-7, Nov. 1995.

TERRY, M. K.; WILLIAMS, H. G.; KIM, H. L.; POST, L. O.; BAILEY, E. M. JR. Ovine urinary metabolites of hymenoxon, a toxic sesquiterpene lactone isolated from *Hymenoxys odorata* DC. **J Agric Food Chem.**, v. 31, n. 6, p. 1208-10, Nov-Dec. 1983.

TOWERS, G. H. N. In Toxic plants. Kinghorn A. D. ed. Columbia University Press. New York. 1979.

TSIFTSOGLU, A. S.; PAPPAS, I. S.; VIZIRIANAKIS, I. S. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. **Pharmacol Ther.**, v. 100, n. 3, p. 257-90, Dec. 2003.

VASCONCELLOS, M. C.; ROSA, R. M.; MACHADO, M. S.; VILLELA, I.V.; CROTTI, A. E.; LOPES, J. L.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. Genotoxicity of 15-deoxygoyazensolide in bacteria and yeast. **Mutat Res.**, v. 631, n. 1, p. 16-25, Jul. 2007.

VERAS, M.L.; BEZERRA, M.Z.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O.D.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LUTUFO, L.V. Cytotoxic epimeric withaphysalins from leaves of *Acnistus arborescens*. **Planta Med.**, v. 70, p. 551-555, Jun. 2004.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v. 36, n. 3, p. 131-49, Jun. 2003.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Prolif.**, v. 36, n. 3, p. 165-75, Jun. 2003.

VILELA, J. D. Mummification and medicine in ancient Egypt. **Rev Paul Med.**, v. 89, n 5-6, p. 115-24, Mai-Jun. 1977.

WARSHAW, E. M.; ZUG, K. A. Sesquiterpene lactone allergy. **Am J Contact Dermat.**, v. 7, n. 1, p. 1-23, Mar. 1996.

WEINBERG, R. A. How cancer arises. **Sci Am.**, v. 275, n. 3, p. 62-70, Set. 1996.

WEN, J.; YOU, K. R.; LEE, S. Y.; SONG, C. H.; KIM, D. G. Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. **J Biol Chem.**, v. 277, n. 41, p. 38954-64, Out. 2002.

WEST, C. M. L.; PRICE, P. Combretastatin A4 phosphate. **Anticancer Drugs**, V. 15, n. 13, p. 179-187, Mar. 2004.

WHAN, H. J.; GON, L. B.; KEE, K. Y.; WOO, Y. J.; KYOUNG, J. H.; HONG, S.; YOUNG, L. H.; RO, L. K.; WOO, L. H. Ergolide, sesquiterpene lactone from *Inula britannica*, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages through the inactivation of NF-kappaB. **Br J Pharmacol.**, v. 133, n. 4, p. 503-12, Jun. 2001.

WOERDENBAG, H. J. Eupatorium cannabinum L. A review emphasizing the sesquiterpene lactones and their biological activity. **Pharm Weekbl Sci.**, v. 8, n. 5, p. 245-51, Oct. 1986.

Yamasaki S, Saito T. Progress in allergy signal research on mast cells: signal regulation of multiple mast cell responses through FcepsilonRI. **J Pharmacol Sci.**, v. 106, n. 3, p. 336-40, Mar. 2008.

YOUNG, S. L.; CHAPLIN, D. J. Combretastatin A4 phosphate: background and current clinical status. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 13, n. 9, p. 1171-1182, Set. 2004.

ZHANG, S.; ONG, C. N.; SHEN, H. M. Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells. **Cancer Lett.**, v. 208, n. 2, p. 143-53, Mai. 2004.

ZHANG, S.; WON, Y. K.; ONG, C. N.; SHEN, H. M. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. **Curr Med Chem Anticancer Agents**, v. 5, n. 3, p. 239-49, Mai. 2005.