



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

**ESTUDO DA INTERAÇÃO COM DNA, CITOTOXICIDADE E DA ATIVIDADE DAS
TOPOISOMERASES I E II DO DERIVADO DE BUFADIENOLÍDEO 3-ACETATO
DE BUFALINA**

BRUNO MARQUES SOARES

FORTALEZA

2018

BRUNO MARQUES SOARES

**ESTUDO DA INTERAÇÃO COM DNA, CITOXICIDADE E DA ATIVIDADE DAS
TOPOISOMERASES I E II DO DERIVADO DE BUFADIENOLÍDEO 3-ACETATO DE
BUFALINA**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Claudia do Ó Pessoa

FORTALEZA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S652e Soares, Bruno Marques.
Estudo da interação com DNA, citotoxicidade e da atividade das topoisomerasas I e II do derivado de bufadienolídeo 3-acetato de bufalina / Bruno Marques Soares. – 2018.
138 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, , Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Claudia do Ó Pessoa.
1. Câncer de próstata. 2. Apoptose. 3. Necrose. 4. DNA topoisomerase tipo II. I. Título.

CDD

BRUNO MARQUES SOARES

**ESTUDO DA INTERAÇÃO COM DNA, CITOXICIDADE E DA ATIVIDADE DAS
TOPOISOMERASES I E II DO DERIVADO DE BUFADIENOLÍDEO 3-ACETATO DE
BUFALINA**

Tese submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de doutor em Farmacologia outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

Aprovada em: 21/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Claudia do Ó Pessoa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro
Universidade Federal do Ceará

Dr. João Hermínio Martins da Silva
Fundação Oswaldo Cruz Ceará

Dr^a. Marcela Helena Gambim Fonseca
Fundação Oswaldo Cruz Ceará

Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

À **Profª Claudia Pessoa** por ter me aceitado no laboratório há oito anos atrás sem nem me conhecer e por todo incentivo e oportunidades que dá a mim e a todos no laboratório, todos os momentos de confraternizações, rizadas e até *insights* espirituais. Meu coração se enche de gratidão!

Ao **Profº Odorico de Moraes**, por ter fundado e pelo continuo aperfeiçoamento do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) e Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) sem o qual esse trabalho não poderia ter sido realizado.

Ao **Dr. Yves Pommier** por ter me aceitado em seu laboratório durante o período de doutorado sanduíche no National Cancer Institute (NCI), Bethesda, MD.

Aos queridos amigos do LOE **Augusto César, Carlos Paier, Cristiana Libardi, Daisy Lima, Danilo Rocha, Gabriel Grisi, Guilherme Carvalho, Igor Bomfim, José Neto, Lucas Brito, Kaio Moraes, Maria Julia, Renan Santos, Sarah Sant'anna, Soraya Ribeiro e Stefânio Barreto** pelas discussões científicas, ajudas mutuas e momentos de descontração

Aos queridos amigos do NCI **Simone Bächler, Muthana Nihon, Junko Murai, Keli Agama e Michael Lizardo** por toda ajuda durante meu período “fora de casa” e pelos ótimos “happy hours” que tivemos.

Às “cafuças” lindas **Andréa Felinto, Claudia Luciano, Fátima de Cássia, e Francilene Silva** que são sempre uma luz dentro do laboratório, tão amigas, tão amorosas que sempre fazem meu coração se encher de amor também. Amor por vocês!

Ao **Daniel Pascoalino** por todos os momentos vividos antes, durante e depois do nosso periodo de doutorado sanduíche. Ter alguém para dividir as despesas, as alegrias e as tristezas tornou esse “um ano fora” muito mais fácil.

Ao **Glen McGugan** por ser essa pessoa tão especial que também foi imprescindível quando fiquei longe da minha família. Nunca vou conseguir retribuir nem 10% do que você fez por mim. Love you!

À **Silvana França** que sempre está ali quando precisamos, seja com o que precisamos no laboratório ou só para uma conversa distraída. Saiba que o laboratório não existe sem você. E à **Adelânia Roque** sempre atenciosa e prestativa tanto no profissional quanto no pessoal.

Às secretárias da Pós **Célia Carvalho e Laura Alves** pela prontidão em ajudar sempre que precisei.

Ao **Jayron Rodrigues** por ter me aguentado nessa etapa conturbada de escrita, mas que sempre só me deu motivos pra rir e amar. Agradeço ainda ao nosso caminho compartilhado pela espiritualidade que com certeza já estava predestinado antes mesmo de a gente nascer. Te amo muito!

Aos meus pais, **Elizabeth Aragão e Manoel Soares**, por me tornarem o que sou hoje e por sempre me apoiarem em todas as decisões da minha vida mesmo não as entendendo muito bem. Amo vocês!

Aos meus queridos irmãos: **Thiago e Hermano Soares** por também me apoiarem e ajudarem em todas as decisões que tomei. Agradeço ainda a **Aurilândia Carneiro** por todos os momentos de ajuda e também descontração em casa.

À todos os professores que passaram pela minha formação desde o maternal até o doutorado e que contribuíram imensamente para a pessoa que sou hoje.

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

RESUMO

Os bufadienólídeos possuem uma grande variedade de atividades biológicas, incluindo atividade antineoplásica. O presente estudo avaliou o potencial citotóxico bem como o mecanismo de ação de dois bufadienólídeos: a bufalina (BUF-05) e seu análogo 3-acetato de bufalina (BUF-06). O potencial citotóxico foi avaliado em sete linhagens tumorais humanas, três linhagens murinas normais e em células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) humano. Ambos os bufadienólídeos se mostraram bastante citotóxicos (IC_{50} 3 a 32 nM), onde 3-acetato de bufalina se mostrou mais potente que bufalina. Em relação a CMSP, os bufadienólídeos também se mostraram citotóxicos (IC_{50} 25 nM). Os bufadienólídeos não se mostraram citotóxicos para as linhagens murinas. A linhagem celular de próstata PC-3 foi escolhida para determinação dos mecanismos de ação dos bufadienólídeos. A análise do crescimento celular em tempo real por impedância mostrou que tanto BUF-06 como BUF-05 possuem perfil similar com aumento da impedância logo nas primeiras horas, reduzindo após 24 horas para abaixo da curva do controle negativo e atingindo platô em seguida. A viabilidade das células por citometria de fluxo indicou a redução do número de células e integridade de membrana em 24 e 48 horas. A análise morfológica por citometria de fluxo revelou aumento do número de células em padrão apoptótico. Já a análise morfológica por coloração diferencial, mostrou o surgimento de células tanto com padrão apoptótico quanto necrótico. No intuito de confirmar o perfil apoptótico, foi realizado a determinação da externalização de fosfatidilserina, a qual mostrou aumento significativo de apoptose inicial em 24 horas e apoptose tardia para 48 horas em ambos os bufadienólídeos. Os bufadienólídeos apresentaram, ainda, despolarização mitocondrial em ambos os tempos de incubação. As análises por *western blot* revelaram que houve clivagem discreta de PARP e caspase 8. No entanto, as caspases efetoras 3 e 7 não se mostraram ativadas. A diminuição da expressão dos componentes antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-xL, bem como diminuição do componente pró-apoptótico Bax sugere a não indução de morte por apoptose. A avaliação da quantidade de DNA nuclear revelou que ambos os bufadienólídeos causaram acúmulo de células na fase G2/M após 24 e 48 horas de incubação. Ao se analisar a expressão de ciclinas envolvidas no ciclo celular, foi observada ausência da ciclina A2 e acúmulo de B1 para ambos os compostos, podendo indicar acúmulo de células na fase M. As avaliações por meio do ensaio do cometa e marcação de H2AX fosforilado, os quais revelaram que os compostos não foram capazes de causar dano ao DNA. A avaliação do envolvimento das vias de reparo de DNA utilizando células DT40 knockout, mostrou que PARP pode estar envolvido no processo de morte promovido pelos bufadienólídeos. Além disso, os ensaios de clivagem de DNA mediados por topoisomerase mostraram a inibição de topoisomerase II tanto por BUF-06 como por BUF-05. Ensaio *in silico* por docking molecular revelaram forte afinidade para a porção ATPásica de topoisomerase II α , indicando uma possível inibição catalítica. Desse modo, os resultados apontam que 3-acetato de bufalina possui perfil citotóxico semelhante a bufalina.

Palavras-chave: câncer de próstata, apoptose, necrose programada, DNA Topoisomerase tipo II

ABSTRACT

STUDY OF THE INTERACTION WITH DNA, CYTOTOXICITY AND THE ACTIVITY OF TOPOISOMERASES I AND II OF THE BUFADIENOLIDE DERIVATIVE 3-ACETATE BUFALIN

Bufadienolides show a wide variety of biological activities, including antineoplastic activities. The present study evaluated the cytotoxic potential and mechanisms of action of two bufadienolides: bufalin (BUF-05) and 3-acetate bufalin (BUF-06). Cytotoxic potential was evaluated using seven human tumor cell lines, three normal murine cell lines and human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Both bufadienolides were shown to be quite cytotoxic to all tumor cell lines (IC₅₀ from 3 to 32 nM), with BUF06 being slightly more potent than BUF05. In PBMCs, bufadienolides showed IC₅₀ values of about 25nM. The compounds showed no cytotoxicity towards normal murine. The PC-3 prostate cell line was chosen to elucidate the mechanism of action of the bufadienolides. Impedance based real-time growth assay analysis showed that both bufadienolides have a similar profile, increasing impedance in the first few hours, then reducing below the control curves, and finally reaching plateau shortly thereafter. Light scanning photomicrographs showed an increase in cell size for both bufadienolides. Cell viability by flow cytometry indicated a reduction in the number of cells and membrane integrity at 24 and 48 hours. Morphological analysis by flow cytometry revealed that both compounds increased the number of apoptotic cells. Moreover, morphological analysis using differential staining showed the emergence of apoptotic and necrotic cells. In order to confirm the apoptotic profile, phosphatidylserine externalization detection was performed, which showed an increase of initial apoptosis after 24 hours and late apoptosis after 48 hours incubation for both bufadienolides. The compounds also showed mitochondrial depolarization for both incubation times. Western blot analysis revealed a discrete cleavage of PARP and caspase 8. However, effector caspases 3 and 7 were not activated. Low expression of antiapoptotic components Bcl-2 and Bcl-xL, as well as decrease of proapoptotic Bax suggest non-induction of apoptotic cell death. Evaluation of nuclear DNA content showed that both bufadienolides provoked cell arrest in the G2/M phase after 24 and 48 hours incubation. When analyzing cyclin expression involved in the cell cycle, the absence of cyclin A2 and accumulation of cyclin B1 was observed for both compounds, possibly indicating arrest in M phase. DNA damage was accessed by comet assay and phosphorylated H2AX labeling, which showed that the compounds were not able to produce DNA damage. Evaluation of the involvement of DNA repair pathways using DT40 knockout cells suggested that PARP may be involved in the cell death caused by both bufadienolides tested. PARP hyperactivation is a hallmark of parthanatos, a regulated type of necrotic cell death. Furthermore, topoisomerase-mediated DNA cleavage assays showed the inhibition of topoisomerase II by both BUF-06 and BUF-05. In silico molecular docking assays revealed strong affinity of both bufadienolides for the ATPase portion of topoisomerase II α , indicating possible catalytic inhibition. Overall, these results indicate that 3-acetate bufalin has a cytotoxic profile similar to bufalin.

Keywords: prostate cancer, apoptosis, programmed necrosis, DNA topoisomerase type II

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens utilizadas no ensaio de citotoxicidade in vitro por meio do teste do MTT. 45

Tabela 2. Atividade citotóxica de bufadienolídeos bufalina (BUF-05) e 3-acetato de bufalina (BUF-06) obtidos a partir da secreção do anfíbio de *Rhinella schneideri* em linhagens celulares de câncer e normais. μM (micromolar).65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma*	20
Figura 2. Os novos marcos do câncer.....	21
Figura 3. Modelo clássico de ciclo celular em mamíferos.....	25
Figura 4. Topoisomerases humanas e seus mecanismos de ação.....	31
Figura 5. Estrutura química dos glicosídeos cardíacos.....	37
Figura 6. <i>Rhinella schneideri</i>	40
Figura 7. Estrutura química dos bufadienolídeos estudados.....	44
Figura 8. Tipos de cometa e classificação por categoria de dano.....	57
Figura 9. Efeito do bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF-06) e bufalina (BUF-05) sobre o crescimento celular em tempo real.....	67
Figura 10. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF-06) e bufalina (BUF-05) sobre a concentração de células (A) e integridade de membrana (B) na linhagem celular PC3, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.....	70
Figura 11. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF-06) e bufalina (BUF-05) sobre a concentração de células (A) e integridade de membrana (B) na linhagem celular PC3, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 48 horas de incubação.....	71
Figura 12. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre a morfologia de células PC3 determinado por citometria de fluxo após 24 horas de incubação.....	72
Figura 13. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre a morfologia de células PC3 determinado por citometria de fluxo após 48 horas de incubação.....	73
Figura 14. Mudanças morfológicas provocadas pelos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) após 24 horas de incubação em células PC-3.....	75
Figura 15. Mudanças morfológicas provocadas pelos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) após 48 horas de incubação em células PC-3.....	76
Figura 16. Efeito do bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre a externalização da fosfatidilserina em células PC3 determinado por citometria de fluxo após 24 horas de incubação.....	78

Figura 17. Efeito do bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre a externalização da fosfatidilserina em células PC3 determinado por citometria de fluxo após 48 horas de incubação.....	79
Figura 18. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre o potencial transmembrânico em células PC-3 determinado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123, após 24 horas de incubação.	81
Figura 19. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre o potencial transmembrânico em células PC-3 determinado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123, após 48 horas de incubação.	82
Figura 20. Efeito dos budadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre as proteínas de controle da via da apoptose, PARP, caspases 8, 9, 3 ,7 e proteínas da família Bcl-2 (Bcl-xL, Bcl-2 e Bax).	84
Figura 21. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF-06) e bufalina (BUF-05) sobre o conteúdo de DNA nuclear de células PC3 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.	86
Figura 22. Efeito do bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre o conteúdo de DNA nuclear de células PC-3 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 48 horas de incubação.	87
Figura 23. Efeitos dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre ciclinas controladoras do ciclo celular.	88
Figura 24. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre a indução de dano ao DNA em células de câncer de próstata (PC-3) após 3 e 24 horas de incubação.	89
Figura 25. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina e bufalina sobre a fosforilação de H2AX em células PC-3 por citometria de fluxo após 3 (A) e 24 (B) horas de incubação.	90
Figura 26. Perfil de sensibilidade para os bufodienolídeos bufalina (BUF05) e 3-aceato de bufalina (BUF-06) indicados no painel da linhagem celular DT40 com deficiência em genes de reparo de DNA.....	92
Figura 27. Ensaio de clivagem de DNA mediado por Topoisomerase I.	94
Figura 28. Ensaio de clivagem de DNA mediado por Topoisomerase II.....	96

Figura 29. Docking molecular evidenciando a ligação entre porção de topoisomerase II α humana e o bufadienolídeo 3-acetato de bufalina.	98
Figura 30. Docking molecular evidenciando a ligação entre porção de topoisomerase II α humana e o bufadienolídeo bufalina.	99
Figura 31. Mecanismos de ação proposto para os bufadienolídeos bufalina e 3-acetato de bufalina.	120

LISTA DE SÍBOLOS E ABREVIATURAS

®	Marca registrada
ANOVA	Analysys of Variance (Análise de Variância)
APAF-1 apoptótica)	Apoptotic Protease Activating Factor 1 (fator ativador de protease
BAK1	Bcl-2 homologous Antagonist/Killer
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 gene
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BCR-ABL	Cromossomo Philadelphia
BID	BH3 Interacting-domain Death Agonist
BIM	Bcl-2-lie Protein 11
CASPASE	<i>Cysteine-dependent aspartate-directed proteases</i>
CDK	Cyclin-dependent Kinase (quinase dependente de ciclina)
CKI ciclina)	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor (inibidor de quinase dependente de
CMSP	Células mononucleadas do sangue periférico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR epidermal)	Epidermal Growth Factor Receptor (receptor do fator de crescimento
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HTS	High Troughput Screening
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média (50%)
IC ₉₀	Concentração Inibitória 90%

INCA	Instituto Nacional do Câncer
MCL1	Myeloid Leukemia Cell differentiation protein
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Bomba de Sódio Potássio
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
PBS	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RPMI	Rosswell Parrk Memorial Institute Medium
TBS	Tris Buffer Solution (Tampão Tris)
TNF α	Tumor Necrosis Factor Alpha
TNSF10	Tumor Necrosis Factor Superfamily Member
Topo1	Topoisomerase I
Topo2	Topoisomerase II
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Induding Ligand
US-NCI Estados Unidos)	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (receptor do fator de crescimento endotelial vascular)
WHO	World Health Organization
$\Delta\Psi$	Potencial transmembrânico da mitocôndria

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Câncer: Estatísticas, Carcinogênese e novas terapias	19
1.2	Ciclo celular e o câncer	23
1.3	Importância da morte celular no controle do câncer	26
1.4	As topoisomerases como alvos de terapia anticâncer	30
1.5	Produtos naturais como fonte de compostos anticâncer	33
1.6	Metabólitos secundários de anfíbios como fonte de produtos naturais	35
1.7	Bufadienólídeos e suas propriedades anticâncer	36
1.8	O sapo <i>Rhinella schneideri</i>	39
2	OBJETIVOS	42
2.1	Objetivo geral:.....	42
2.2	Objetivos específicos:.....	42
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	Metodologia Experimental.....	43
3.1.1	Isolamento, identificação e modificação dos bufadienólídeos	43
3.1.2	Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	44
3.1.2.4	Teste do MTT	46
3.1.3	Estudo do mecanismo de ação	47
3.1.3.1	Viabilidade em tempo real por impedância	47
3.1.3.2	Análise da morfologia celular por coloração diferencial	48
3.1.3.3	Citometria de Fluxo.....	49

3.1.3.3.1	Determinação da integridade da membrana, densidade e morfologia celular	49
3.1.3.3.2	Determinação da Externalização da Fosfatidilserina – Anexina V	50
3.1.3.3.3	Análise do conteúdo e fragmentação de DNA (Ciclo Celular)	51
3.1.3.3.4	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial	52
3.1.3.4	Expressão de proteínas por Western Blot	52
3.1.3.5	Dano ao DNA	55
3.1.3.5.1	Ensaio do cometa	55
3.1.3.5.2	Marcação de H2AX fosforilado	58
3.1.3.5.3	Viabilidade celular em painel de células knockout para genes de reparo de DNA	60
3.1.3.5.4	Ensaio de Topoisomerase	61
3.1.3.5.5	Reações de Clivagem de DNA mediada por Topoisomerase I	61
3.1.3.5.6	Reações de Clivagem de DNA mediada por Topoisomerase II	62
3.1.3.5.7	Docking Molecular	62
4	RESULTADOS	64
4.1.	Avaliação da atividade citotóxica dos bufadienólídeos	64
4.2	Avaliação da atividade citotóxica dos bufadienólídeos em tempo real	65
4.3	Avaliação da viabilidade e morfologia de células PC-3 após tratamento com os bufadienólídeos	69
4.4	Avaliação da morfologia de células PC3 por coloração diferencial após tratamento com os bufadienólídeos	74
4.5	Determinação de externalização de fosfatidilserina	76
4.6	Efeito das amostras de bufadienólídeos sobre a despolarização mitocondrial em células de PC3	80
4.7	Efeito dos bufadienólídeos sobre as vias apoptóticas em células PC-3	82

4.7	Avaliação do efeito dos bufadienólídeos sobre o conteúdo de DNA nuclear de células PC3.....	84
4.8	Efeitos dos bufadienólídeos sobre ciclinas controladoras do ciclo celular.....	88
4.9	DANO AO DNA POR BUFODIENOLIDEOS.	88
4.9.1	Avaliação do pontencial de dano ao DNA pelo teste do cometa em células de próstata PC3	88
4.9.2	Avaliação da fosforilação de λH2AX em células de próstata PC3.....	89
4.9.3	Avaliação do envolvimento vias de reparo de DNA por bufadienólídeos.	91
4.10	ENSAIOS DE TOPOISOMERASE.....	93
4.10.1	Efeito dos bufadienólídeos sobre a clivagem de DNA mediado por topoisomerase I.....	93
4.10.3	Interações moleculares <i>in silico</i> à porção catalítica de topoisomerase II por Docking Molecular	97
5	DISCUSSÃO	101
6	CONCLUSÃO	121
7	REFERÊNCIAS BIBIOLOGRÁFICAS.....	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: Estatísticas, Carcinogênese e novas terapias

O câncer, considerado como um conjunto de doenças que afetam a proliferação celular, continua sendo a doença mais temida pela população em razão de sua alta incidência e elevadas taxas de mortalidade quando comparadas às doenças mais comuns (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). Com isso, o câncer tem alcançado grande relevância nas agendas políticas e técnicas de todas as esferas do governo. Um maior conhecimento sobre a doença permite estabelecer prioridades e direcionar recursos para a modificação desse cenário na população (INCA, 2015).

Atualmente, o câncer é a principal causa de morte em países desenvolvidos e a segunda principal nos países em desenvolvimento (NCI, 2017). Estudos epidemiológicos recentes sobre a incidência da doença mostram que tal risco poderia ser reduzido em até 40% caso houvessem alterações bruscas nos hábitos e estilo de vida da população em geral (LEE et al., 2011). Ainda assim, as estatísticas mais recentes revelam que os índices dessa doença só vêm aumentando com o tempo (INCA, 2015).

Nas últimas décadas, o câncer tem tomado uma dimensão maior, tornando-se um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que as mortes por câncer em todo o mundo continuariam aumentando com estimativa de 13,1 milhões de mortes e 20 milhões de novos casos para 2025. Porém, o maior efeito desse aumento deve acontecer em países de baixa e média renda (STEWART; WILD, 2014).

É possível observar que alguns tipos de cânceres como o de colo do útero e de estômago ainda estão relacionados com países em condições econômicas menos favoráveis. Entretanto, existe ainda um perfil de prevalência de alguns tipos de cânceres como próstata, mama e intestino em países em desenvolvimento. (INCA, 2015).

Dados do INCA (2015) estimam que até o final de 2017 ocorreram cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil. Dentre esses novos casos, aproximadamente 180 mil serão de câncer de pele não melanoma, e excetuando-se esse tipo, os mais prevalentes serão os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres. Ao se analisar os demais tipos mais

frequentes em homens temos os cânceres de pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%) como os mais prevalentes. Nas mulheres, os cânceres de intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os principais (**Figura 1**). É de extrema importância que o monitoramento da morbimortalidade se incorpore na rotina de

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma*

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%	Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%	Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%	Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%	Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

gestão da saúde no intuito de se estabelecer ações de prevenção e controle da doença.

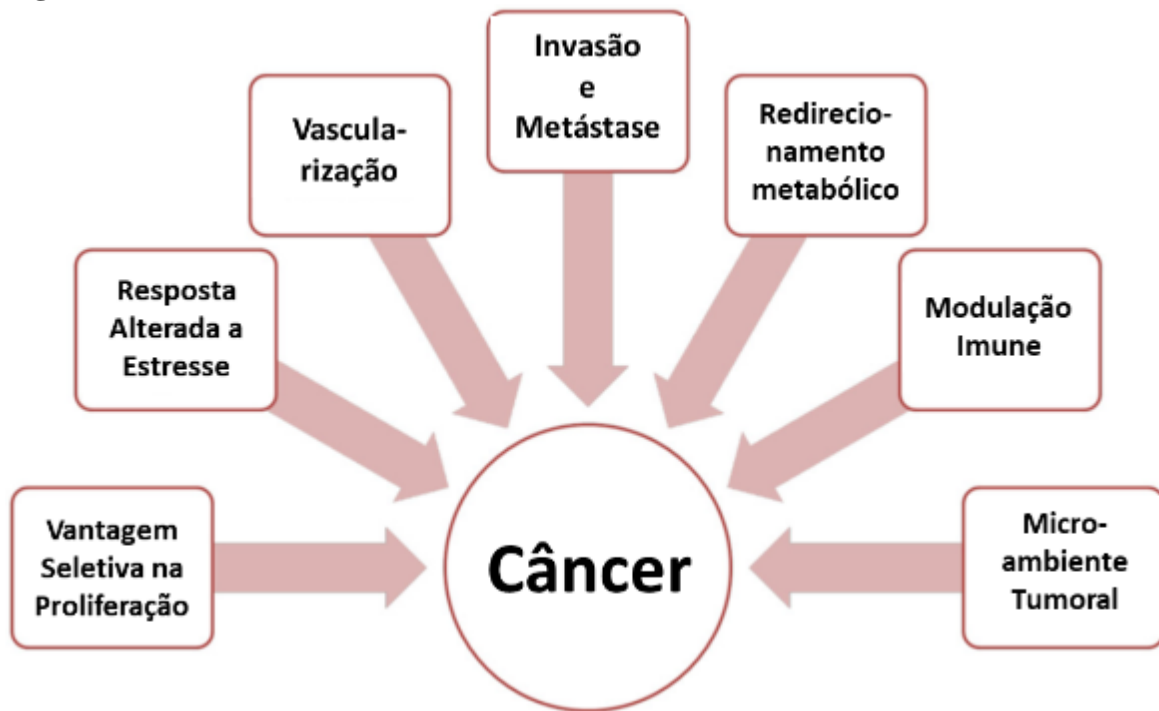
Adaptado de INCA, 2015

O processo de carcinogênese acontece lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável. Existem três estágios para a formação do câncer: estágio de iniciação (ocorrem mutações ainda não detectáveis por efeito de agentes carcinogênicos), estágio de promoção (o contínuo contato com carcinógenos promove a formação de células malignas) e estágio de progressão (caracterizado por multiplicação descontrolada, evoluindo até o surgimento das manifestações clínicas) (De Almeida, et al. 2005).

As últimas quatro décadas presenciaram um grande avanço no conhecimento da patogênese do câncer. Entre as características clássicas de um tumor maligno podemos citar a auto-suficiência da sinalização dos fatores de crescimento, insensibilidade à inibidores do crescimento, inibição da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese, poder de invasão celular e capacidade de metastatizar-se (HANAHAN; WEINBERG, 2000; LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009). Recentemente, essas características foram revisadas por Fouad & Aanei (2017). Estes autores utilizaram novas teorias em relação a carcinogênese, algumas características foram revisitadas bem como outras foram acrescentadas, mas também levaram em conta as mudanças e sugestões promovidas na segunda versão do artigo clássico “*Hallmarks of cancer*” por Hanahan & Weinberg (2011). Tais autores, seguindo a teoria

do campo de organização de tecido (TOFT,) a qual postula que o câncer é uma doença com origem nos tecidos, onde os carcinógenos e as mutações alteram as interações normais entre diversos componentes de um órgão, como o estroma e o epitélio adjacente. Essas alterações acumuladas levariam ao surgimento de uma massa de células tumorais (SONNENSCHNEIN; SOTO, 2016). Assim, tendo em vista o avanço da oncologia em geral, definiu-se os novos marcos do câncer que seriam: vantagem seletiva na proliferação, alteração na resposta à estresses,

Figura 2. Os novos marcos do câncer.



vascularização, invasão e metástase, redirecionamento metabólico, modulação do sistema imune e microambiente tumoral (**Figura 2**) (FOUAD; AANEI, 2017).

Fonte: adaptado de Fouad & Aanei (2017)

Os fatores de risco do câncer podem ter origem no meio ambiente ou podem ser hereditários. Grande parte dos casos tem relação com o meio ambiente, onde se encontra o maior número de fatores de risco como o meio ambiente em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (quando insalubre), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida) e o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos) (De Almeida et al., 2005).

Existem três tipos clássicos de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores com eficácia, e se não houver metástase, a cura. A radioterapia (geralmente raios gama, radioisótopos como cobalto-60

e raios-X) é usada comumente em conjunto com a cirurgia, como incremento da eficiência do tratamento. Mesmo isoladamente, a radioterapia pode diminuir tumores grandes, diminuir a recorrência e a chance de metástase, sendo uma metodologia antineoplásica muito usada (Murad & Katz, 1996). A quimioterapia tem como objetivo primário destruir as células neoplásicas, preservando as normais. No entanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Porém, o corpo recupera-se desses inconvenientes após o tratamento, e o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável (Katzung, 2013; Murad & Katz, 1996).

As terapias moleculares alvo dirigidas representam um significativo avanço no tratamento do câncer. Elas incluem drogas como imatinib, um inibidor da tirosina quinase BCR-ABL, o que tem feito a leucemia mieloide aguda uma doença com melhor prognóstico, e inclui ainda inibidores de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFR), como o sunitinib, sorafenib e bevacizumab, usados em câncer de rim e cólon. Outros tratamentos importantes baseados em alvos tumores-específicos estão agora em uso como os inibidores do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (gefitinib, erlotinib) usado no tratamento de câncer de pulmão, e o inibidor de Her2 trastuzumab usado no câncer de mama (PALUMBO et al., 2013). Essas novas drogas têm como alvos um ou no máximo alguns poucos produtos de oncogenes, que geralmente não são encontrados em células saudáveis. Em um contexto terapêutico, a ação desses agentes pode de fato ser eficientemente dirigida às células malignas sem poucos efeitos nas células normais comum na quimioterapia citotóxica. No entanto, com o passar do tempo, a heterogenicidade genética dos tumores aumenta, causando resistência a esse tipo de tratamento. As células resistentes, por sua vez, promovem a emergência de doença ainda mais agressiva, através da expansão e evolução clonal (BLOCK et al., 2015). Nesse sentido, a busca por novas moléculas e o uso de novas abordagens, que garantam o efeito inibidor de mais de uma via oncogênica, ainda é bastante válida.

Muitas das novas terapias descritas como “personalizadas” direcionam os pacientes para terapias mais eficazes, uma vez que o tumor do paciente é examinado para a busca de mutações alvo específicas. Visto num contexto maior de variação biológica individual, o ataque à mutações específicas seriam apenas um pequeno grau de personalização. Os tratamentos personalizados, de

fato, incluem uma avaliação muito mais abrangente da genética e dos fatores do estilo de vida, como alimentação, comportamento e exercícios físicos, junto com outras variáveis. Tal abordagem para o tratamento personalizado pode ser encontrada na prática sistemática da medicina integrativa, que possui um papel importante no desenvolvimento de um modelo de terapia oncológica de amplo espectro. Nesse sentido, essa abordagem enfatiza terapia mais centrada no paciente, onde um tratamento de múltiplas intervenções, que abordam toda a gama de influências físicas, mentais, emocionais e ambientais, utilizando terapias que incluam dietas, atividades físicas e acompanhamento psicológico em adição às terapias convencionais dando suporte a uma saúde melhorada como um todo (GULLETT et al., 2011; BLOCK et al., 2015).

Apesar do sucesso de novas terapias no tratamento do câncer, a busca por novos quimioterápicos tendo como alvo uma ou mais vias oncogênicas continua sendo relevante, uma vez que os tratamentos tradicionais existentes ainda possuem diversas limitações.

1.2 Ciclo celular e o câncer

Os organismos multicelulares necessitam de um controle adequado da divisão e diferenciação celular para coordenar a formação de vários tipos celulares bem como os tecidos e suas funções específicas. O ciclo celular promove a transdução altamente regulada dos sinais mitóticos para uma série de vias bioquímicas que controlam a duplicação do DNA e a segregação apropriada para as células filhas (MALUMBRES, 2011).

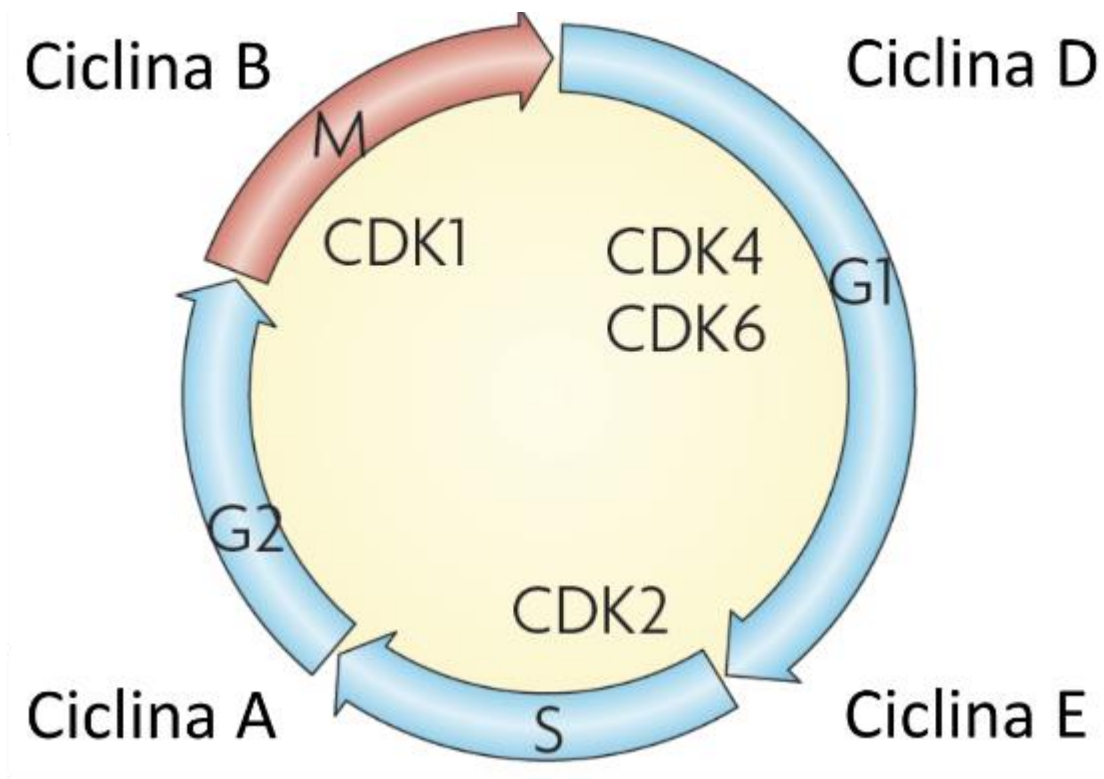
O ciclo celular é controlado por um mecanismo autônomo operado por um pequeno número de enzimas chamadas de quinases dependentes de ciclina (CDKs do inglês *cyclin-dependent kinases*) cuja a função é controlar precisamente os dois passos principais citados acima. A atividade oscilante das CDKs nas diferentes fases do ciclo celular resulta nos eventos de fosforilação, quando das associações entre essas quinases e seus cofatores específicos como as ciclinas e os inibidores de CDK (CKIs). As ciclinas possuem papel dual como ativadores e como agentes de alvos específicos, e as CKIs agem tanto como componentes estruturais como inibidores (BENDRIS; LEMMERS; BLANCHARD, 2015).

Um grande número de estudos em levedura e outros organismos tem levado a um modelo onde as quinases do ciclo celular agem como os grandes motores que promovem a progressão por todas as diferentes fases do ciclo celular. Estas fases incluem dois períodos maiores de atividade

no qual o genoma é primeiramente duplicado (Fase S) e os dois novos genomas são então distribuídos entre as células filhas (fase Mitótica). Dois outros períodos adicionais, G1 (antes da fase S) e G2 (antes da mitose), são necessários para coordenar a síntese de DNA e sua segregação com os sinais mitóticos para a síntese e montagem das proteínas e estruturas celulares necessárias. No intuito de assegurar a progressão apropriada por todas as fases do ciclo celular, tais maquinarias celulares estão sob o controle de pontos de checagem (*checkpoints*) internos que monitoram as condições ótimas para a geração de células filhas saudáveis (HARTWELL; WEINERT, 1989). Dessa forma o ciclo celular pode ser definido como o processo pelo qual as células monitoram as condições apropriadas para divisão celular, ativam as via bioquímicas necessárias para duplicação do DNA e segregação dos cromossomos, bem com monitoram todos esses passos para gerar duas células filhas com genomas perfeitos e estáveis (MALUMBRES, 2011).

De acordo com o modelo clássico do ciclo celular de mamíferos, complexos específicos de CDK-ciclina são responsáveis por promover vários eventos que ocorrem durante a interfase de maneira bastante orquestrada (**Figura 3**). Por exemplo, os sinais mitóticos são notados primeiramente pela expressão das ciclinas do tipo D (D1, D2 e D3), que preferencialmente se ligam e ativam CDK4 e CDK6 durante G1, a fase do ciclo que as células se preparam para iniciar a síntese de DNA (MALUMBRES; BARBACID, 2001). A ativação desses complexos leva a inativação parcial das proteínas RB para permitir assim a expressão de ciclina E, que se liga e ativa CDK2 (HARBOUR et al., 1999). Os complexos formados por CDK2-ciclina E irão, futuramente, fosforilar as proteínas RB levando a sua completa inibição, o que acaba por permitir a divisão celular (LUNDBERG; WEINBERG, 1998). A disponibilidade de ciclinas E durante o ciclo celular é estritamente controlada e limitada aos estágios iniciais da síntese de DNA o que levou a acreditar que os complexos de CDK2-ciclina E eram essenciais no controle da transição G1/S (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008). A CDK2 é posteriormente ativada por ciclina A2 durante os estágios finais da replicação de DNA para iniciar a transição da fase S para mitose, um período conhecido como a fase G2. Finalmente, a CDK1 é ativada por ciclinas do tipo A no final da interfase para facilitar o começo da mitose. Após a ruptura do envelope nuclear, as ciclinas do tipo A são degradadas, o que facilita a formação dos complexos CDK1-ciclina B responsáveis pelo controle do ciclo celular durante a mitose (MALUMBRES; BARBACID, 2005).

Figura 3. Modelo clássico de ciclo celular em mamíferos.



Fonte: adaptado de Malumbres & Barbacid (2009)

Durante a mitose, o material genético replicado e os centrômeros são igualmente distribuídos entre duas células filhas. A CDK-1, ligada tanto a ciclina A como a ciclina B, é a chave mestra que controla a mitose, uma vez que controla os centrômeros e, por sua vez, o início da mitose. Os complexos ativos de CDK1 fosforilam mais de 70 substratos durante a fase G2 e início da mitose para ativação da separação dos centrômeros, ruptura do envelope nuclear, condensação dos cromossomos entre outros processos (MALUMBRES; BARBACID, 2005). Uma vez que os cromossomos estão condensados e alinhados à placa metafásica, a atividade de CDK1 é parada para permitir a separação das cromátides-irmãs durante a ativação da separase, uma protease que permite a diminuição da coesão entre as cromátides (MUSACCHIO; SALMON, 2007). A inativação de CDK1 é necessária, ainda, na descondensação dos cromossomos, e reconstrução do envelope nuclear e citocinese (POTAPOVA et al., 2006).

A homeostase de tecidos adultos é caracterizada por um *pool* de células tronco quiescentes que intermitentemente cedem células progenitoras com alta capacidade proliferativa. A quiescência é necessária para prevenir a exaustão prematura da capacidade das células tronco

adultas de repopular tecidos. Há evidências de que os complexos CDK-ciclinas, modulados por CKIs (inibidores), possam ser responsáveis pela manutenção do estado quiescente de diferentes populações de células troncos. Desta forma, a diminuição da atividade de CDKs pode resultar num defeito da homeostase de tecidos específicos, hiperativação de CDKs, que, por sua vez, podem favorecer o desenvolvimento tumoral induzindo divisões celulares não programadas em células tronco e até mesmo em células progenitoras (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

1.3 Importância da morte celular no controle do câncer

A morte celular está intimamente conectada com a vida de organismos multicelulares. O balanço entre morte, proliferação e diferenciação celular é crucial para manutenção da homeostase durante a toda vida. A morte celular programada é essencial para muitos processos fisiológicos, incluindo a formação de órgãos, renovação de células epiteliais e seleção de linfócitos. No entanto, a morte celular, que não faz parte de um desenvolvimento programado, é um sinal de estresse, injúria ou infecção e está relacionada ao dano tecidual e patogênese (PASPARAKIS; VANDENABEELE, 2015).

Os exemplos de morte celular podem ser classificados em dois ramos mutuamente exclusivos: acidental ou regulada. A morte celular acidental é causada por insultos severos como físicos (aumento de temperatura e/ou pressão), químicos (detergentes e variações extremas de pH) e mecânicos (ruptura), causando efeito imediato e é insensível à intervenções farmacológicas ou genéticas de qualquer tipo. Ao morrerem, células expostas a extremos insultos físico-químicos ou mecânicos podem liberar grande quantidade de componentes endógenos imunomoduladores que podem muitas vezes serem citotóxicos (GALLUZZI et al., 2014a).

Em contrapartida, a morte celular regulada envolve uma maquinaria molecular codificada geneticamente (GALLUZZI et al., 2014b). Desta forma, o curso da morte regulada pode ser alterado por meios farmacológicos e/ou genéticos. A morte regulada ocorre, ainda, de maneira mais lenta e é iniciada perante as tentativas falhas de restaurar a homeostase celular (FULDA et al., 2010).

Durante muitos anos a morte por apoptose era considerada a única forma de morte celular regulada, onde necrose era sempre vista como um processo não regulado de morte celular acidental. O termo apoptose foi introduzido por Kerr e colaboradores (1972) para descrever a

morte celular que ocorria em tecidos de mamíferos. Desde então, estudos em vários organismos modelos diferentes têm sido fundamentais para esclarecer os mecanismos e a regulação de apoptose bem como identificar os diversos papéis biológicos desse processo (SUZANNE; STELLER, 2013). A via apoptótica foi primeiramente caracterizada em *Caenorhabditis elegans*, onde a morte de células somáticas acontecia de forma incomum. Em outros organismos, incluindo insetos e mamíferos, a apoptose é regulada por vias epigenéticas e é também importante na remoção de células com potencial danoso. A apoptose pode, ainda, ter papel em uma série de eventos morfogênicos como, por exemplo, a formação das digitais nos dedos de espécimes humanos (ZAKERI; QUAGLINO; AHUJA, 1994).

Células em processos apoptóticos mostram uma série de mudanças físicas bem determinadas como a formação de *blebs* (prolongações aleatórias da membrana plasmática), permeabilização da membrana externa da mitocôndria, fragmentação de DNA, desintegração nuclear e eventualmente desintegração celular com a formação de corpos apoptóticos, que serão então fagocitados por células especializadas. Esses passos envolvem um programa molecular bastante conservado que leva à ativação das caspases, uma família de cisteína proteases que degrada diversos substratos para facilitar a limpeza de células em processo de morte (DIX; SIMON; CRAVATT, 2008; MAHRUS et al., 2008; CRAWFORD; WELLS, 2011).

As caspases estão presentes nas células saudáveis como precursores inativos (zimogênios) com pouca ou nenhuma atividade proteásica. No entanto, todos os estímulos que desencadeiam a apoptose parecem fazê-lo por iniciarem eventos que levam à ativação das caspases. Até o momento, três vias principais de apoptose associadas às caspases têm sido relatadas em mamíferos, e uma ou duas outras possíveis vias têm sido propostas, mas ainda de forma controversa. Independente do tipo de via as quais as caspases sejam ativadas, todas levam à ativação de três caspases efetoras principais, a caspases 3, 6 e 7, e são estas as responsáveis por realizar grande parte da proteólise vista durante a fase final de apoptose (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008a).

A apoptose pode ser iniciada por estímulos intracelulares (via intrínseca) ou extracelulares (via extrínseca). A apoptose intrínseca é caracterizada principalmente pela permeabilização da membrana externa da mitocôndria, um processo que resulta na liberação do citocromo c que, por sua vez, formará um complexo com APAF-1 (fator de ativação de apoptose 1) e pro-caspase 9 chamado apoptossomo. O apoptossomo promoverá então a ativação de caspase-9, que ativa a

caspase 3 e promove a efetivação da apoptose (OW et al., 2008). A permeabilização da mitocôndria requer obrigatoriamente a presença de dois membros da família de proteínas Bcl-2 (célula-B de linfoma 2), BAX (proteína X associada a Bcl-2) e BAK-1 (antagonista/killer 1 de Bcl-2), cuja sua atividade de formar poros na mitocôndria pode ser inibida por outros componentes da mesma família de proteínas, incluindo o próprio Bcl-2, Bcl-xL e MCL1 (CHIPUK et al., 2010). As interações físicas e funcionais entre os domínios pro- e anti-apoptóticos das proteínas Bcl-2 estão ainda sobre o controle da família de proteínas conhecida como BH3, incluindo PUMA, BIM e BID (REN et al., 2010).

O termo “apoptose extrínseca” tem sido usado extensivamente para indicar exemplos de morte celular apoptótica que são induzidas por sinais de estresse extracelulares captados e propagados por receptores transmembrânicos específicos (GALLUZZI et al., 2012). A apoptose extrínseca pode ser iniciada pela ligação à componentes letais tais como FAS/CD95 (FASL/CD95L), fatores de necrose tumoral (TNF α), TNFSF10 ou TRAIL, a vários outros receptores (WAJANT, 2002). A iniciação dessa via leva a ativação de caspase 8 que em alguns tipos de célula pode levar à ativação direta de caspase 3, que por sua vez leva a efetivação da apoptose, e/ou a clivagem de BID que sinalizará ativação da via intrínseca de apoptose (SRINIVASULA et al., 1996; YIN et al., 1999).

Apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência a apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos. De fato, a análise do processo de tumorigênese revela que a capacidade de resistir à morte pode ser adquirida por diferentes mecanismos e acontecer em vários momentos do desenvolvimento tumoral. Desta forma, a apoptose tornou-se, na prática clínica, um alvo potencial do uso terapêutico da morte celular programada ou para compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e quimioterapia (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

Tradicionalmente, a necrose tem sido considerada como um processo não-regulado e independente de apoptose. No entanto, estudos recentes têm demonstrado novos mecanismos com características tanto de apoptose como de necrose, desafiando a ideia de processo não-regulado. O termo “necrose regulada” foi proposto pelo Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (NCCD, do inglês *Nomenclature Committee on Cell Death*) para classificar esses mecanismos (GALLUZZI et al., 2012, 2014a). A necrose regulada ocorre em resposta a inúmeras injúrias celulares como dano ao DNA, exposição a certas toxinas ou patógenos, a ligação de

alguns componentes à receptores de membrana ou exposição à espécies reativas de oxigênios (EROS) (VANLANGENAKKER et al., 2012). No entanto, é preciso levar em conta que esses “gatilhos” não são exclusivos da necrose programada, e podem, dependendo do contexto celular, induzir outros tipos de morte celular como a apoptose.

Vander Berghe e colaboradores (2014) definem necrose regulada como uma morte celular geneticamente controlada que eventualmente resulta em extravasamento celular e é morfológicamente caracterizada pela granulação bem como inchaço celular (oncoses). Vários subtipos de necrose programada como necroptose, parthanatos, ferroptose, autose, netose e piroptose compartilham essas mesmas características, mas os estímulos que as iniciam e as vias moleculares envolvidas são diferentes (VANDEN BERGHE et al., 2014). Piroptose e necroptose são os dois tipos mais caracterizados de necrose programada. A piroptose é tipo de morte celular inflamatória induzida pela ativação do inflamassoma (complexo proteico oligomérico do sistema imunitário inato) e tem papel importante na defesa contra parasitas (LAMKANFI; DIXIT, 2014). A necroptose, por sua vez, é mediada por RIPK3 e MLKL e estudos recentes sugerem que esse tipo de morte tem funções importantes na patogênese de diversas doenças humanas (PASPARAKIS; VANDENABEELE, 2015).

Outro tipo de morte importante a ser levada em consideração é a autofagia, um sistema de degradação intracelular altamente conservado entre eucariotos (MIZUSHIMA; YOSHIMORI; OHSUMI, 2011). O termo morte celular autofágica tem sido bastante utilizado para exemplos de morte celular acompanhados por uma grande vacuolização citoplasmática e que culmina com degradação lisossomal (GALLUZZI et al., 2017). A característica principal desse tipo de morte é a formação de uma estrutura de membrana dupla chamada de autofagossomo. Durante determinado estímulo, como por exemplo a privação de alimento, uma porção do citoplasma incluindo proteínas e organelas é confinada dentro do lumen do autofagossomo. Esses conteúdos internos são, então, degradados por hidrolases quando da fusão de um autofagossomo e um lisossomo (NODA; INAGAKI, 2015). Do ponto de vista bioquímico, todos os casos de morte celular que exibem marcadores de autofagia como a lipidação de LC3/Atg8 (proteína1 de cadeia leve 3) ou aumento da degradação de substratos autofágicos como SQSTM1 (sequestrossomo 1) são caracterizados como autofagia (GALLUZZI et al., 2012).

No passado, muitos pesquisadores chegaram a definir catástrofe mitótica como o caso de morte celular que acontecia durante a mitose (RONINSON; BROUDE; CHANG, 2001;

VAKIFAHMETOGLU; OLSSON; ZHIVOTOVSKY, 2008). Tendo em vista estudos recentes de diversos grupos de pesquisa indicando que as aberrações mitóticas eram capazes de induzir senescência, e que por sua vez a morte celular poderia acontecer por vias apoptóticas e necróticas, foi proposto uma nova definição e categorização da catástrofe mitótica baseada puramente nas suas considerações funcionais (VITALE et al., 2011). Dessa maneira, a catástrofe mitótica não seria caracterizada como um mecanismo executor de morte celular, mas sim um mecanismo oncosupressivo que é iniciado por perturbações no aparato mitótico, é iniciado durante a fase M do ciclo celular, em paralelo com algum grau de parada mitótica e que, por último, pode encadear um processo de morte celular ou senescência (GALLUZZI et al., 2012).

Apesar de muitas vezes não ser considerada um tipo de morte celular *per si*, a catástrofe mitótica induzida por agentes antimitóticos tem sido usada na terapia do câncer. Drogas estabilizadoras de microtúbulos, como os taxanos: paclitaxel e docetaxel, são usadas no tratamento de câncer de mama, ovário, pulmão e próstata. Enquanto que as drogas desestabilizadoras, como os alcaloides da vinca: vimblastina e vincristina, são usados para tratar cânceres hematológicos (SALMELA; KALLIO, 2013; MC GEE, 2015). Assim, a indução de catástrofe mitótica é, também, uma estratégia eficiente na terapia do câncer.

1.4 As topoisomerases como alvos de terapia anticâncer

As topoisomerases são essenciais para resolver os problemas topológicos associados com a estrutura de dupla hélice do DNA e a necessidade de separação das fitas durante a replicação semi-conservativa (WATSON; CRICK, 1953). Diveros estudos mostraram que as topoisomerases participam em vários outros processos importantes incluindo transcrição, manutenção da estrutura e segregação dos cromossomos (WANG, 2002). O estudo acerca das topoisomerases se tornou o foco dos farmacologistas após a descoberta de que uma classe altamente efetiva de drogas com atividades antibióticas e anticâncer tinham como mecanismo de ação a inibição das topoisomerases (NITISS, 2009; POMMIER et al., 2010a). Recentemente, as topoisomerases têm ganhado importante destaque em vários outros processos celulares com implicações no câncer e doenças neuronais.

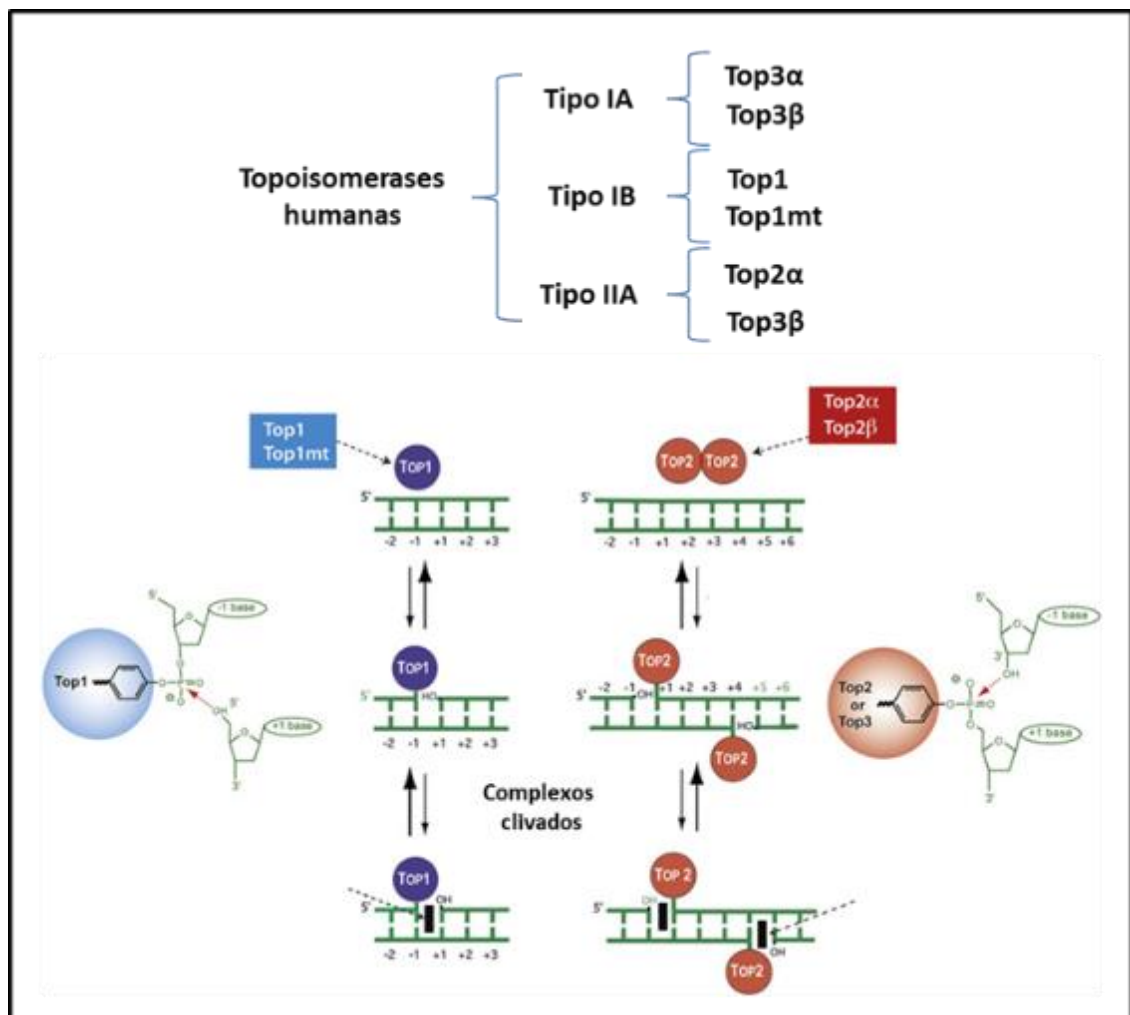
Todas as topoisomerases, independente da classe, clivam a fita do DNA por ataque nucleofílico de um resíduo de tirosina do sítio ativo da enzima ao grupo fosfato do DNA,

desfazendo a ligação fosfodiéster que une os nucleotídeos. O corte da fita do DNA permite a sua movimentação, sob o controle da enzima, que é responsável por reduzir a tensão sobre a molécula. Em seguida, a topoisomerase religa a fita, agora relaxada, garantindo a integridade do mate

rial **Figura 4.** Topoisomerases humanas e seus mecanismos de ação.

gené

tico. É importante registrar que a ligação da enzima com o DNA é de natureza covalente (POMMIER et al., 2010b)(**Figura 4**).



Fonte: adaptado de Pommier et al. (2010)

A principal diferença entre os tipos I e II da enzima está relacionada ao modo de clivagem da fita do DNA (**Figura 4**). As topoisomerases tipo I clivam somente uma fita de DNA por vez a qual é imediatamente relaxada e religada. Já, as topoisomerases tipo II clivam, simultaneamente,

as duas fitas de DNA antes da religação, e assim possuem a capacidade de promover o relaxamento do DNA super-enovelado (POMMIER et al., 2010).

As seis topoisomerasas das células humanas têm papéis especializados para manutenção dos genomas nuclear e mitocondrial. Por exemplo, a segregação dos cromossomos tem necessidade imprescindível de Top2 α , enquanto que Top2 β é importante na diferenciação de células quiescentes, especialmente as células neuronais. Estudos recentes tem revelado que todas as topoisomerasas humanas tem funções específicas, e que especialmente durante a transcrição, essas enzimas podem ter funções até então não relatadas. (POMMIER et al., 2016).

As topoisomerasas agem introduzindo quebras temporárias de DNA usando um mecanismo de transesterificação, que minimizam os riscos à estabilidade do genoma. Todavia, agora é estabelecido que as topoisomerasas podem tanto assegurar como desproteger a integridade do genoma. Estudos mostram que as drogas anticâncer, que possuem a Top2 como alvo, induzem translocação do genoma, que podem levar à tumores secundários, e trabalhos mais recentes sugerem que Top2 β pode ser responsável por esses efeitos. Outros estudos revelaram que Top1 pode promover instabilidade do genoma por agir nos sítios endógeno e exógeno de dano ao DNA, uma vez que as topoisomerasas conseguem gerar complexos de clivagem estáveis que podem gerar quebra de fita do DNA comprometendo, assim, a estabilidade do genoma.

Na década de 1980, foram desenvolvidos vários fármacos anticâncer que interferiam no ciclo catalítico de enzimas topoisomerasas humanas. Como exemplo, podemos citar a doxorubicina, o etoposídeo e a camptotecina que até hoje são utilizados para o tratamento de pacientes com câncer. Desde então, as topoisomerasas se destacaram como novo alvo terapêutico e passaram a fomentar a pesquisa de novos fármacos anticâncer em todo o mundo (CUMMINGS; SMYTH, 1993). Os fármacos anticâncer que têm a topoisomerase como alvo, geralmente, estabilizam os complexos de DNA formado pelas topoisomerasas ou interferem no próprio sítio catalítico da enzima. O primeiro tipo é chamado de '*poison*', pois promovem a formação de várias quebras na fita do DNA. Já o segundo tipo, é chamado de inibidor catalítico e simplesmente inibe a porção ATP-ase da enzima o que causa seu não funcionamento (POMMIER et al., 2010).

Muitos estudos têm demonstrado o uso de inibidores de reparo do DNA associado ao uso de inibidores de topoisomerase. As quebras de fita de DNA produzidas pela inibição por '*poisons*' são removidas por tirosil-DNA fosfodiesterases. Tais quebras de fita podem ser

parcialmente responsáveis pela morte celular e, desta forma, a inibição dessas fosfodiesterases podem potencializar o processo de morte. Assim, é possível criar tratamentos mais específicos para as células tumorais, uma vez que as células tumorais não possuem mecanismos de reparo de DNA capazes de resolver danos severos ao DNA (POMMIER, 2007). Os compostos capazes de inibir ambas as enzimas (topo I e II) são uma outra importante estratégia. Desta forma, o tratamento pode se tornar mais efetivo, uma vez que a inibição de uma das enzimas promove, geralmente, super-expressão da outra enzima (SALERNO et al., 2010). Ainda, baseado no potencial das topoisomerases como alvo terapêutico do câncer, apesar das dificuldades a serem superadas, como os mecanismos de resistência, por exemplo, muitos trabalhos têm sido publicados demonstrando a ação inibitória de diversos compostos sobre essas enzimas. Nesses estudos, observa-se a utilização de DNA isolado submetido a uma corrida eletroforética na presença da enzima e dos compostos-testes (ADJEI et al., 1998; HOLDEN, 2001; OPPEGARD et al., 2009).

1.5 Produtos naturais como fonte de compostos anticâncer

Desde os tempos pré-históricos, a humanidade tem usado produtos naturais oriundos de plantas, animais, microrganismos e organismos marinhos em suas medicinas como forma de aliviar e/ou tratar doenças. De acordo com os registros fósseis, o uso de plantas por seres humanos pôde ser identificado a pelo menos 60 mil anos atrás (SHI et al., 2010). O uso de produtos naturais como medicina deve, é claro, ter representado um grande desafio para as civilizações mais antigas. É muito provável que durante a busca por comida, nossos antepassados tenham consumido plantas venenosas, que causavam vômitos, diarreia, coma, outras reações tóxicas e talvez até morte. No entanto, dessa maneira, a humanidade foi capaz de desenvolver conhecimento sobre quais materiais eram bons para consumo ou para uso medicinal. Com o passar do tempo, a humanidade inventou o fogo, aprendeu a produzir álcool, criou religiões, e fizeram diversos avanços tecnológicos até aprenderam como desenvolver remédios (YUAN et al., 2016).

A era das “drogas modernas” teve início no começo do século XIX. Em 1805, o composto farmacologicamente ativo da morfina foi isolado pelo jovem farmacêutico alemão Friedrich Serturmer (HAMILTON; BASKETT, 2000). A partir daí, vários outros compostos ativos têm sido

isolados de plantas e, entre eles, muitos mantiveram o seu uso tradicional. Mais tarde, o desenvolvimento das técnicas para formulação de compostos sintéticos levou a uma diminuição da importância dos produtos naturais. No entanto, os produtos naturais ainda são importantes para o desenvolvimento de novas drogas. Algumas áreas da medicina, como anticâncer, anti-hipertensiva, entre outros, têm se beneficiado bastante do arsenal de produtos naturais (JOO, 2014; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Os compostos oriundos de produtos naturais evoluíram durante milhões de anos e possuem uma diversidade química única que, por sua vez, resulta na grande variedade de suas atividades biológicas (GALM; SHEN, 2007). Consequentemente, eles têm sido empregados com sucesso na descoberta de novos fármacos e têm exercido grande impacto também na bioquímica (HONG, 2011). No último século, a alta diversidade estrutural dos produtos naturais tem sido estudada também na perspectiva da físico-química. Sua eficácia é relacionada à complexidade de suas propriedades químicas bem organizadas, que confere muitas vantagens em termos de eficácia e seletividade de seus alvos moleculares (YUAN et al., 2016).

Entre as drogas anticâncer aprovadas entre 1940 e 2014, cerca de 62% foram derivadas ou inspiradas em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016). Por exemplo, os alcaloides da vinca oriundos de *Catharanthus roseus* e o taxano paclitaxel de *Taxus brevifolia* estão entre os fármacos de sucesso oriundo de plantas (LI-WEBER, 2009). Os alcaloides da vinca, incluindo a vincristina, foram aprovados como quimioterápico em 1963 nos Estados Unidos e atuam desestabilizando β -tubulina o que impede a formação dos microtúbulos (JANSE VAN VUUREN et al., 2015). O paclitaxel foi aprovado em 1992 para o tratamento de câncer de ovário e dois anos após para o tratamento de câncer de mama metastático. O paclitaxel também age nos microtúbulos atrapalhando a dinâmica do fuso mitótico, que culmina com a inibição de mitose e indução de apoptose em células tumorais (KHANNA; ROSENBERG; VAIL, 2015).

Durantes os últimos 50 anos, tem surgido uma grande diversidade de fármacos graças ao uso de metodologias de *high-throughput screening* (prospecção em larga escala) e o avanço da química combinatória e, ainda assim, os produtos naturais e seus derivados continuam a ter grande importância nas farmacopeias. Das cercas de 250 a 500 mil espécies de plantas reconhecidas, apenas uma pequena porção foi estudada na busca de compostos bioativos. Portanto, existe um grande potencial para futuras descobertas oriundas de plantas e outros produtos naturais (NGO; OKOGUN; FOLK, 2013).

As medicinas tradicionais, como por exemplo a medicina tradicional chinesa, fazem uso principalmente de produtos naturais e são a forma mais antiga de medicina no mundo usada para prevenção e tratamento de doenças físicas e mentais. A medicina tradicional é também conhecida como um método complementar e alternativo e ainda hoje tem papel importante em vários países (ABDULLAHI, 2011). Na China, por exemplo, as medicinas tradicionais são uma parte inseparável do sistema de saúde e vem ao longo dos anos ganhando respaldo inclusive da medicina ocidental (DOBOS et al., 2005).

Apesar do uso extensivo de produtos naturais oriundos de plantas, a medicina tradicional chinesa também faz o uso de produtos de origem animal. Cerca de 13% da medicina chinesa provém de animais e, ao contrário das ervas medicinais, tais produtos não tem sido estudados com o mesmo afinco (STILL, 2003). Dentre os produtos naturais de origem animal, os anfíbios possuem um rico arsenal de substância químicas que formam parte integral do seus sistemas de defesa e também ajudam na regulação fisiológica da derme (LU; NAN; LEI, 2008).

1.6 Metabólitos secundários de anfíbios como fonte de produtos naturais

Os anfíbios estão mundialmente distribuídos e podem ser encontrados em todos os continentes, exceto na Antártica (CLARKE, 1997). Brasil e Colômbia possuem o maior número de espécies, 789 e 642, respectivamente. A China possui cerca de 335 espécies de anfíbios, sendo o país com maior número de espécies no Velho Mundo, o que justifica o uso desses animais em sua medicina tradicional (WAKE; VREDENBURG, 2008). Dentre os anfíbios, os sapos são os seres com maiores contribuições para a medicina humana. Existem cerca de 34 gêneros e 410 espécies de sapos em todo o mundo (YANG et al., 2015).

A habilidade dos anfíbios de viver em ambientes bastante diferentes pode estar atribuída à evolução de várias adaptações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais. Os principais mecanismos de adaptação fisiológica estão relacionados à pele, o que certamente desempenhou um papel importante na prevenção da desidratação e permitiu a evolução e adaptações sistemáticas dos sapos. Além disso, a pele dos anfíbios tem outras funções como regulação da respiração, transporte de água e solutos, pressão sanguínea, temperatura corporal e produção de compostos com atividade antibiótica para proteção desses animais contra bactéria, vírus, fungos e predadores (CLARKE, 1997). Dessa forma, a pele de sapos possui um rico

arsenal de compostos químicos que permitiu a sobrevivência e permanência desses animais nos ambientes terrestres. Muitos desses compostos são sintetizados por glândulas que se encontram por toda a pele dos sapos. Em espécies do gênero *Bufo*, glândulas exócrinas multicelulares estão localizadas atrás dos olhos e são conhecidas como glândulas paratóides. As glândulas paratóides são sítios de síntese de diversos compostos químicos que promovem proteção contra infecções de bactérias e fungos, sendo divididas em quatro categorias principais: amins biogênicas, bufodienolídeos, alcalóides, peptídeos e proteínas. (Bettin & Greven, 1986; Cevikbas, 1978; Daly *et al.*, 1987). (DALY *et al.*, 2004).

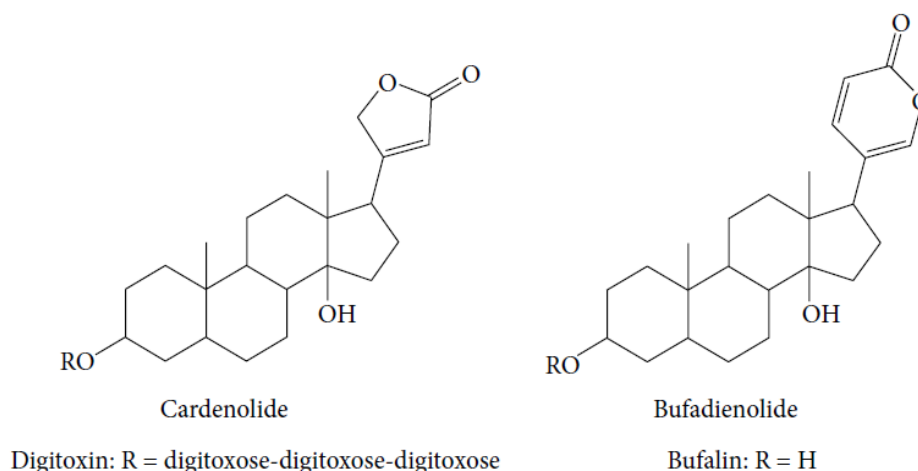
1.7 Bufadienolídeos e suas propriedades anticâncer

Os bufadienolídeos foram originalmente encontrados na pele e glândulas paratóides de sapos da família Bufonidae, mas depois sua existência foi comprovada em plantas angiospermas, artrópodes e até em mamíferos. Os componentes químicos e as propriedades farmacológicas das secreções das glândulas paratóides de sapos da família Bufonidae tem sido estudada há muito tempo (CHEN; CHEN, 1933). Diversas culturas asiáticas, em especial os chineses, fazem uso de secreções de pele de sapos em seus preparos medicinais (KRENN; KOPP, 1998). Um dos mais conhecidos é o Chan'Su, um extrato seco preparado da pele de *Bufo bufo gargarizans* e *Bufo melanostictus*, sendo utilizado em várias regiões da China e outros países asiáticos devido suas propriedades anestésica, anti-inflamatória, cardiotônica, diurética, hemostática, dentre outras. A bufalina e a cinobufagina são os bufadienolídeos mais importantes encontrados no Chan'Su e tem sido bastante utilizados clinicamente para o tratamento de câncer na China (STEYN; VAN HEERDEN, 1998)(YE *et al.*, 2004) (LI *et al.*, 2015).

Os glicosídeos cardíacos são, geralmente, encontrados em plantas sendo tradicionalmente usados como venenos de flecha, abortivos, eméticos, diuréticos e tônicos do coração. Compostos extraídos da planta *Digitalis purpurea*, como digitalis, digoxina e oleandrina são famosos exemplos dessa classe de compostos utilizados na insuficiência cardíaca. O potencial uso de glicosídeos cardíacos no tratamento do câncer, investigado cerca de 40 anos atrás, foi deixado de lado devido à alta toxicidade desses compostos. No entanto, estudos recentes sugeriram que a apoptose produzida por digitalis em células tumorais humanas ocorriam a concentrações que não ofereciam toxicidade à humanos (NEWMAN *et al.*, 2008).

Os esteroides cardiotônicos, sinônimo de glicosídeos cardíacos, possuem estrutura semelhante a esteroides com um anel de lactona insaturado e, geralmente, uma porção de açúcar. Os que possuem a lactona 2-furanona são classificados como glicosídeos cardíacos e os que possuem a lactona 2-pirona são classificados como bufadienólídeos (**Figura 5**) (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2014). Além disso, todos os bufadienólídeos possuem 24 carbonos relacionados à forma livre do colesterol ou conjugado sulfatos, ésteres dicarboxílicos e aminoácidos no carbono C-3 (STEYN; VAN HEERDEN, 1998).

Figura 5. Estrutura química dos glicosídeos cardíacos.



A estrutura básica dos cardenólídeos e bufadienólídeos e estruturas do cardenólídeo digitoxina e o bufadienólídeo bufalina são mostrados.

Cerca de 250 bufadienólídeos já foram identificados em plantas (*Crassulaceae*, *Hyacinthaceae*, *Iridaceae*, *Melanthaceae*, *Ranunculaceae* e *Santalaceae*) e animais, como os sapos *Rhinella* (previamente *Bufo*), *Rhaebo* e *Peltophryne*, cobras (*Rhabdophis tigrinus*) e artrópodes (*Photinus*) (KRENN; KOPP, 1998; CUNHA-FILHO et al., 2010; FERREIRA et al., 2013a; PERERA CÓRDOVA et al., 2016). A grande variedade dos compostos conhecidos diferem apenas nas posições e substituições de alguns radicais (MENG et al., 2001; GAO et al., 2011). As relações estrutura atividade mostraram ações cardiotônicas (LICHTSTEIN et al., 1991; HAUCK; FRISHMAN, 2012), antivirais (KAMANO et al., 1988; WANG et al., 2011), citotóxicas (CUNHA-FILHO et al., 2010; GAO et al., 2011; FERREIRA et al., 2013a; SCIANI et al., 2013) bactericidas (CUNHA FILHO et al., 2005), antiparasitárias (TEMPONE et al., 2008), inseticidas (SUPRATMAN et al., 2000), antiangiogênicas, hipertensivas e imunossupressivas

(CUNHA-FILHO et al., 2010). Grande parte dos efeitos citados acima são consequência da inibição da bomba de sódio e potássio pelos bufadienolídeos.

A bomba de sódio e potássio ($\text{Na}^+/\text{K}^+\text{Atpase}$) é uma proteína de transmembrana encontrada em todos os eucariotos superiores e age mantendo o balanço iônico e osmótico das células. Recentemente, foi reconhecida como importante sinalizador de várias vias celulares, mas seu papel farmacológico mais importante diz a respeito à sua inibição que aumenta a força contrátil do miocárdio em condições patológicas como a insuficiência cardíaca. Atualmente, além do aumento da força contrátil, tem-se aumentado o uso de inibidores de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ com ação anticâncer em vários tecidos tumorais como próstata, mama, pulmão e leucemia (ALEVIZOPOULOS et al., 2014).

Vários estudos mostram que as secreções de pele obtidos das espécies de sapo *Rhinella crucifer*, *R. major*, *R. schneideri*, *R. margaritifera*, *Phyllomedusa hypocondrialis* e *Rhaebo guttatus* são uma ótima fonte de bufalina, telocinobufagina, hellebrina e cinobufagina. Tais bufadienolídeos são capazes de reduzir os níveis das proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, a viabilidade celular, a síntese de DNA e provoca diversas mudanças morfológicas em células de câncer de mama (MDA/MB-231 e MCF-7) (YEH et al., 2003; SCIANI et al., 2013). O *Chan'Su* é extensamente usado na medicina tradicional chinesa para o tratamento de diversos tipos de câncer. Esse extrato é capaz de diminuir a viabilidade celular, indução de apoptose, quebra de fita simples e dupla do DNA e surgimento de micronúcleos (LEE et al., 2014a). Dentre os vários bufadienolídeos já isolados e estudados em relação suas propriedades anticâncer, a bufalina e a cinobufagina ganham destaque.

A bufalina, em especial, é um dos bufadienolídeos mais estudados frente à diversas linhagens tumorais, como por exemplo células leucêmicas e de melanoma. A bufalina é capaz de induzir diferenciação em células leucêmicas K562, HL60, U937 e ML1 para monócitos ou células semelhantes a macrófagos (ZHANG et al., 1991; NUMAZAWA et al., 1994). Esses bufadienolídeos promovem ainda parada no crescimento de células ML1 na fase G2 do ciclo celular. Tais efeitos de bufalina em células leucêmicas é semelhante aos efeitos dos inibidores de topoisomerase e a bufalina já se mostrou capaz de reduzir o nível de topoisomerase II em células leucêmicas HL-60 (HASHIMOTO et al., 1997). A bufalina também foi capaz de reduzir a atividade catalítica de topoisomerase II em células de ovário de hamster (PASTOR et al., 2002). Tanto bufalina como cinobufagina são capazes de aumentar a concentração de cálcio intracelular

em várias linhagens de próstata por inibição da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ (YEH et al., 2003). A inibição da mesma enzima foi responsável também pelo efeito de diferenciação celular em K562 (NUMAZAWA et al., 1994). Em sua maioria os relatos envolvendo incubação por bufalina levam a indução de morte por apoptose por vias extrínseca e/ou intrínseca em diversas linhagens celulares tumorais (MASUDA et al., 1995; NASU et al., 2005a; ZHU et al., 2012; DING et al., 2014; CHEN et al., 2015b). No entanto, há relatos os quais bufalina promoveu morte do tipo autofágica (XIE et al., 2011a; HUANG, 2012; HSU et al., 2013; SHEN et al., 2014). Abrindo, dessa forma, o espaço para o possível envolvimento de outros tipos de morte celular por bufadienolídeos.

Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo, hellebrigenina, um bufadienolídeo extraído de *Rhinella schneideri*, mostrou ser capaz de diminuir o número de células viáveis por indução de apoptose e parada do ciclo celular em G2/M em células leucêmicas HL-60. A ausência de dano em DNA e estudos *in silico* indicou ainda a inibição catalítica de topoisomerase II (SOARES, 2013). Em outro estudo do nosso grupo, marinobufagina, isolada de *Rhinella marina*, apresentou resultados semelhantes de diminuição de células, apoptose e parada de células tumorais de próstata (PC-3) na fase G2/M do ciclo celular (LIMA, 2016).

1.8 O sapo *Rhinella schneideri*

A família Bufonidae possui cerca de 51 gêneros e 596 espécies distribuídas em todo o mundo, exceto Austrália, outras regiões da Oceania, deserto do Sahara, Madagascar, Artico e Antártica. Estudos moleculares e filogenéticos levaram recentemente a mudança nessa família e alguns táxons tiveram sua nomenclatura alterada. Por exemplo, Chaparro e colaboradores (2007) sugeriram que a maioria das espécies do gênero *Bufo* fossem colocadas no gênero *Rhinella*. No Brasil, a família Bufonidae é composta por sete gêneros e *Rhinella* é o mais representativo com cerca de 40 espécies. Os representantes desse gênero são conhecidos pelo nome popular de “sapo-cururu” (do Tupi *kuru'ru*, que significa sapo grande) (FROST et al., 2006; PRAMUK, 2006; DARREL R., 2016).

O anfíbio *Rhinella schneideri* (Werner, 1984) (**Figura 6**) da família Bufonidae, descrito primeiramente com nome de *Bufo paracnemis* (A. Lutz, 1925), é nativo da América do Sul e ocorre principalmente na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. Abrange grande parte

do Brasil, uma vez que ocorre do Ceará até Rio Grande do Sul e é conhecido popularmente como cururu e sapo-boi (BASTOS *et al.*, 2003; FROST, 2010; COCHRAN, 1955).

Figura 6. *Rhinella schneideri*.



Fonte: <http://calphotos.berkeley.edu>

A espécie *Rhinella schneideri* pertence a um grupo que congrega animais de grande porte possuindo membros curtos e coloração que varia de castanho-claro a escuro. Possui pele áspera com região dorsal bastante rugosa devido à presença de glândulas cutâneas (COCHRAN, 1995). Duas dessas, localizadas logo atrás dos olhos, são chamadas de glândulas paratóides e, atrás da tíbia estão, as glândulas paracnemis. Quando espremidas, as glândulas liberam veneno através de grandes poros, que, escorre pela pele do animal. O veneno possui bufotoxinas (bufadienolídeos), causando apenas pequenas irritações cutâneas em pessoas sensíveis, mas se ingerido, geralmente por cães, pode causar sérias complicações envolvendo os sistemas nervoso e circulatório (CARDOSO *et al.*, 2003; FROST, 2010; IUCN, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Estudar o mecanismo de ação dos compostos 3-acetato de bufalina (modificado) e bufalina isolados de *Rhinella schneideri*, bem como comparar seus efeitos em modelos *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos dos bufadienolídeos sobre a viabilidade de células tumorais e células normais;
- Determinar atividade citotóxica dos bufadienolídeos em tempo real utilizando células tumorais prostáticas (PC-3)
- Avaliar o efeito dos bufadienolídeos sobre a viabilidade e morfologia de células PC-3
- Avaliar o efeito dos bufadienolídeos sobre a externalização de fosfatidilserina, despolarização mitocondrial e participação das vias apoptóticas em células PC-3
- Avaliar o efeito dos bufadienolídeos sobre o conteúdo de DNA nuclear e a ciclinas controladoras do ciclo celular
- Determinar o potencial de dano ao DNA dos bufadienolídeos em células PC-3
- Identificar o envolvimento das vias de reparo de DNA por bufadienolídeos em células knockout de galinha (DT40)
- Avaliar a interação dos bufadienolídeos sobre as topoisomerasas *in vitro* e *in silico*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Metodologia Experimental

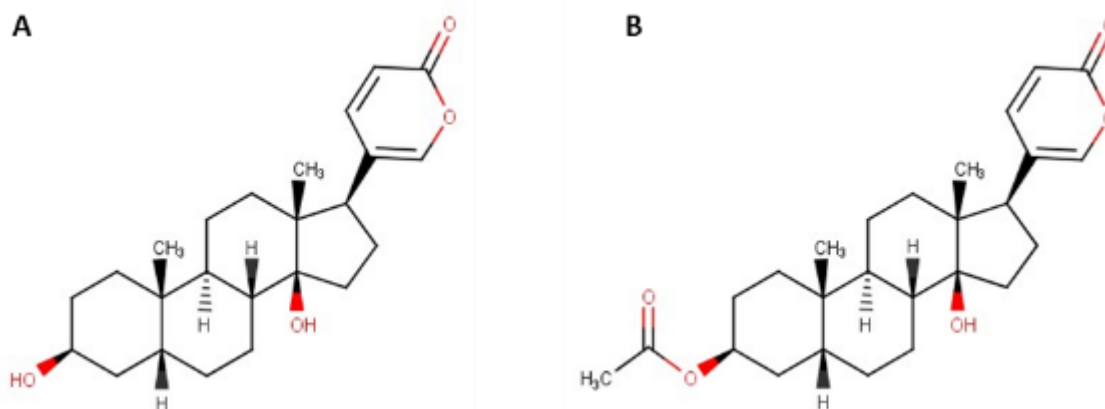
3.1.1 Isolamento, identificação e modificação dos bufadienólídeos

Com o objetivo de obter bufodienólídeos em quantidade suficiente para a produção de derivados esteroidais e avaliação das atividades biológicas, adquiriu-se, por compressão da glândula paratóide, o veneno de 350 espécimes do sapo *Rhinella schneideri*, sob a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA-097/06, processo 02010.000832/04-74). Os animais capturados foram soltos no local de captura em Brasília, de forma a evitar futuros impactos ambientais na anfíbiofauna da região. Após a desidratação e pulverização do veneno fresco, 95 g do veneno foram obtidos. A extração do veneno com acetato de etila, à temperatura ambiente, seguida da evaporação do solvente à vácuo, em evaporador rotativo, um sólido amorfo e amarronzado (9g) foi adquirido. Porções de cerca de 1 g foram cromatografia em coluna *dry-flash* com óxido de alumínio neutro (alumina). Destas foram isolados os bufodienólídeos, os quais foram caracterizados por métodos físico-químicos e espectrométricos, modificados quimicamente e submetidos a ensaios biológicos (CUNHA-FILHO, 2010).

Para os procedimentos de obtenção de bufadienólídeos monoacetilados, o composto bufalina (0,3-0,1 mmol) foi tratado com anidrido acético (0,6-1,2 mL) e piridina (0,8-1,6 mL) por 24 horas à temperatura ambiente. A mistura reacional foi vertida em água com gelo e extraída com diclorometano por três vezes. Os extratos combinados foram concentrados a um terço do volume e lavados com ácido clorídrico a 5%, salmoura e secos com Na₂SO₄. Após evaporação do solvente, o resíduo foi recristalizado com acetona e hexano, fornecendo o composto 3-acetato de bufalina.

O isolamento e modificação dos bufodienólídeos bufalina e 3-acetato de bufalina (**Figura 7**) foi realizado no Instituto de Química da Universidade de Brasília sob supervisão da Prof^a Dr^a. Maria Lucília dos Santos.

Figura 7. Estrutura química dos bufadienolídeos estudados.



A – bufalina (BUF-05). B – 3-acetato de bufalina (BUF-06).

3.1.2 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

3.1.2.1 Linhagens e modelos celulares

As linhagens celulares utilizadas para avaliação da atividade antiproliferativa foram obtidas a partir da doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI e estão listadas na **tabela 1.**)

As células mononucleadas de sangue periférico (CMSP) obtidas de voluntários sadios em condições adequadas foram utilizadas como modelo para avaliação da citotoxicidade sobre células normais não transformadas. O projeto foi submetido e aprovado no comitê de ética de pesquisa em humana; Protocolo COMEPE (Comitê de Ética de Pesquisa da UFC) nº 281/09.

Tabela 1. Linhagens utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* por meio do teste do MTT.

Linhagem	Tipo Histológico	Origem	Concentração
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana	0,3 x 10 ⁶ céls./mL
HCT-8	Carcinoma de cólon	Humana	0,7 x 10 ⁵ céls./mL
HCT-116	Carcinoma de cólon	Humana	0,7 x 10 ⁵ céls./mL
MDAMB-435	Melanoma	Humana	0,1 x 10 ⁶ céls./mL
OVCAR-8	Adenocarcinoma de ovário	Humana	0,1 x 10 ⁶ céls./mL
PC3-M	Carcinoma de próstata	Humana	0,1 x 10 ⁶ céls./mL
SF-295	Glioblastoma	Humana	0,1 x 10 ⁶ céls./mL
CMSP	Límfócitos	Humana	1,0 x 10 ⁶ céls./mL
L929	Fibroblastos	Murina	0,1 x 10 ⁶ céls./mL
V79	Fibroblastos	Murina	0,1 x 10 ⁶ céls./mL
J774	Macrófagos	Murina	0,1 x 10 ⁶ céls./mL

3.1.2.2 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical e mantidas em incubadora de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂.

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (25 cm², volume de 50 mL ou 75 cm², volume de 250 mL, Corning), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementando com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina).

As culturas tiveram seu crescimento acompanhado sob microscópio óptico de inversão a cada 24 horas. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo, numa concentração de 0,5-1,0 x 10⁶ células/mL. Para o despreendimento das células aderidas foi utilizado solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída em PBS.

3.1.2.3 Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP)

As células mononucleadas foram obtidas do sangue periférico de voluntários sadios coletado em tubos tipo *Vacutainer* contendo solução de EDTA K₂ (BD Vacutainer®) como anticoagulante. Após a coleta, 8 mL de sangue total foram vagarosamente depositados sobre 2 mL de Ficoll-Hypaque (Sigma) e centrifugados para separação das fases da solução por velocidade de sedimentação. As células mononucleadas concentram-se na camada localizada na interface entre o plasma (fase clara) e os eritrócitos (fase escura). As CMSP foram retiradas, lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (100 U/mL para penicilina e 100 µg/mL para estreptomicina). Para estimular a proliferação dos linfócitos, foi adicionado ao meio 3% do agente mitogênico fito-hemaglutinina.

3.1.2.4 Teste do MTT

Princípio do Teste

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (MOSMANN, 1983), permitindo, dessa forma, quantificar a porcentagem de células vivas.

Procedimento Experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 poços em densidade entre $0,7 \times 10^5$ e $0,3 \times 10^6$ células/mL (ajustado para cada linhagem, como mostrado na **tabela 1**). As células foram incubadas durante 72 horas em presença de 3-acetato de bufalina (BUF-06) e bufalina (BUF-05). Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada poço recebeu 150 µL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e a placa foi reincubada durante 3 horas em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensionado em 150 µL de DMSO para a quantificação do sal reduzido (formazan) nas células vivas. As absorbâncias foram obtidas

com o auxílio do espectrofotômetro de placa utilizando o programa Multimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.) no comprimento de onda de 595 nm.

Análise dos Dados

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. O gráfico absorbância x concentração foi registrado e determinado a sua concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI₅₀) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism Software versão 6.0.

3.1.3 Estudo do mecanismo de ação

Para os experimentos de determinação dos mecanismos de ação de 3-aceto de bufalina e bufalina, foram utilizadas as células de carcinoma de próstata PC-3 na concentração $0,5 \times 10^6$ células/mL e avaliadas quanto a diversos efeitos celulares. Os protocolos aplicados neste estudo examinaram os efeitos concentração e tempo dependentes. As concentrações foram estimadas a partir do valor de CI⁵⁰ dos bufadienolídeos encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular após incubação por 72 horas. As concentrações utilizadas nos demais experimentos foram baseadas na CI₅₀ obtida no teste de MTT. Desta forma, as concentrações escolhidas foram 30, 60 e 120 nM para 3-acetato de bufalina (BUF06); 80 e 120 nM para bufalina (BUF05). Os grupos do controle negativo receberam a mesma quantidade de DMSO enquanto a doxorubicina (0,5 µM) foi utilizada como controle positivo.

3.1.3.1 Viabilidade em tempo real por impedância

Princípio do Teste

O ensaio baseia-se na capacidade das células de mudarem a impedância ao aumentarem sua superfície de contato com o fundo de placas revestidas de ouro. Tais placas, possuem eletrodos

que permitem mensurar indiretamente crescimento e aderência das células por alteração da impedância.

Procedimento Experimental

Antes do plaqueamento das células, 90 μL de meio foram adicionados aos poços de placas de 16 poços revestidas de ouro para mensuração da impedância de base das placas. Após, 5.000 células da linhagem PC-3 foram plaqueadas em cada poço em 100 μL de meio RPMI adicionado de 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. Após 20 min, as placas foram conectadas ao aparelho XCELLigence® RTCA DP (Acea Biosciences) para mensuração da impedância. Após 24 horas de incubação, 10 μL das drogas diluídas em RPMI 1640 nas concentrações de 30, 60 e 120 nM para BUF06, 80 e 160 nM para BUF05. Após 96 horas de incubação, os gráficos mostrando as curvas de impedância foram adquiridos através do software RTCA Analysis Software 1.0.

Concomitantemente, células da linhagem PC-3 foram plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL em placas de 24 poços para aquisição de fotomicrografias obtidas em microscópio invertido Axio Vert (Zeiss). Após 24 horas de incubação os bufadienolídeos foram acrescentados nas mesmas concentrações mencionadas acima. As fotos foram obtidas após 3, 6, 12, 24 e 48 horas de incubação.

3.1.3.2 Análise da morfologia celular por coloração diferencial

Princípio do Teste

A coloração nesse experimento se baseia em interações eletrostáticas entre os corantes e as moléculas-alvo. Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permitem distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. Essa técnica é bastante indicada para estudo de padrão de morte celular (apoptose/necrose).

Procedimento Experimental

Antes do plaqueamento, lamíνας circulares foram adicionadas ao fundo dos poços das placas. Células da linhagem PC-3, plaqueadas a concentração 5×10^5 células/mL foram incubadas por 24 e 48 horas com as drogas teste e examinadas ao microscópio invertido. Para observar a morfologia, as lamínulas circulares foram retiradas das placas e a fixação foi feita usando o reagente 1 e a coloração seguida por 30 segundos no reagente 2 e 5 segundos no reagente 3 do kit Panótico Rápido ®.

Análise dos Dados

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

3.1.3.3 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para se determinar diferentes características das células. Os citômetros analisam as células em meio líquido que passam através de uma fonte de luz. O desvio da luz, que está relacionado diretamente com a estrutura e morfologia das células, e a fluorescência são determinados para cada partícula que passa pela fonte de excitação. Após a aquisição do desvio da luz e fluorescência de cada partícula, a informação resultante pode ser analisada utilizando-se um computador com programa específico acoplado ao citômetro (SHAPIRO, 1995).

Para todos os compostos testados, cinco mil eventos foram avaliados por experimento e os debris celulares foram omitidos da análise. A fluorescência de células da linhagem PC-3 foram então determinadas por citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mine usando o software Guava Express Plus após 24 e 48 horas de incubação. Cinco mil eventos foram analisados para cada replicata em três experimentos independentes.

3.1.3.3.1 Determinação da integridade da membrana, densidade e morfologia celular

Princípio do teste

Este método consiste na capacidade do iodeto de propídeo (PI) se ligar ao DNA de células cuja membrana plasmática esteja rompida, como nos casos de apoptose tardia e necrose, emitindo uma alta fluorescência quando excitado pelo laser de argônio (488 nm). Nas células cuja membrana permanece íntegra (células viáveis), o PI não consegue penetrar e, portanto, emite uma fluorescência mais baixa, com isso as células vivas podem ser diferenciadas das mortas.

Procedimento Experimental

Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células tratadas (com BUF-05 e BUF-06) e não tratadas foi incubada com 200 µL de uma solução de PI 1 µg/mL. Após 15 minutos de incubação no escuro, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm/5 min. O sobrenadante foi então descartado e 100 µL de PBS foi adicionado em cada amostra. Após um período de 30 minutos incubadas no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (CURY-BOAVENTURA *et al.*, 2004).

3.1.3.3.2 Determinação da Externalização da Fosfatidilserina – Anexina V

Princípio do Teste

Um dos principais processos que ocorrem na apoptose é a perda da assimetria da membrana fosfolipídica com a translocação da fosfatidilserina (PS) da membrana interna da bicamada lipídica para superfície celular. A externalização da PS ainda continua como um processo não totalmente conhecido, mas sabe-se que a externalização da fosfatidilserina funciona como um sinal da célula para que os macrófagos a fagocitem, antes da perda da integridade de membrana celular (VERMES *et al.*, 1995).

Procedimento Experimental

A externalização da fosfatidilserina foi analisada por citometria de fluxo após coloração da fosfatidilserina com a anexina V (VERMES *et al.*, 1995). Foi utilizado o kit Guava Nexin para determinar apoptose inicial e tardia. As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas em 135 μ L de PBS com 5 μ L de 7-amino-actinomicina (7AAD) e 10 μ L de anexina V conjugada com ficoeritrina (PE). As células foram gentilmente agitadas e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente (20-25°C) no escuro. Posteriormente, as células foram analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte/Guava Technologies). Anexina V é uma proteína ligada a um fosfolípido que tem alta afinidade por PS. 7AAD, é um corante hidrofílico impermeável em células intactas, e é utilizado como um indicador da integridade da membrana celular. A fluorescência da anexina V conjugada com a ficoeritrina foi mensurada por fluorescência amarela-583nm e o 7AAD na fluorescência vermelha a 680 nm. A percentagem de células viáveis e de células apoptóticas inicial e tardia foi calculada.

Análise dos Dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 2 experimentos realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Newman, com nível de significância de 5%. ($p < 0,05$)

3.1.3.3 Análise do conteúdo e fragmentação de DNA (Ciclo Celular)

Princípio do Teste

Esse teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo ligar-se ao DNA. Inicialmente a membrana plasmática das células foram lisadas por um detergente, permitindo que o PI ligue-se ao DNA de todas as células. Células com o DNA íntegro emitirão alta fluorescência, já núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos PI e por isso emitem menor fluorescência, sugestivo de apoptose. Além disso, o PI consegue intercalar

proporcionalmente a quantidade de DNA da célula, podendo então mensurar as fases do ciclo celular, através da quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo celular.

Procedimento Experimental

Uma alíquota de 100 μ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 μ L de uma solução de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e 2 μ g/mL de iodeto de propídeo em PBS). Após um período de 30 minutos, onde os tubos permaneceram no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (NICOLETTI et al., 1991).

3.1.3.3.4 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Princípio do teste

Esse teste se baseia na capacidade da mitocôndria em sequestrar um corante fluorescente, rodamina 123. Quando esta organela apresenta potencial transmembrânico inalterado, as células que sequestram a rodamina emitem alta fluorescência quando atingidas pelo laser. Alterações no potencial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando eventos que emitirão menor fluorescência quando comparado às células que possuem mitocôndrias normais.

Procedimento Experimental

Uma alíquota de 100 μ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 200 μ L de uma solução de rodamina 1 μ g/mL. Após 15 minutos de incubação no escuro, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm/5 min. O sobrenadante foi então descartado e 100 μ L de PBS foi adicionado em cada amostra. Após um período de 30 minutos incubadas no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (CURY-BOAVENTURA et al., 2004).

3.1.3.4 Expressão de proteínas por Western Blot

Princípio do teste

A técnica baseia-se na extração de proteínas através da lise celular, seguida de uma separação em um gel de eletroforese. Posterior a esse passo, as proteínas separadas são, então, transferidas para uma membrana revelando, após marcação apropriada, as bandas para cada proteína. Como o anticorpo só se liga às proteínas específicas, apenas a banda marcada é visível. A membrana é, então, incubada com anticorpos específicos para as proteínas investigadas e a revelação das bandas é realizada por sondas do anticorpo secundário ligadas a peroxidase (MAHMOOD & YANG, 2012; MACPHEE, 2010).

Procedimento Experimental

Foram utilizados no experimento os anticorpos para procaspases 9, 8, 3 e 7. Além de anticorpos para Bcl-xL, Bcl-2 e Bax e para as ciclinas A2 e B1. O anticorpo β -actina (Cell Signaling Technology®) foi utilizado como referência experimental. Os anticorpos secundários anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology®) e anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology®) ligados à peroxidase foram utilizados como anticorpos secundários para detecção da proteína. Os anticorpos foram solubilizados de acordo com as instruções do fabricante (BSA 5% ou Leite 5%), diluídos em 1:1000, exceto a β -actina, e os anticorpos secundários foram diluídos em 1:2000.

Extração de proteínas

Para esse experimento, as células PC-3 cultivadas com 150 mil células por poço foram tratadas com duas doses de BUF06 (60, 120 nM) e uma dose de BUF05 (120 nM). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,5 μ M. O controle negativo recebeu a mesma concentração de DMSO que a concentração mais alta da substância testada. Após o período de tratamento de 48 horas, as células passaram por um processo de extração de proteínas. Para tal, o sobrenadante e as células, após tripsinização, foram colocados em um tubo falcon e centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos. Decorrido o tempo, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. O pellet foi transferido para um tubo eppendorf e ressuspendido em tampão RIPA *Lysis Buffer* (Milipore) 1X acrescido de

coquetel de inibidores de proteases (1:100 v/v), ortovanodato de sódio (1:100 v/v) e PMSF (1:100 v/v). Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo e sonicadas três vezes por 60 segundos com um intervalo de 2 minutos entre as sonicações. Terminado este processo, as amostras foram lisadas gentilmente por 15 minutos em gelo. A mistura foi centrifugada a 14.000xg por 15 minutos. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo para futura quantificação.

Quantificação de proteínas

Após a lise celular e extração proteica, a quantificação de proteínas totais foi realizada através de um ensaio colorimétrico utilizando um kit DC Protein Assay (BioRad *Laboratories*), o qual se baseia no método de Lowry. Para calibração do método foi realizada uma curva padrão de BSA (0,2 – 2 mg/mL, Sigma) diluída em tampão RIPA completo. Com auxílio de uma placa de 96 poços cada amostra foi testada em triplicata utilizando-se 5 µL por replicata. Ao branco foi adicionado somente tampão RIPA completo. Incluiu-se em todos os poços 25 µL do reagente A' (2 % de reagente S + 98 % de reagente A) seguido de 200 µL de reagente B (BioRad *Laboratories*). As amostras foram incubadas por 10 minutos na ausência de luz sob leve agitação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm. A curva da BSA foi gerada por regressão linear no programa *GraphPad Prism* versão 6.0. Os pontos foram plotados em gráfico de absorbância versus quantidade de proteínas e foi gerada uma equação linear. Os valores de absorbância obtidos foram aplicados a equação da curva para determinação da concentração proteica.

Eletroforese

A separação das proteínas foi baseada em seus pesos moleculares realizada em géis de poli(acrilamida) em um sistema vertical (TOWBIN, STAHELIN; GORDON, 1979). O processo utiliza dois tipos de géis, um deles representa o gel de concentração, onde as proteínas são depositadas inicialmente, e o segundo gel que é representado pelo gel de separação ou gel de resolução onde as proteínas são separadas. O gel de concentração apresenta uma malha mais fina com uma concentração final de 5 % de poli(acrilamida) (Tris-HCl 0,5 M e pH 6,8). O gel de separação apresenta uma malha mais fechada devido a sua maior concentração de poli(acrilamida), 12,5% (Tris-HCl 0,5 M e pH 6,8). Para a montagem do sistema vertical (BioRad, modelo mini-

PROTEAN® Tetra Cell), o gel de concentração foi colocada sobre o gel de separação, o pente foi retirado e as amostras foram aplicadas nos poços. O marcador molecular *Full-Range Rainbow Marker* (12-225 kDa; GE Healthcare) foi utilizado para monitorar a separação de proteínas e posterior identificação das bandas. Em cada poço foi aplicado um montante de 50 µg de proteínas totais da amostra, desnaturada pelo tampão *Blue Juice 5X* (5:1 v/v; Invitrogen). A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100 V e amperagem livre (para duas placas; fonte elétrica PowerPac®, modelo HCPower Supply) à temperatura ambiente, utilizando tampão de corrida para eletroforese. O tempo de corrida durou aproximadamente em 1h e 30 min. Posteriormente, as proteínas foram transferidas do gel para membranas de PVDF *Hybond-P* (GE Healthcare) previamente ativadas com metanol e então posta em contato com o gel entre papéis de filtros e esponjas. A eletrotransferência foi realizada em amperagem de 0,4 A por 1 h sob refrigeração (fonte elétrica PowerPac®, modelo HCPower Supply).

Revelação

Após a transferência, as membranas foram incubadas por 1 hora em solução de leite desnatado a 5% para bloqueio de ligações inespecíficas após esse tempo as membranas foram lavadas três vezes com TBS-Tween 0,1% (TBS-T) e uma vez com TBS para a retirada do leite. A incubação com anticorpo primário ocorreu em *overnight* a 4 °C sob agitação constante. Para a retirada do anticorpo primário, foram realizadas três lavagens com TBS-T e uma com TBS e depois a membrana foi incubada por 1 hora com o anticorpo secundário correspondente a cada anticorpo primário diluído em solução de leite desnatado a 5% em TBS sob agitação constante. Todos os anticorpos secundários eram acoplados a uma enzima peroxidase.

Transcorrido o tempo de incubação, o anticorpo secundário foi retirado e mais três lavagens de TBS-T e uma de TBS foram realizadas. Para a revelação das bandas, foi utilizado peróxido de hidrogênio e luminol. Em seguida as membranas foram fotografadas por um captor de imagens (GE Healthcare, modelo ImageQuant® 300) utilizado para captação da quimioluminescência gerado pelo método de detecção de bandas.

3.1.3.5 Dano ao DNA

3.1.3.5.1 Ensaio do cometa

Princípio do Teste

O teste do cometa, também conhecido como *single-cell gel electrophoresis* (SCGE), é um ensaio utilizado para detecção de dano genotóxico que também encontrou ampla aplicação no monitoramento de efeitos induzidos por radiação ou substâncias químicas (HARTMANN *et al.*, 2003).

Existem dois protocolos principais para a execução deste teste (OLIVE, 1989; OSTLING; JOHANSON, 1984; SINGH *et al.*, 1988). A versão alcalina, mais empregada por ser mais abrangente, utiliza pH maior que 13 afim de induzir a desnaturação da molécula de DNA e detectar lesões de diversas naturezas, como quebras de fita simples e duplas, sítios álcali-lábeis, sítios de reparo por excisão e ligações cruzadas. A versão neutra, por sua vez, vale-se de eletroforese em tampão de pH entre 7,0 e 8,5 para detectar apenas quebras de fita-dupla em DNA ou ligações cruzadas entre DNA e DNA, DNA e proteína ou DNA e xenobiótico.

Procedimento Experimental

O presente estudo utilizou-se do teste de cometa alcalino para avaliar a indução de danos ao DNA de células PC-3 expostas a 30, 60 e 120 nM de 3-acetato de bufalina ou 80 e 160 nM de bufalina por 3 e 24 horas de tratamento.

Preparo das laminas

As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (Gibco) diluída a 0,5% em solução de PBS livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} à temperatura de 60°C e mantida em temperatura ambiente até completa solidificação. As células da linhagem PC-3 controle ou tratadas com os bufadienólídeos foram embebidas em uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%; Gibco) a 37°C e adicionadas às lâminas pré-cobertas com agarose, sobrepostas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação da agarose.

Lise celular

Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram delicadamente removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise a 4°C e mantidas por, no mínimo 1 hora, abrigadas da luz.

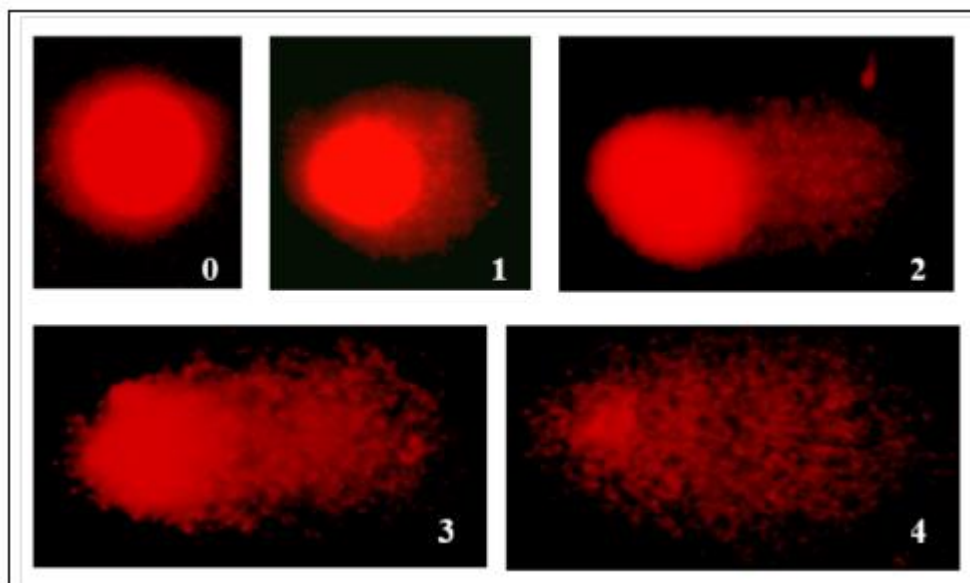
Neutralização e eletroforese

Ainda ao abrigo da luz, as lâminas foram imersas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese que, por sua vez, foi preenchida com o tampão de corrida alcalino a 4°C. A eletroforese (cuba Bio Rad, modelo DNA Sub Cell Gel) foi conduzida a 14 V e 12 mA ou 0,5 V/cm (fonte Life Technologies, modelo 250) por 60 minutos a 4°C. Após a eletroforese, as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 minutos e fixadas em etanol a 100%.

Coloração e análise das lâminas

A coloração das lâminas foi realizada com solução de brometo de etídio (Sigma) a 20 µg/mL. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus, modelo BX41) e classificadas de acordo com os escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (**Figura 8**). Foram contados 100 cometas por lâmina e atribuídos, por análise visual, a uma das cinco categorias – sem dano, baixo nível de dano, médio nível, nível alto de dano e dano máximo – que relacionam a percentagem de DNA na cauda do cometa ao grau de

Figura 8. Tipos de cometa e classificação por categoria de dano.



lesão sofrida pela célula (LOVELL; THOMAS; DUBOW, 1999).

0 – sem dano (cauda < 5%); 1 – baixo nível de dano (5 – 20%); 2 – médio nível de dano (20 – 40%); 3 – alto nível de dano (40 – 95%) e 4 – dano máximo (>95%).

O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula:

$$ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i$$

onde n_i é o número de células com nível de dano i (0, 1, 2, 3 ou 4). A frequência de dano (FD) representa a porcentagem de células que sofreram danos no DNA.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e erro padrão da média de 2 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Newman Keuls, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), usando o programa GraphPad Prism 5.0.

3.1.3.5.2 Marcação de H2AX fosforilado

Princípio do teste

O ensaio baseia-se na detecção da fosforilação de H2AX celular por citometria de fluxo e, dessa forma, é possível determinar compostos capazes de promover quebras de cadeia simples e/ou quebras de cadeia dupla do DNA. A fosforilação de H2AX tem sido considerada a principal proteína sinalizadora que está envolvida na resposta ao dano sobre o DNA e/ou o efeito do reparo de DNA, permitindo que se estabeleça uma correlação entre dano de DNA, *checkpoints* de ciclo celular e iniciação de apoptose (BONNER et al., 2008; SMITH et al., 2010).

Procedimento Experimental

Para realização desse ensaio foi utilizado o kit *Millipore's FlowCollect™ Histone H2A.X Phosphorylation Assay* o qual contém o anticorpo anti-fosfo-histona H2A.X (Ser139) conjugado com o corante fluorescente Alexa Fluor 488. Células da linhagem PC-3 foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de $0,5 \times 10^5$ células/mL. Os tratamentos com os compostos seguiram os tempos de incubação de 3 e 24 horas e as doses utilizadas foram 30, 60 e 120 nM para BUF06, 80 e 160 nM para BUF05. Após os tempos de incubação com as drogas teste, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (1500 rpm/4 min) e lavadas com 1 mL de Tampão de Lavagem. Posteriormente, foram novamente centrifugadas (1500 rpm/4 min) e ressuspensas em 260µL de Tampão de Fixação. Em seguida, as células foram incubadas em gelo durante 20 minutos, e logo centrifugadas (1500 rpm/4 min) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensado em 500 µL de Tampão de Ensaio. Após a ressuspensão, os tubos foram novamente centrifugados (1500 rpm/4 min) a 4°C e o sobrenadante descartado para uma nova ressuspensão (280 µL), agora em Tampão de Permeabilização gelado. Posteriormente, as amostras foram incubadas em gelo por 20 minutos. Após incubação, seguiu-se de centrifugação a 1500 rpm por 4 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensado em 1 mL de Tampão de Ensaio. Desse volume, 200µL foram transferidos para um novo tubo de 0,5 mL, centrifugado (1500 rpm/4 min) a 4 °C e o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado com 200µL de Tampão de Ensaio e novamente centrifugado a 1500 rpm/4 min/4 °C. Após fixação e permeabilização das células, o pellet foi ressuspensado em 95µL de Tampão de Ensaio e 5µL do anticorpo Anti-Histona H2A.X conjugado com Alexa Fluor® 488. As células foram, então, incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos, protegidas da luz. Após a incubação, foram adicionados aos tubos 100 µL de Tampão de Ensaio e então foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 200 µL/tubo de Tampão de Ensaio, centrifugado a 1500 rpm/5 min a 4 °C e, após descarte do sobrenadante, novamente ressuspensado em 200µL de Tampão de Ensaio. As amostras foram então imediatamente analisadas por citometria de fluxo (Guava easyCyte™) usando o canal de fluorescência verde. Um total de 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os dados foram expressos como média ± E.P.M de experimento realizado em triplicata.

3.1.3.5.3 Viabilidade celular em painel de células knockout para genes de reparo de DNA

Princípio do teste

O ensaio permite comparar a atividade de compostos de interesse frente à linhagens com deficiência em vias de reparo de DNA, permitindo comparar a ação desses compostos sob várias vias relacionadas ao reparo de DNA. Além disso, é possível comparar os perfis dos compostos teste com compostos que apresentam perfil já definido como por exemplo camptotecina, etoposídeo e doxorrubicina.

Procedimento experimental

As linhagens celulares DT40 (galinha) usadas nesse estudo foram obtidas no Laboratory of Radiation Genetics, Graduate School of Medicine na Universidade de Kyoto (Kyoto, Japão) entre 2011 e 2012. As células de DT40 foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ em meio RPMI-1640 (11875-093; Invitrogen) suplementado com 1% de soro de galinha (16110-082; Invitrogen), 10% de soro fetal bovino (100-106; Gemini Bio-Products), 10⁻⁵ mol/L β-mercaptoetanol (M-3148; Sigma-Aldrich) e 1% penicilina/streptomicina (15140-122; Invitrogen).

Duzentas células da linhagem DT40 em 20 µL de meio de cultura foram cultivadas em placas de 384 poços (#6007680; Perkin Elmer Life Sciences), e então foram adicionados 20 µL de meio de cultura contendo os compostos. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas, permitindo que as células selvagens não tratadas dupliquem cerca de 9 vezes. A viabilidade das células foi mensurada usando o kit ATPlite 1-step (Perkin Elmer Life Sciences). Em resumo, 20 µL da solução de ATPlite é adicionado às placas de 384 poços. Após cinco minutos a luminescência foi mensurada pelo leitor de placa Envision 2104 Multilabel Reader (Perkin Elmer). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. Em uma placa de 384 poços é possível examinar a sensibilidade de duas drogas e em até sete linhagens diferentes no mesmo tempo. Células do tipo selvagem (wild-type) foram incluídas em cada placa para avaliar a sensibilidade relativa de cada mutante (knockout) em relação à célula selvagem. As curvas de sensibilidade foram desenhadas com a células não-tratadas como 100%, sob as condições de que em cada número de células é relacionado linearmente com a intensidade da fluorescência. Os

valores de IC90 para cada droga e linhagem celular foram determinados pelos pontos que cruzam 15% de viabilidade e a concentração da droga. A IC90 para cada mutante é dividida pela IC90 da célula selvagem cultivadas na mesma placa, e então o quociente é convertido na escala logarítma (base 2) para a construção do gráfico.

3.1.3.5.4 Ensaios de Topoisomerase

3.1.3.5.5 Reações de Clivagem de DNA mediada por Topoisomerase I

Princípio do teste

O ensaio baseia-se na capacidade da enzima topoisomerase de clivar o DNA e resolver dessa forma seus problemas topológicos. Quando a enzima é inibida, ocorre o surgimento de bandas de DNA de maior intensidade que são observados pela utilização de isótopos radiomarcados.

Procedimento experimental

A enzima Topo1 recombinante humana foi purificada por um baculovirus como previamente descrito (POURQUIER et al., 1999). As reações de clivagem de DNA foram preparadas como descrito anteriormente com exceção do substrato de DNA (DEXHEIMER & POMMIER, 2008). Resumidamente, um oligonucleotídeo de DNA com 117-pb abrangendo o sítio de clivagem de Topo1 é utilizado. Esse oligonucleotídeo é marcada na porção 3' em uma reação com [$\alpha^{32}\text{P}$]dGTP no tampão de reação 2 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) com 0,5 unidades de DNA polimerase I. O [^{32}P]dGTP não incorporado foi removido usando uma mini coluna Quick Spin DNA (Roche, Indianapolis, IN), e o eluído contendo o substrato de DNA selado foi coletado. Aproximadamente 2 nM de substrato de DNA radiomarcado foi incubado com Topo1 em 20 μL de tampão de reação [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, and 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA] a 25° por 20 min na presença de várias concentrações dos compostos-teste. A reação é terminada pela adição de SDS (0,5% de concentração final) seguido pela adição de dois volumes de corante de carregamento

(80% de formamida, 10 mM de hidróxido de sódio, 1 mM de EDTA, 0.1 % de xileno cianol, e 0,1% de azul de bromofenol). Aliquotas de cada reação foram submetidas a 20% de PAGE desnaturante. Os géis foram secados e visualizados utilizando um phosphoimager e o software ImageQuant (Molecular Dynamics) (POURQUIER et al. 1999).

3.1.3.5.6 Reações de Clivagem de DNA mediada por Topoisomerase II

Princípio do Teste

O ensaio baseia-se na capacidade da enzima topoisomerase II de clivar o DNA e resolver desta forma seus problemas topológicos. Quando a enzima é inibida, ocorre o surgimento de bandas de DNA de maior intensidade que são observados pela utilização de isótopos radiomarcados.

Procedimento Experimental

A enzima Topo2 recombinante humana foi purificada por um baculovirus como previamente descrito (POURQUIER et al., 1999). Fragmentos de DNA preparados como descrito no ensaio anterior foram equilibrados com ou sem droga teste em 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 50 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 0.1 mM de EDTA, 1 mM de ATP e 15 µg/mL de soro fetal bovino por 5 min antes da adição de top2 purificada (40-70 ng). As reações enzimáticas foram realizadas a 37°C por 30 min, e então paradas pela adição de SDS 1% e proteinase K (0.4 mg/mL), seguido por uma incubação final de 1 hora a 42°C. Aliquotas de cada reação foram submetidas a 20% de PAGE desnaturante. Os géis foram secados e visualizados utilizando um phosphoimager e o software ImageQuant (Molecular Dynamics) (POURQUIER et al. 1999).

3.1.3.5.7 Docking Molecular

As técnicas de ancoragem molecular (*docking* molecular) fornecem estimativas da energia livre de ligação entre proteínas e ligantes, antes mesmo que esses sejam sintetizados. Esta

importante ferramenta tem sido usada com o objetivo de selecionar composto para determinado alvo, e no desenho racional de possíveis candidatos que apresentariam melhor interação com o sítio ativo de um determinado receptor (RODRIGUES et al. 2012).

Procedimento Experimental

O procedimento foi realizado utilizando as ferramentas Avogadro 1.0.3, Autodock Tools, e Autodock 4.1. As coordenadas para o domínio de ligação de ATP na enzima topoisomerase II α humana foram obtidas do banco de dados Protein Data Bank (código da enzima: 1ZXM)(WEI *et al.*, 2005). As moléculas de água foram removidas e os átomos de hidrogênio foram adicionados à estrutura cristalográfica original. Ao íon magnésio foi atribuída uma carga +2. As estruturas moleculares dos compostos 3-acetato de bufalina (BUF-06) e bufalina (BUF-05) foram desenhadas utilizando-se o software Avogadro e ajustados suas cargas de Gasteiger com a ferramenta AutoDock Tools. Os arquivos do receptor e ligante foram preparados de acordo com os protocolos originais (MORRIS *et al.*, 1998; SANNER, 1999). O docking foi realizado utilizando-se as instruções do Algoritmo Genético Lamarckiano (Lamarckian Genetic Algorithm). Foram usados parâmetros padrões de busca exceto pelo quantidade de energias calculadas (25.000.000) e corridas de docking (50). Finalmente, a área (*grid*; x: 49.589, y: 3.725, z: 20.137) central da enzima foi escolhida para realização das corridas do docking agrupando-se as orientações com distancia 0,375 Å para se obter o modo de docking mais favorável. A estrutura da proteína foi considerada rígida em todas as corridas.

4 RESULTADOS

4.1. Avaliação da atividade citotóxica dos bufadienólídeos

A avaliação citotóxica inicial dos bufadienólídeos envolveu 9 linhagens tumorais humanas entre as quais estão HL-60 (leucemia), HCT-8 (cólon), HCT-116 (cólon), MDA-MB435 (melanoma), OVCAR-8 (ovário), PC3 (próstata), PC3-M (próstata) e SF-295 (glioblastoma) que correspondem a diferentes origens tumorais, além de 3 linhagens celulares murinas não tumorais J774 (ascite), L929 (adipócito) e V79 (pulmão) e células mononucleadas do sangue periférico humano (CMSP) foram tratadas com concentrações crescentes de bufalina (BUF-05) e bufalina-3-acetato (BUF-06) durante 72 horas.

A análise da ação citotóxica das amostras testadas (**Tabela 2**) mostrou que ambos bufadienólídeos apresentaram potente citotoxicidade frente às linhagens tumorais de diferentes tipos histológicos, com valores de concentração inibitória 50 (CI₅₀) que variaram entre 3 a 32 nM para linhagens tumorais e valor aproximado de 25 nM para a linhagem normal (CMSP). Houve um discreto aumento de citotoxicidade do composto bufalina-3-acetato em comparação à bufalina. Entretanto, os compostos não se mostraram citotóxicos para as linhagens normais murinas cuja CI₅₀ foi maior que 10 µM.

Em relação ao teste hemolítico utilizando eritrócitos de camundongo Swiss (*Mus musculus*), os bufadienólídeos estudados não foram capazes de induzir lise das hemácias. A ausência de atividade hemolítica (CE₅₀ > 50 µg/mL) sugere que o efeito citotóxico das amostras testadas independe de dano à nível de membrana plasmática das células.

Tendo conhecimento que a bufalina (BUF-05) já é um composto que vem sendo estudado por diversos autores com reconhecida atividade citotóxica, enquanto a 3-acetato de bufalina (BUF-06), uma análogo da bufalina, tem ainda poucos relatos na literatura, decidiu-se utilizar os dois compostos nos ensaios para determinação dos mecanismos de ação. A linhagem tumoral PC-3 (próstata) foi selecionada para os ensaios posteriores devido sua alta incidência na população do sexo masculino bem como a ausência de especificidade pelos bufadienólídeos entre as linhagens tumorais testadas. Dessa forma, as concentrações, próximas a CI_{5,0} de BUF-06

utilizadas no trabalho foram 30, 60 e 120 nM e para BUF05 foram 80 e 160 nM. O composto doxorubicina (0,5 μ M) também foi utilizado como controle positivo.

Tabela 2. Atividade citotóxica de bufadienólídeos bufalina (BUF-05) e 3-acetato de bufalina (BUF-06) obtidos a partir da secreção do anfíbio de *Rhinella schneideri* em linhagens celulares de câncer e normais. μ M (micromolar).

Linhagens	BUF-05	BUF-06	Doxo
Tumorais			
HL-60	0,007 (0,006-0,010)	0,01 (0,005-0,014)	0,03 (0,018-0,036)
HCT-8	0,005 (0,005-0,010)	0,005 (0,004-0,008)	0,07 (0,055-0,091)
HCT-116	0,008 (0,006-0,012)	0,006 (0,003-0,008)	0,20 (0,16-0,31)
MDAMB-435	0,012 (0,010-0,018)	0,018 (0,012-0,025)	0,81 (0,62-1,19)
OVCAR-8	0,032 (0,023-0,043)	0,019 (0,015-0,026)	0,45 (0,40-0,72)
PC3-M	0,025 (0,012-0,027)	0,007 (0,003-0,009)	0,34 (0,31-0,42)
PC3	0,019 (0,013-0,026)	0,010 (0,006-0,014)	0,76 (0,59-0,73)
SF-295	0,003 (0,003-0,005)	0,003 (0,002-0,004)	0,27 (0,23-0,42)
Linhagens	BUF-05	BUF-06	Doxo
Normais			
CMSP	0,025 (0,022-0,035)	0,027 (0,025-0,029)	1,78 (0,95-3,31)
L929	> 10	> 10	1,72 (1,58-1,87)
V79	> 10	> 10	ND*
J774	> 10	> 10	0,09 (0,07-0,128)

A tabela apresenta os valores de CI50 (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) (μ M) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) realizado pelo teste do MTT, após 72h de incubação obtidos por regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism.

4.2 Avaliação da atividade citotóxica dos bufadienólídeos em tempo real

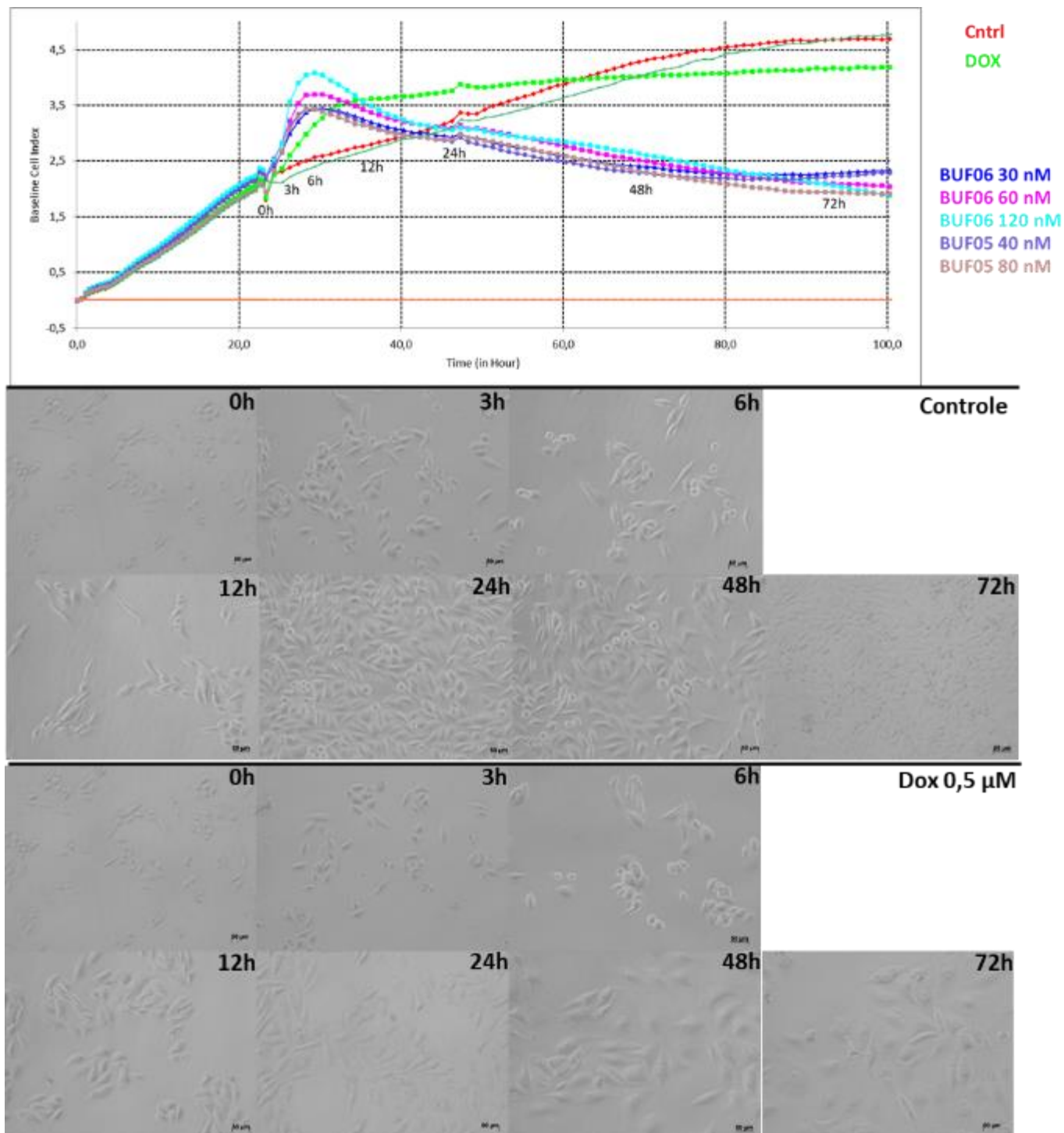
A atividade citotóxica em tempo real foi realizada utilizando-se o aparelho Xcelligence (Acea Biosciences), cujo crescimento celular é inferido indiretamente por impedância. Concomitantemente, foram obtidas imagens em campo claro em microscópio de fluorescência sem a utilização de nenhum corante. A amostra 3-acetato de bufalina foi analisada nas

concentrações de 30, 60 e 120 nM e a bufalina foi analisada nas concentrações de 80 e 160 nM) durante 72 horas, tendo como controle positivo doxorrubicina (0,5 μ M) e o controle negativo foi o veículo (DMSO 0,1%) usado para dissolver os compostos.

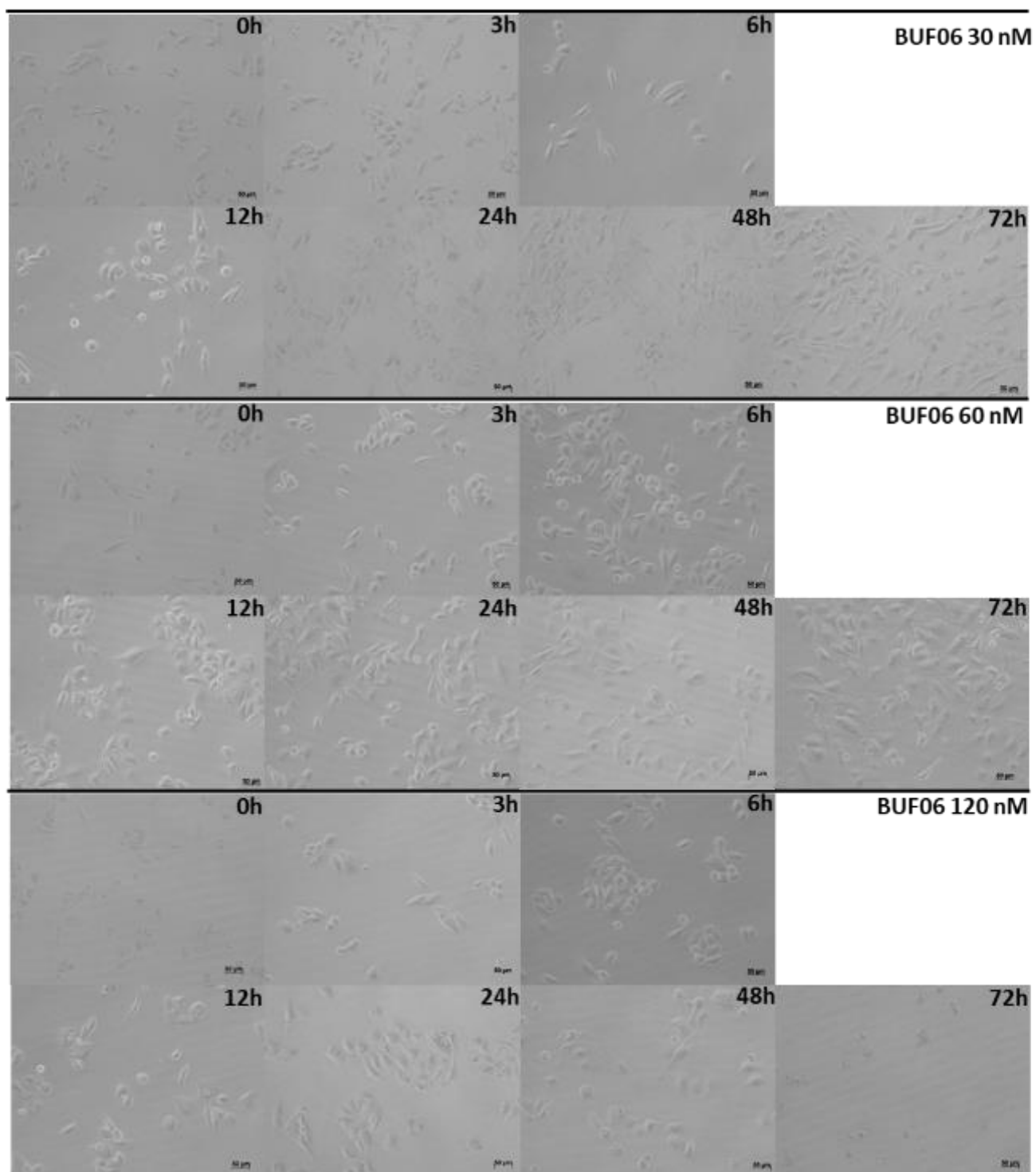
Durante as primeiras 12 horas foi observado aumento da impedância (na **Figura 9**, chamado de *Cell Index*) em todas as concentrações testadas de ambos os bufadienolídeos e também para o controle positivo doxorrubicina. A partir de 24 horas de incubação, todas as concentrações tiveram suas curvas de crescimento celular semelhante entre si, porém com aumento aparente do *cell index* logo após incubação com os compostos teste e controle positivo, com diminuição de impedância em relação ao controle negativo e atingindo um platô após aproximadamente 56 horas de incubação. Já o controle positivo, após 24 horas de incubação continuou aumentando sua impedância de forma discreta, chegando próxima a curva de crescimento do controle negativo.

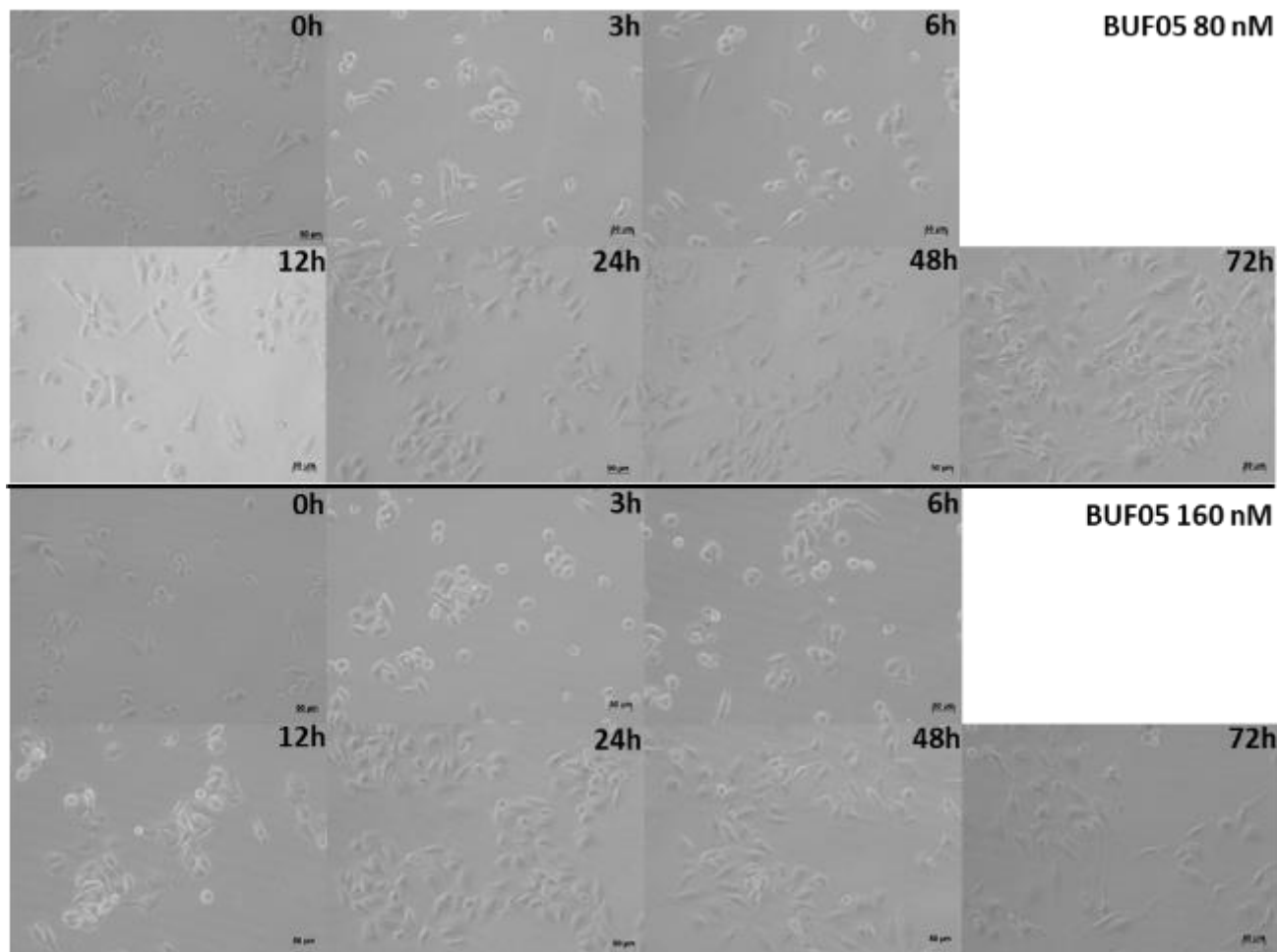
Em relação às imagens de campo claro, foi possível observar aumento de volume celular para todas as concentrações de bufadienolídeos a partir de 3 horas de incubação (**Figura 9**). Com o passar do tempo de incubação, observou-se alteração da morfologia celular para formas mais alongadas acentuadas para para BUF-06 nas concentrações de 60 e 120 nM e para BUF-05 nas concentrações de 80 e 160 nM. A doxorrubicina aumentou drasticamente o volume celular principalmente a partir de 6 horas de incubação, acentuando-se após 24 horas de incubação. Pôde-se notar ainda alteração da morfologia celular para forma mais circulares e, em algumas vezes, alongadas durante todo o período de incubação, acentuando-se após 24 horas.

Figura 9. Efeito do bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF-06) e bufalina (BUF-05) sobre o



crescimento celular em tempo real.





A doxorrubicina ($0,5 \mu\text{M}$) foi utilizada como controle positivo. Fotomicrografias obtidas por microscópio de campo claro invertido com aumento 200x.

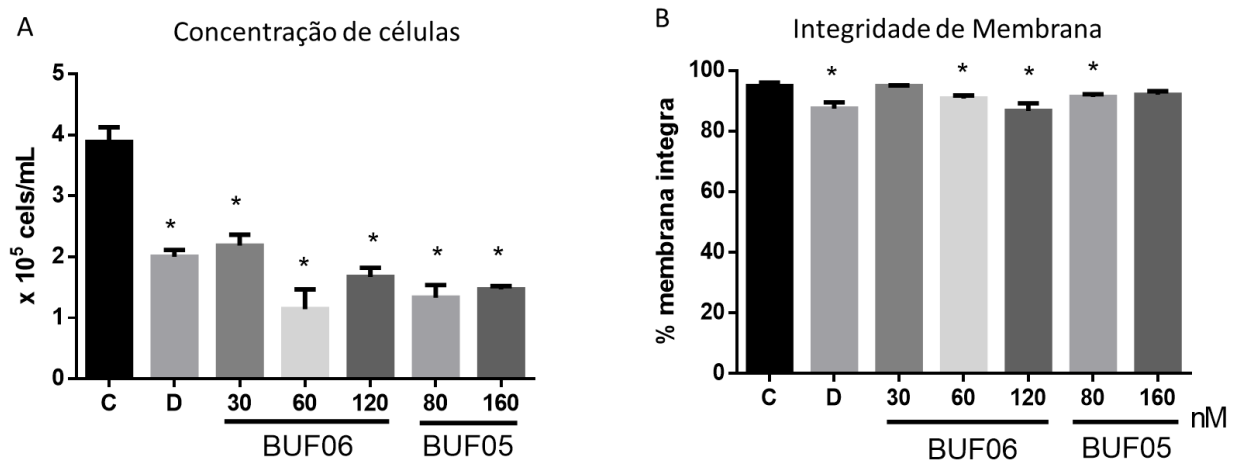
4.3 Avaliação da viabilidade e morfologia de células PC-3 após tratamento com os bufadienolídeos

A viabilidade celular (concentração de células e integridade de membrana citoplasmática) foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo (IP) como agente fluorogênico (**Figura 10 e 11**). A doxorrubicina foi usada como controle positivo em todos os experimentos. Enquanto o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%). A amostra BUF-06 (nas concentrações de 30, 60, 120 nM) e a BUF-05 (nas concentrações de 80 e 160 nM) foram analisadas após 24 e 48 horas de incubação.

Após 24 horas de incubação (**Figura 10**), a concentração do número de células foi reduzida em todas as concentrações de ambos os bufadienolídeos para aproximadamente metade

do número de células do controle. Por outro lado, para a integridade de membrana, foi possível observar uma redução discreta redução do número de células viáveis, ainda que significativa, para 3-acetato de bufalina (BUF06) nas concentrações de 60 (90,87%) e 120 nM (89%) e para bufalina (BUF05) nas concentrações de 80 nM (91,74%). A doxorrubicina também ocasionou queda apenas discreta (para cerca de 88%) da integridade de membrana.

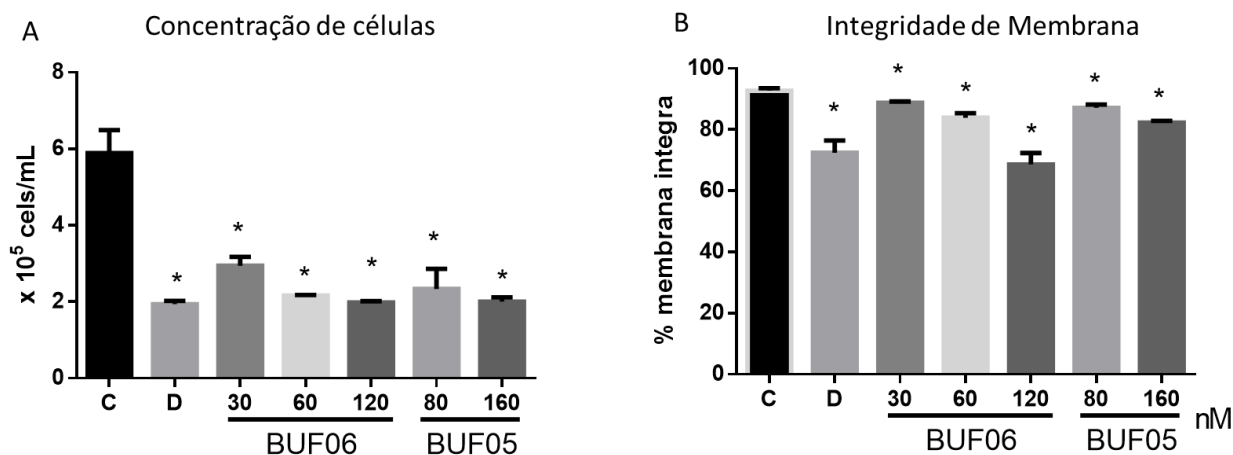
Figura 10. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF-06) e bufalina (BUF-05) sobre a concentração de células (A) e integridade de membrana (B) na linhagem celular PC3, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir os compostos testados. Doxorrubicina (0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo (D). As barras representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * $p < 0,001$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo pós teste de Newman Keuls.

Para a incubação em 48 horas (**Figura 11**), foi observado queda do número de células de forma concentração dependente e mais acentuada em relação a 24 horas de incubação diminuindo para cerca $2,0 \times 10^5$ células/mL em todas as concentrações testadas de ambos os bufadienolídeos. Para os resultados de integridade de membrana, diferentemente do ocorrido no intervalo de 24 horas de incubação, os bufadienolídeos mostraram diminuição de células viáveis ainda mais acentuada com cerca 68,61% de células viáveis para maior dose BUF-06 (120 nM) e 82,30% para a maior dose de BUF-05 (160). Ainda assim, na demais doses foi possível observar diminuição de forma concentração dependente na integridade de membrana para ambos os bufadienolídeos.

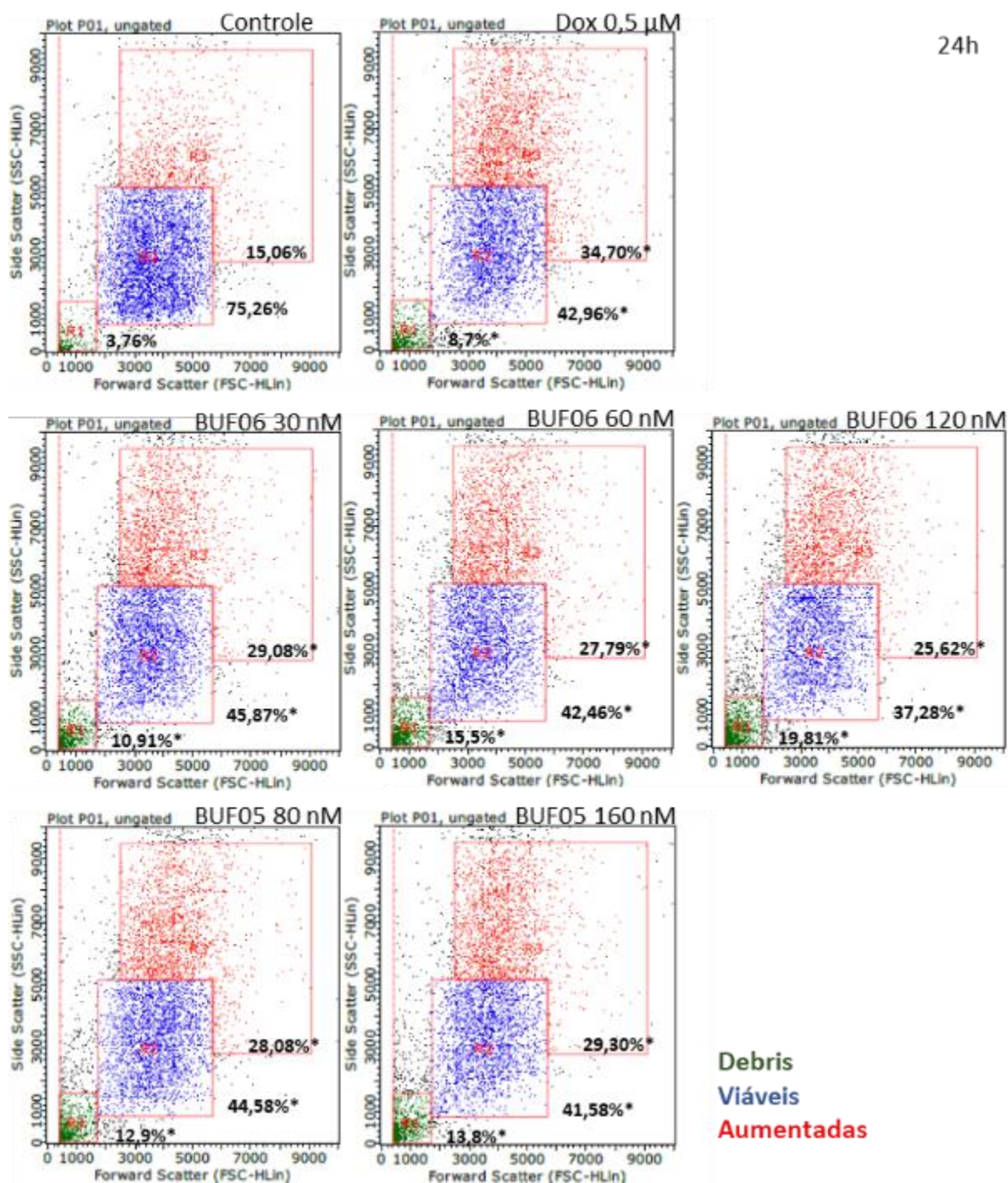
Figura 11. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF-06) e bufalina (BUF-05) sobre a concentração de células (A) e integridade de membrana (B) na linhagem celular PC3, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 48 horas de incubação.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir os compostos testados. Doxorubicina (0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo (D). As barras representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * $p < 0,001$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo pós teste de Newman Keuls.

O estudo morfológico foi estabelecido pela análise do volume e granulosidade celular por citometria de fluxo (**Figura 12 e 13**). A análise do resultado foi feita com de gráficos de dispersão representativos dos eventos celulares. Após 24 (**Figura 12**) e 48 h (**Figura 13**) de incubação em diferentes concentrações, foi observado um aumento do número de células com padrão apoptótico, em todas as concentrações, conforme observado nos gráficos pela diminuição do volume, FSC (*forward scatter*); e menor granulosidade, SSC (*side scatter*) quando comparado ao controle negativo. Foi observado ainda, um aumento do número de células com maior granulosidade e volume celular em todas as concentrações utilizadas. O tratamento com doxorubicina também apresentou padrão celular típico de apoptose.

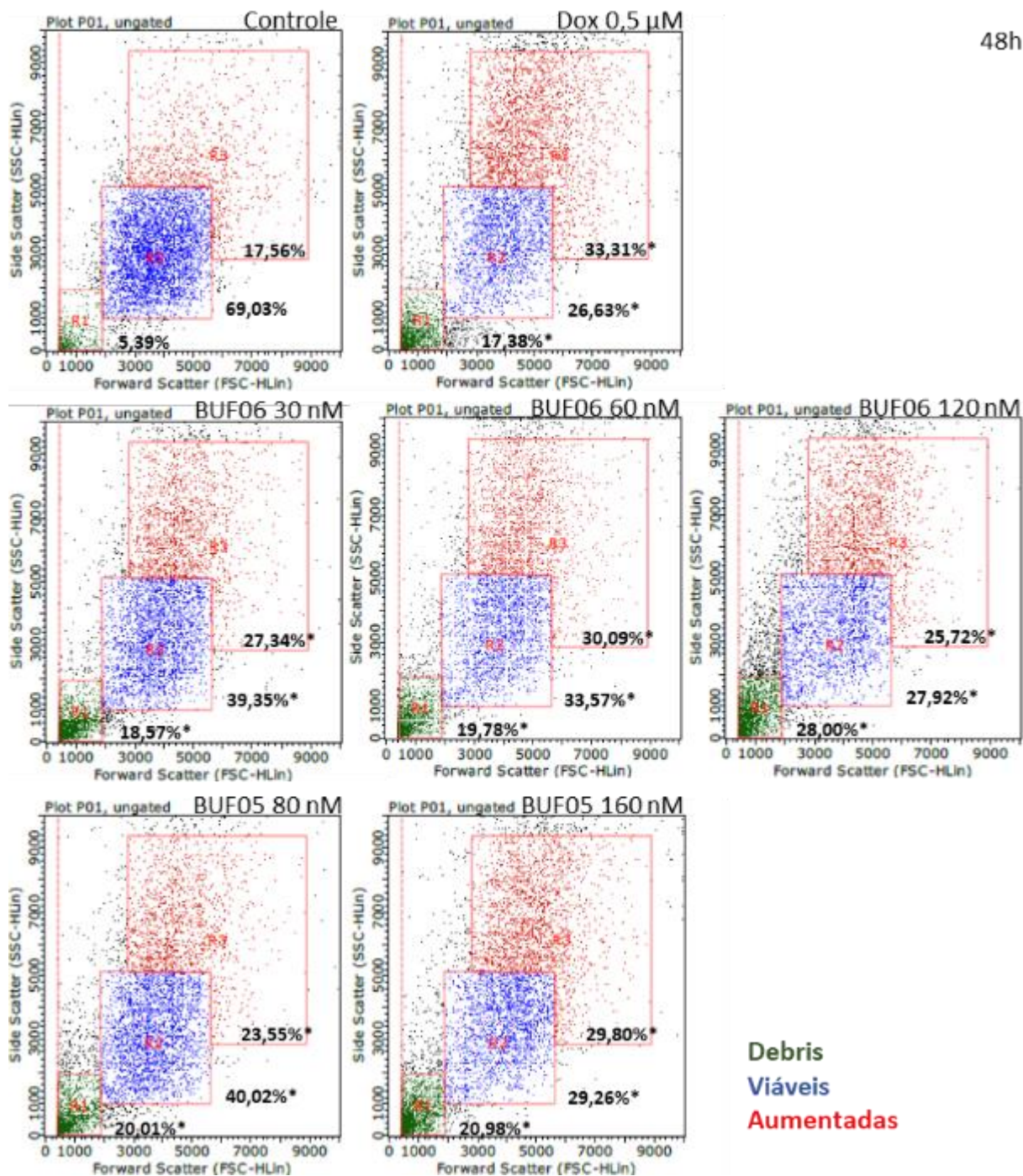
Figura 12. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre a morfologia de células PC3 determinado por citometria de fluxo após 24 horas de incubação.



Utilizou-se o FSC (*Forward scatter* – desvio da luz para frente) e SSC (*Side scatter* – desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo das células e granulosidade, ou complexidade interna, da célula, respectivamente, após 24 horas de incubação. O dot plot colorido em verde representa o debris celular, em azul as células viáveis e em vermelho as células com volume e granulosidade aumentadas. Cinco mil eventos foram

contados em cada experimento. * $p < 0,001$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo pós teste de Newman Keuls.

Figura 13. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre a morfologia de células PC3 determinado por citometria de fluxo após 48 horas de incubação.



Utilizou-se o FSC (*Forward scatter* – desvio da luz para frente) e SSC (*Side scatter* – desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo das células e granulosidade, ou complexidade interna, da célula, respectivamente, após 48 horas de incubação. O dot plot colorido em verde representa o debris celular, em azul as

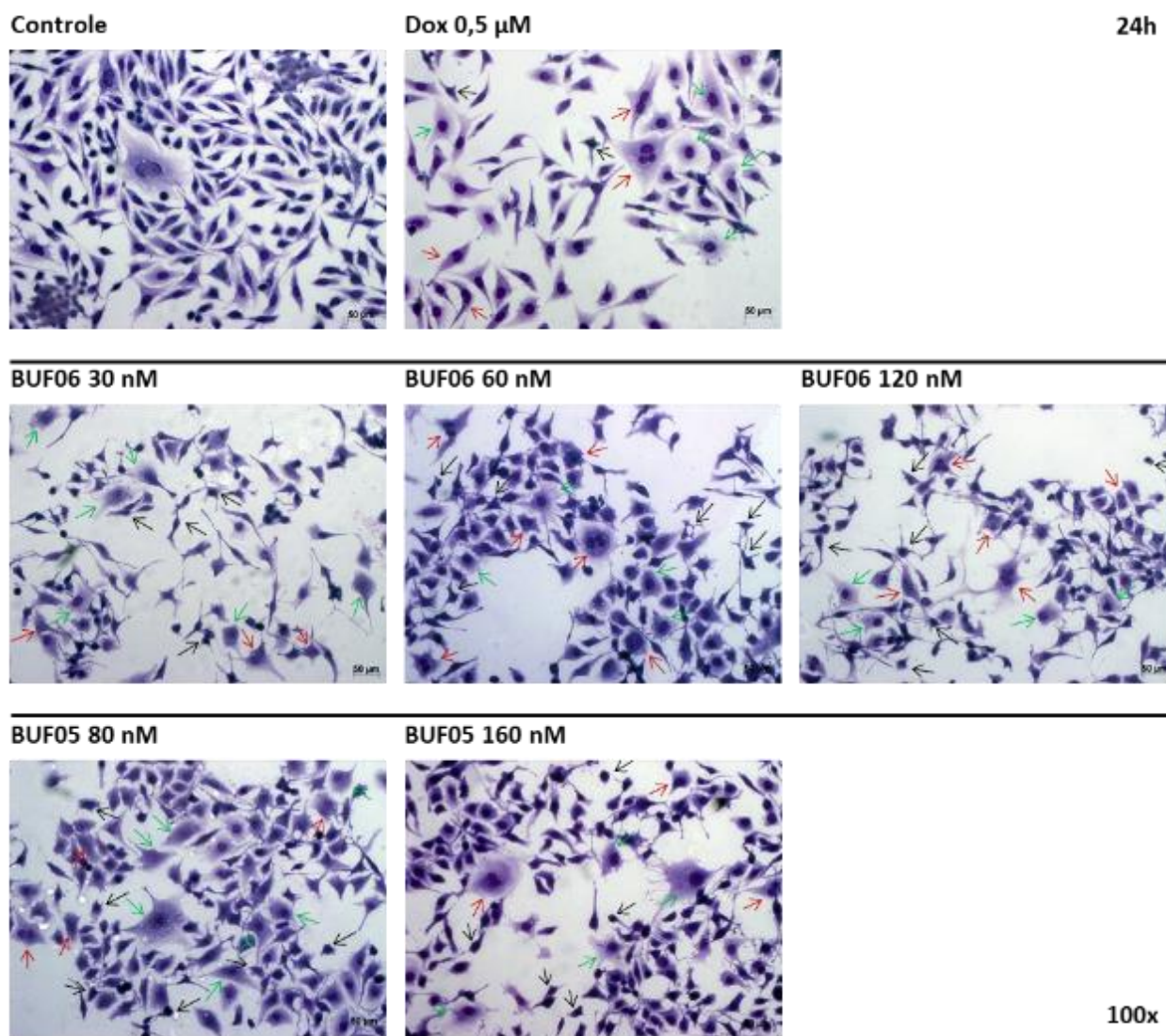
células viáveis e em vermelho as células com volume e granulosidade aumentadas. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * $p < 0,001$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo pós teste de Newman Keuls.

4.4 Avaliação da morfologia de células PC3 por coloração diferencial após tratamento com os bufadienólídeos

A avaliação da morfologia celular por coloração de Panótico Rápido permite diferenciar núcleo do citoplasma, bem como detalhes das características morfológicas das células. A doxorubicina (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%). As células foram, então, analisadas após 24 e 48 horas de incubação.

Após 24 horas de incubação (**Figura 14**), foi possível observar aspectos morfológicos diferentes do controle negativo a partir da menor concentração de 3-acetato de bufalina (30 nM) e bufalina (80 nM). Dentre essas características podemos citar o surgimento de células com padrão apoptótico como picnose, principalmente, apesar de poder ser encontrada células com fragmentação nuclear e formação de *blebbings* (pequenas prolongações e/ou alterações na membrana celular). Além disso, observou-se o aparecimento de células com padrão necrótico com aumento de volume celular e citoplasma com aspecto translúcido. Houve ainda o surgimento de células multinucleadas em todos as doses testadas de ambos os bufadienólídeos.

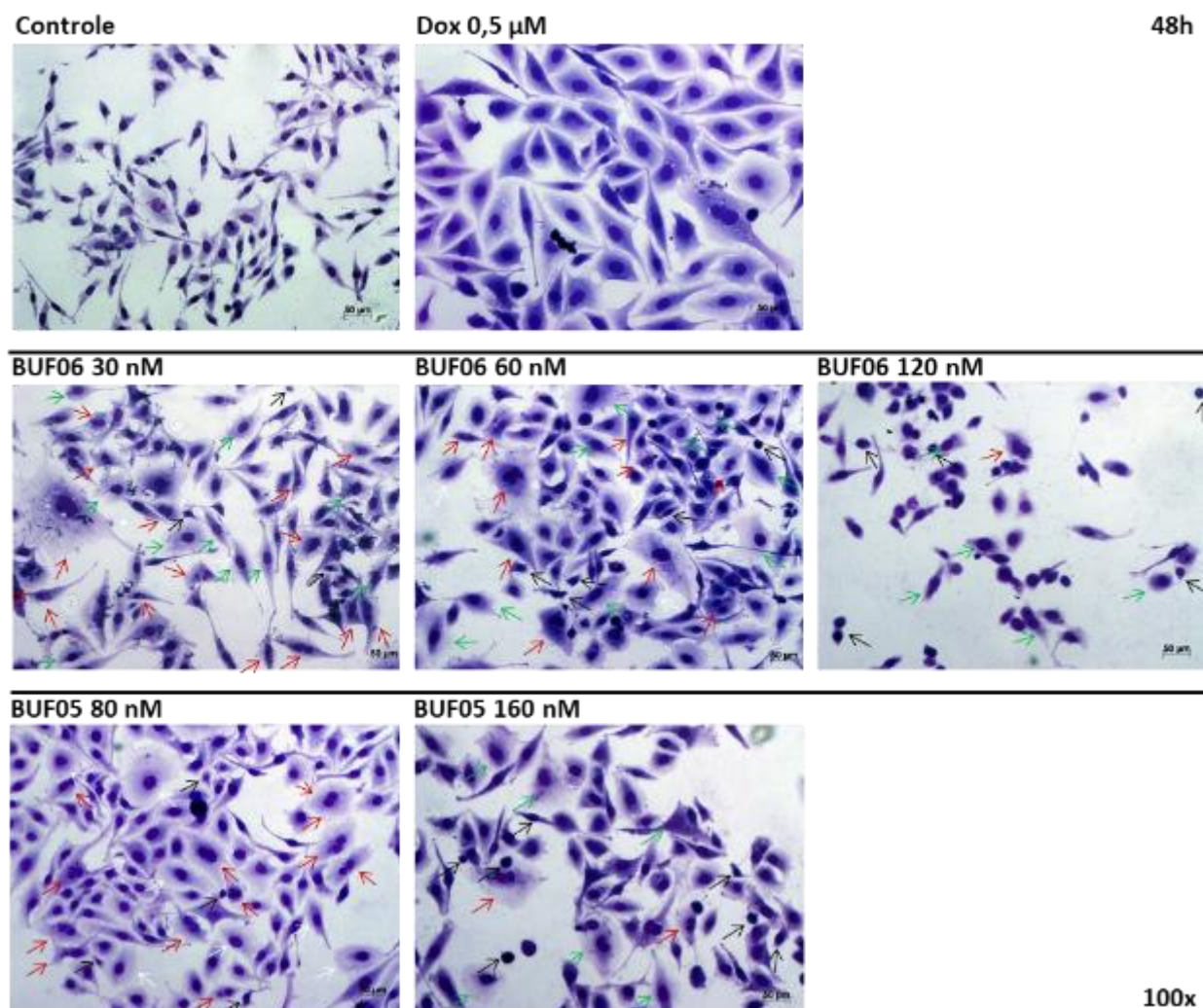
Figura 14. Mudanças morfológicas provocadas pelos bufadienólídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) após 24 horas de incubação em células PC-3.



Análise por microscopia ótica (aumento de 100x) em lâminas coradas por Panótico Rápido®. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras. Doxorubicina (0,5 µM) foi utilizada como controle positivo. Setas pretas mostram células com padrão apoptótico. Setas verdes mostram células com padrão necrótico. Setas vermelhas mostram células multinucleadas.

Os efeitos observados após 48 horas como mostra a **Figura 15** são os mesmos vistos para 24 horas com aparecimento de células com padrão apoptótico e necrótico, porém são mais intensos.

Figura 15. Mudanças morfológicas provocadas pelos bufadienólídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) após 48 horas de incubação em células PC-3.



Análise por microscopia ótica (aumento de 100x) em lâminas coradas por Panótico Rápido®. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras. Doxorubicina (0,5 µM) foi utilizada como controle positivo. Setas pretas mostram células com padrão apoptótico. Setas verdes mostram células com padrão necrótico. Setas vermelhas mostram células multinucleadas.

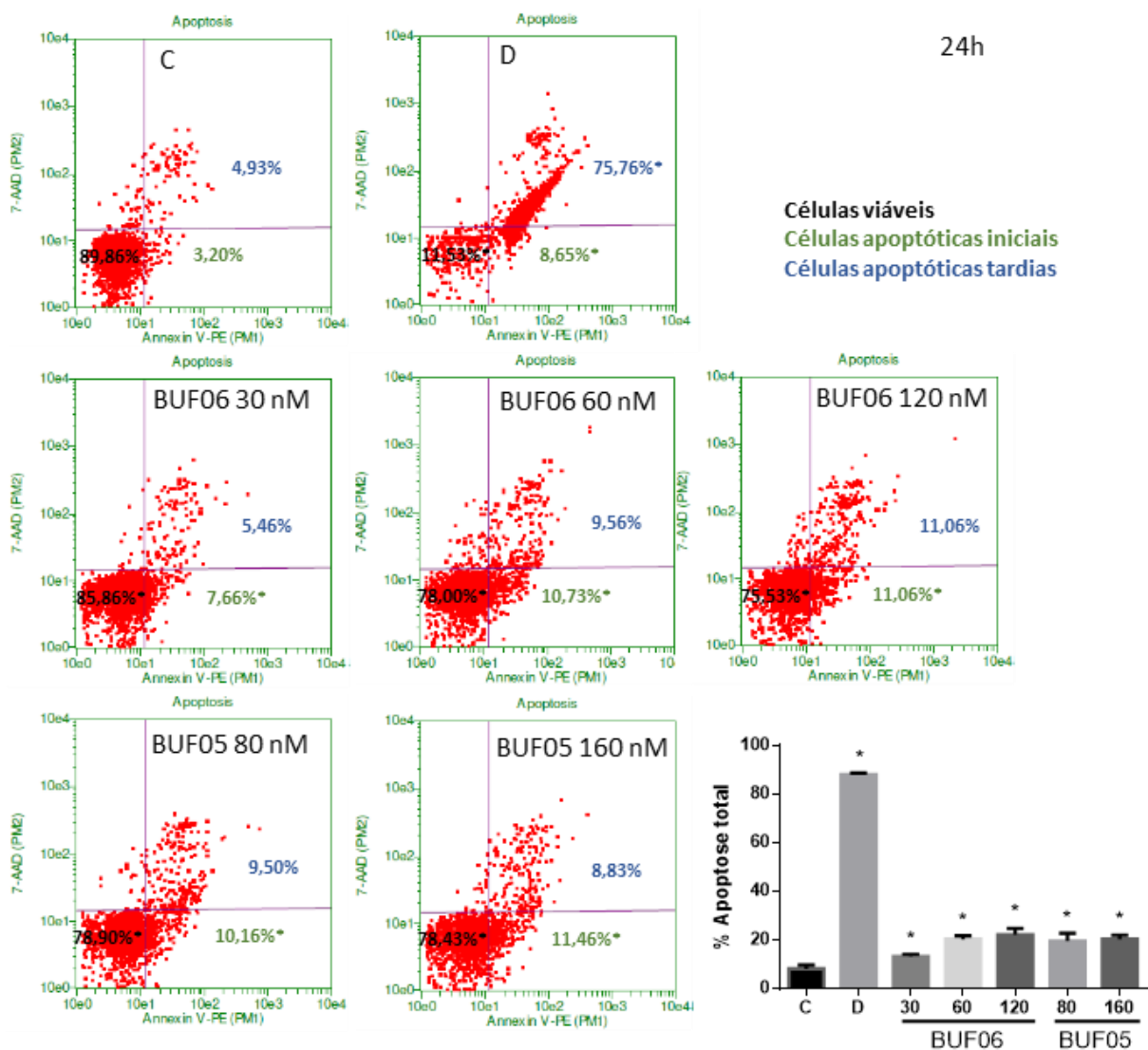
4.5 Determinação de externalização de fosfatidilserina

A externalização de fosfatidilserina (PS) é considerada um marco importante das fases iniciais do processo apoptótico e é utilizada nesse trabalho como marcador para tal (MARTIN et al. 1995). Logo, as células tratadas com os compostos durante 24 e 48 horas e os controles negativo (DMSO 0,1%) e positivo (doxorubicina 0,5 µM) foram incubadas com anexina V

(proteína com alta afinidade por PS) com o objetivo de avaliar a porcentagem de células com PS externalizada sobre a superfície da membrana celular.

Os resultados da **Figura 16** mostram que após a incubação de 24 horas existe um aumento do número de células principalmente em apoptose inicial, não tendo aumento significativo de apoptose tardia em todas as doses testadas de ambos os bufadienolídeos (BUF06 e BUF05). Ao se analisar a quantidade total de células coradas com Anexina V, ou seja, sem a diferenciação entre apoptose inicial e tardia, podemos observar aumento significativo de apoptose total em todas as concentrações testadas em ambos os bufadienolídeos, evidenciando a participação da apoptose na morte celular induzidas pelos bufadienolídeos.

Figura 16. Efeito do bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre a externalização da fosfatidilserina em células PC3 determinado por citometria de fluxo após 24 horas de incubação.

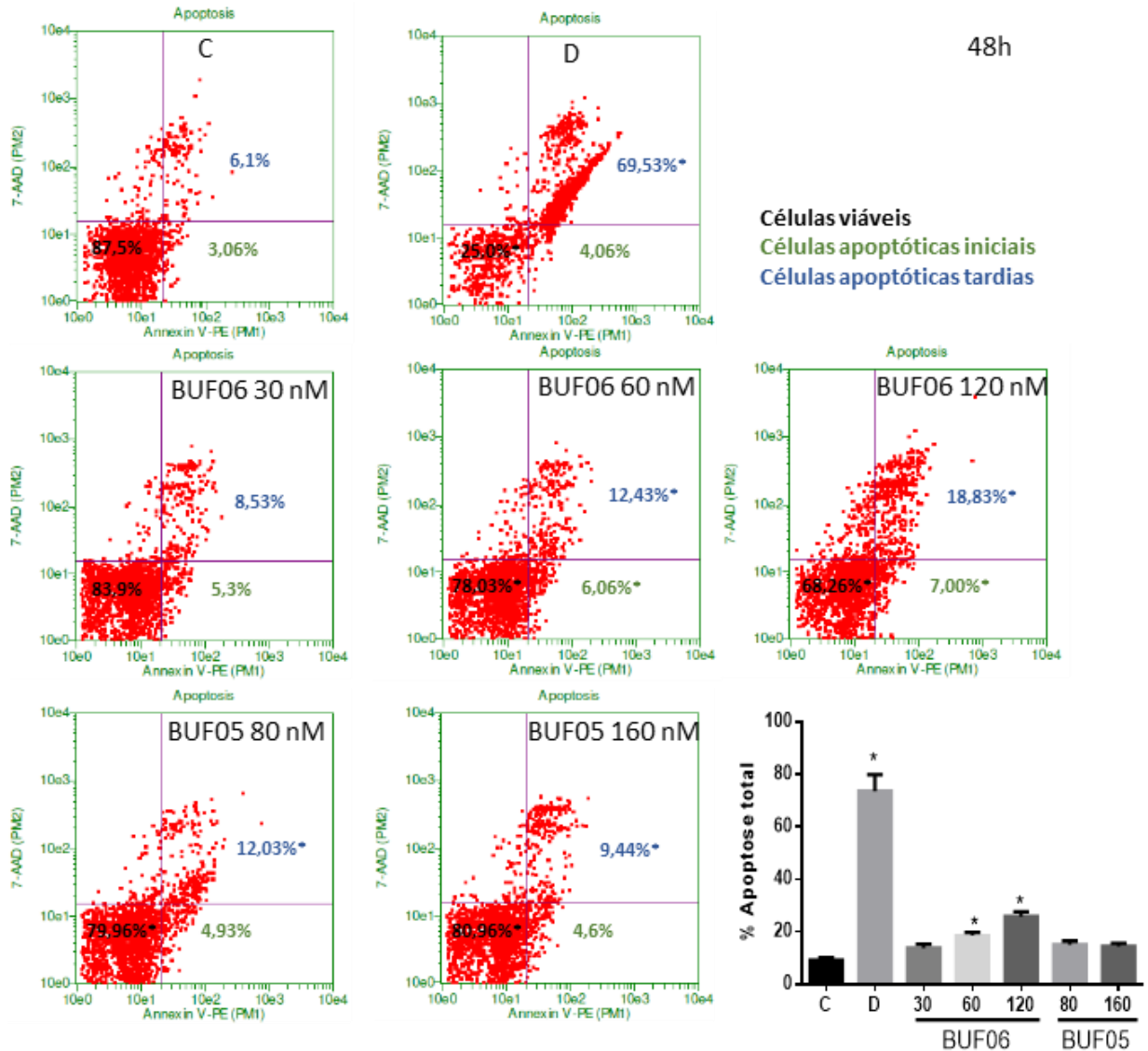


Utilizou-se Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substancias testadas. Doxorubicina (0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram adquiridos em cada experimento. * $p < 0,05$; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman Keuls.

Já em relação à incubação de 48 horas (**Figura 17**), foi observado aumento significativo de células em apoptose tardia (exceto na dose de 30 nM de BUF-06) e aumento de células em apoptose inicial somente nas doses de 60 e 120 nM (BUF-06) em comparação ao controle

negativo. Em relação à quantidade de células em apoptose total, apenas as doses de 60 e 120 nM de BUF-06 obtiveram aumento significativo.

Figura 17. Efeito do bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre a externalização da fosfatidilserina em células PC3 determinado por citometria de fluxo após 48 horas de incubação.



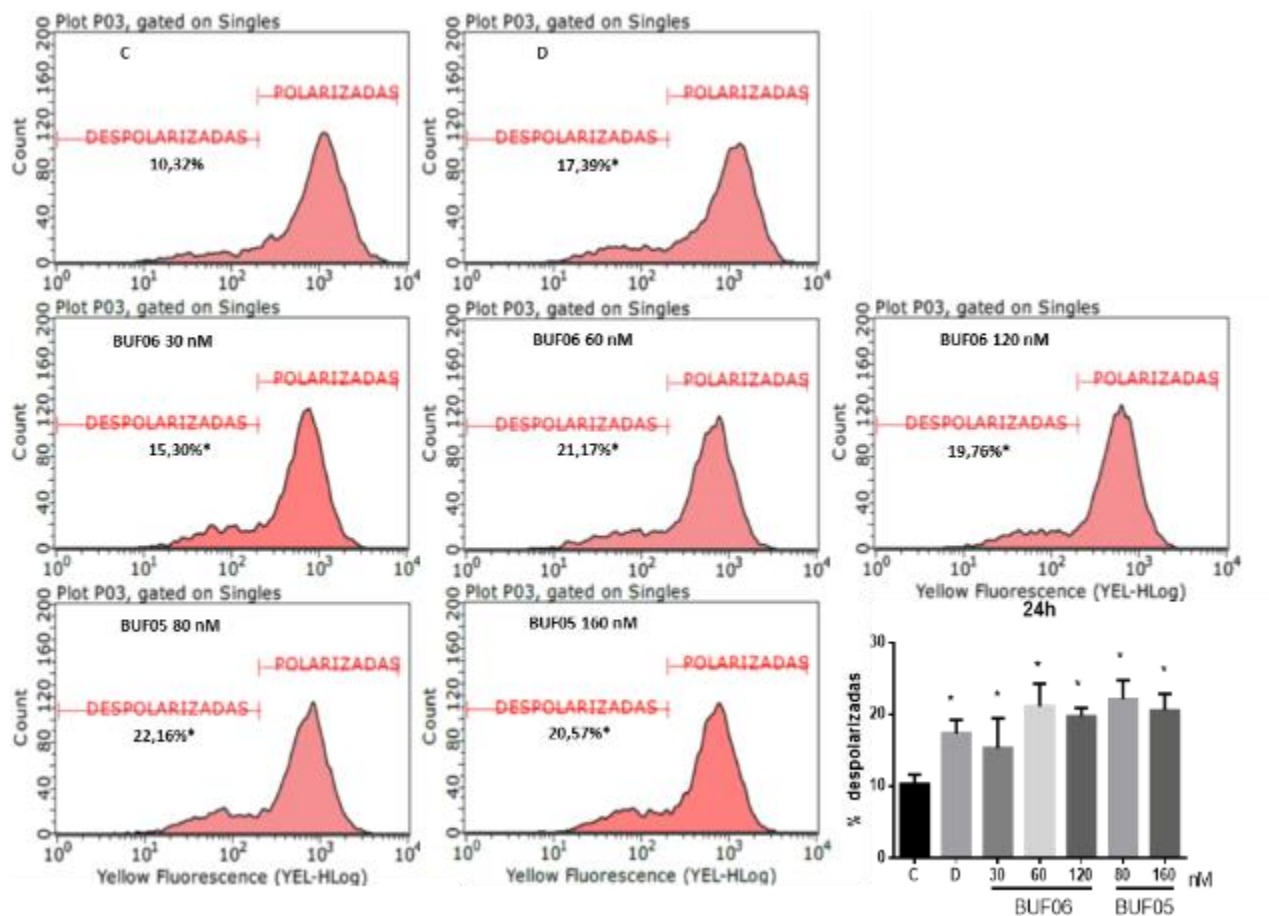
Utilizou-se Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram adquiridos em cada experimento. * $p < 0,05$; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman Keuls.

4.6 Efeito das amostras de bufadienolídeos sobre a despolarização mitocondrial em células de PC3

Com o intuito de avaliar o papel da mitocôndria na apoptose induzida por 3-acetato de bufalina (BUF-06) e bufalina (BUF-05), a capacidade de induzir alterações no potencial transmembrânico da mitocôndria foi observada por citometria de fluxo através da incorporação do corante Rodamina 123 durante 24 e 48 horas de incubação.

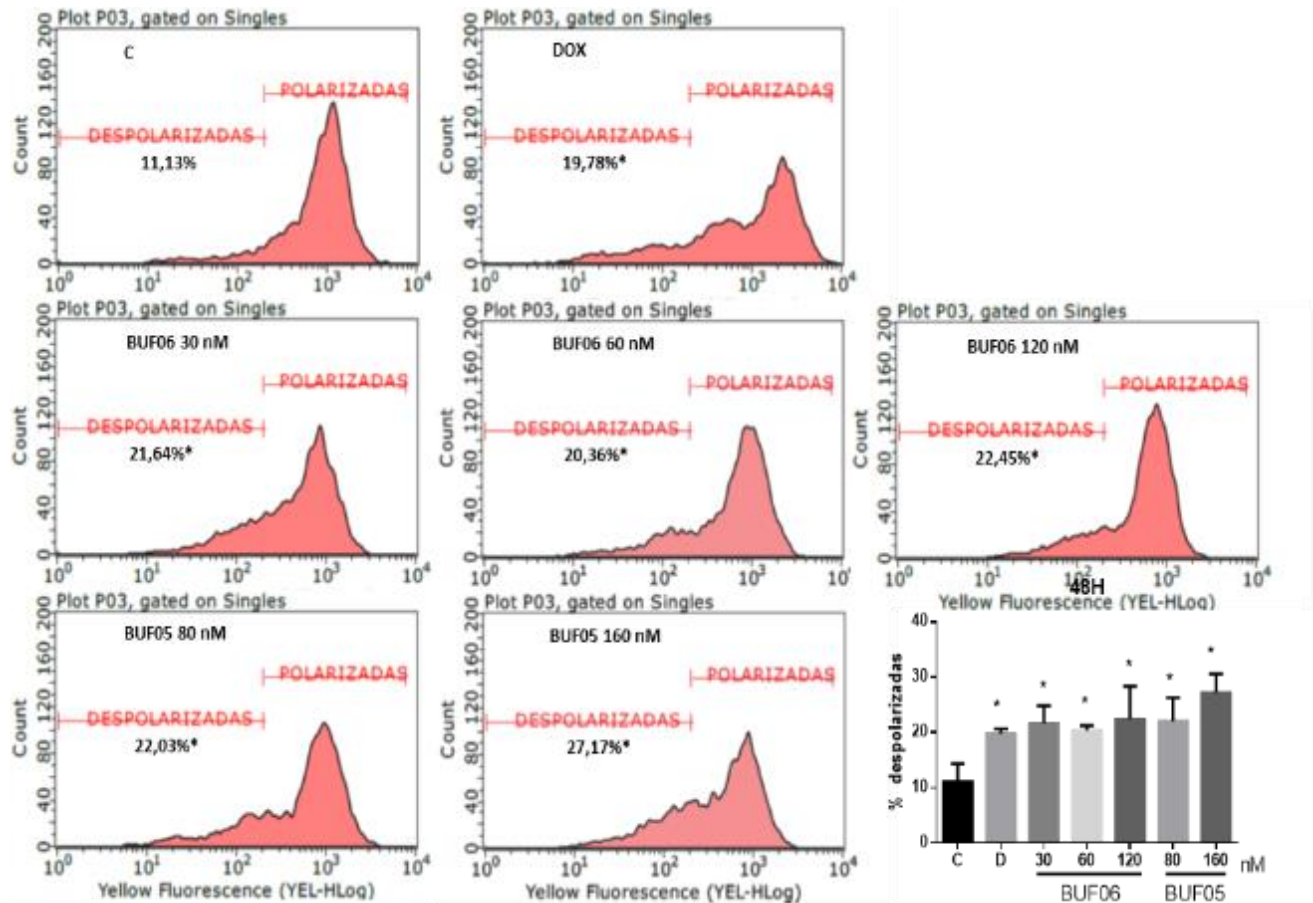
Para ambos os tempos de incubação (24 e 48 horas) (**Figura 18 e 19**), foi possível observar aumento significativo entre 15,30 % a 22,16% sem diferenças entre as doses dos bufadienolídeos testados, porém mais acentuado após 48 horas de incubação com aumento da despolarização entre 20,36% e 27,17%. Esses resultados podem indicar participação da via intrínseca da apoptose.

Figura 18. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre o potencial transmembrânico em células PC-3 determinado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123, após 24 horas de incubação.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondentes à média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * $p < 0,001$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman Keuls.

Figura 19. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre o potencial transmembrânico em células PC-3 determinado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123, após 48 horas de incubação.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondentes à média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * $p < 0,001$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman Keuls.

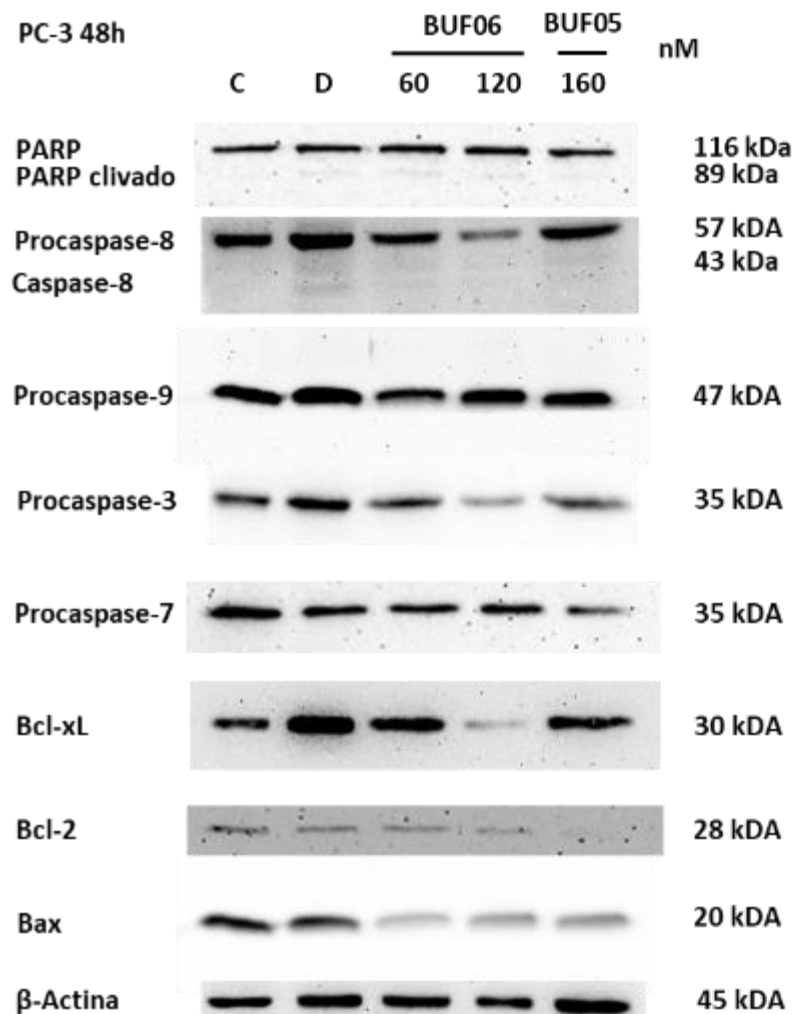
4.7 Efeito dos bufadienolídeos sobre as vias apoptóticas em células PC-3

Afim de se confirmar quais as possíveis vias de apoptose envolvidas na morte induzida por 3-acetato de bufalina e bufalina, foram realizadas análises por *western blot* o qual foi utilizado para analisar qualitativamente a expressão de proteínas.

Após o tempo de incubação de 48 horas, observou-se a expressão de componentes relacionados a indução de apoptose (**Figura 20**). A clivagem de PARP é utilizada como indício confirmatório de apoptose e em nossos resultados podemos observar discreta clivagem de PARP para todas concentrações utilizadas, não havendo diferença nas intensidades das bandas. Ao se

analisar as caspases envolvidas na indução de apoptose, apenas a caspase 8 foi discretamente ativada, por todas as concentrações de ambos bufadienolídeos testados, perante o aparecimento de seus produtos clivados. Enquanto que, a caspase 9, responsável pela via intrínseca, não se mostrou clivada da mesma forma que as caspases efetoras 3 e 7. A ativação de caspase 8 indica, então, a participação da via extrínseca na indução de apoptose por ambos os bufadienolídeos estudados. Os componentes anti-apoptóticos (Bcl-xL e Bcl-2) e pro-apoptóticos (Bax) também foram analisados. Enquanto Bcl-xL sofreu diminuição expressiva apenas na maior concentração (120 nM) de 3-acetato de bufalina, Bcl-2 teve sua expressão diminuída para todas as concentrações dos bufadienolídeos, no entanto mais expressivamente para a concentração de bufalina (160 nM) testada. O componente pro-apoptótico Bax, por sua vez, teve suas expressões diminuídas em todas as concentrações de ambos os bufadienolídeos. O balanço entre os componentes pro e anti-apoptóticos promove ação da via intrínseca de apoptose e, nesse caso, existe indicativo de favorecimento da não indução de apoptose.

Figura 20. Efeito dos bufadienólídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre as proteínas de controle da via da apoptose, PARP, caspases 8, 9, 3, 7 e proteínas da família Bcl-2 (Bcl-xL, Bcl-2 e Bax).



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo (D). Ensaio do western blot realizados em dois experimentos independentes através da extração de proteínas totais incubadas por 48 horas com os bufadienólídeos 3-acetato de bufalina (BUF-06) e bufalina (BUF-05).

4.7 Avaliação do efeito dos bufadienólídeos sobre o conteúdo de DNA nuclear de células PC3

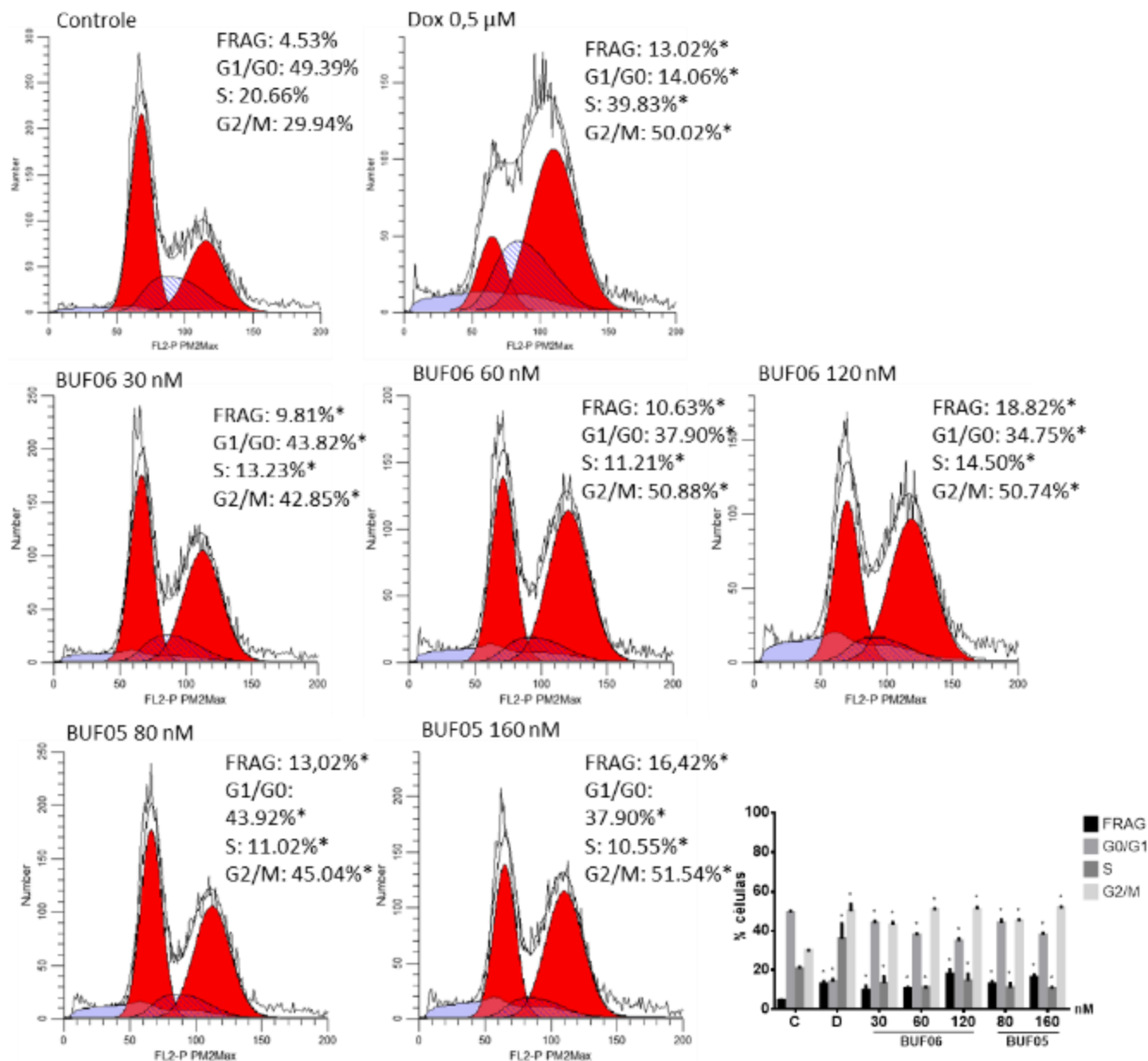
O conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliado por citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo (IP) dessa vez com o conteúdo celular lisado. A doxorrubicina (0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo em todos os experimentos.

O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) usado para diluir as amostras. As células foram, então, analisadas após 24 e 48 horas de incubação com os compostos bufalina-3-acetato e bufalina.

Nessa avaliação, os resultados apresentados na **Figura 21** mostram que, ao se analisar a porcentagem de células com DNA referente a fase G1/G0, foi possível observar a diminuição significativa de células de forma concentração dependente para BUF-06 e também para BUF05. Em relação a fase S, houve a diminuição significativa para ambos os bufadienolídeos, porém não de forma concentração dependente. Já em relação a fase G2/M, houve a aumento significativo de 30% para cerca de 50% de células nessa fase. Observou-se ainda o aumento da quantidade de DNA fragmentado sub-G1 em todas as doses de ambos os bufidienolídeos, o que geralmente indica fragmentação nuclear resultante de processo apoptótico.

As análises de 48 horas de incubação com os bufadienolídeos (**Figura 22**) mostraram resultados semelhantes aos observados após 24 horas, com exceção para a concentração de 30 nM de BUF-06 a qual não apresentou nenhuma alteração da quantidade de células com DNA referentes as fases G1/G0, S e G2/M.

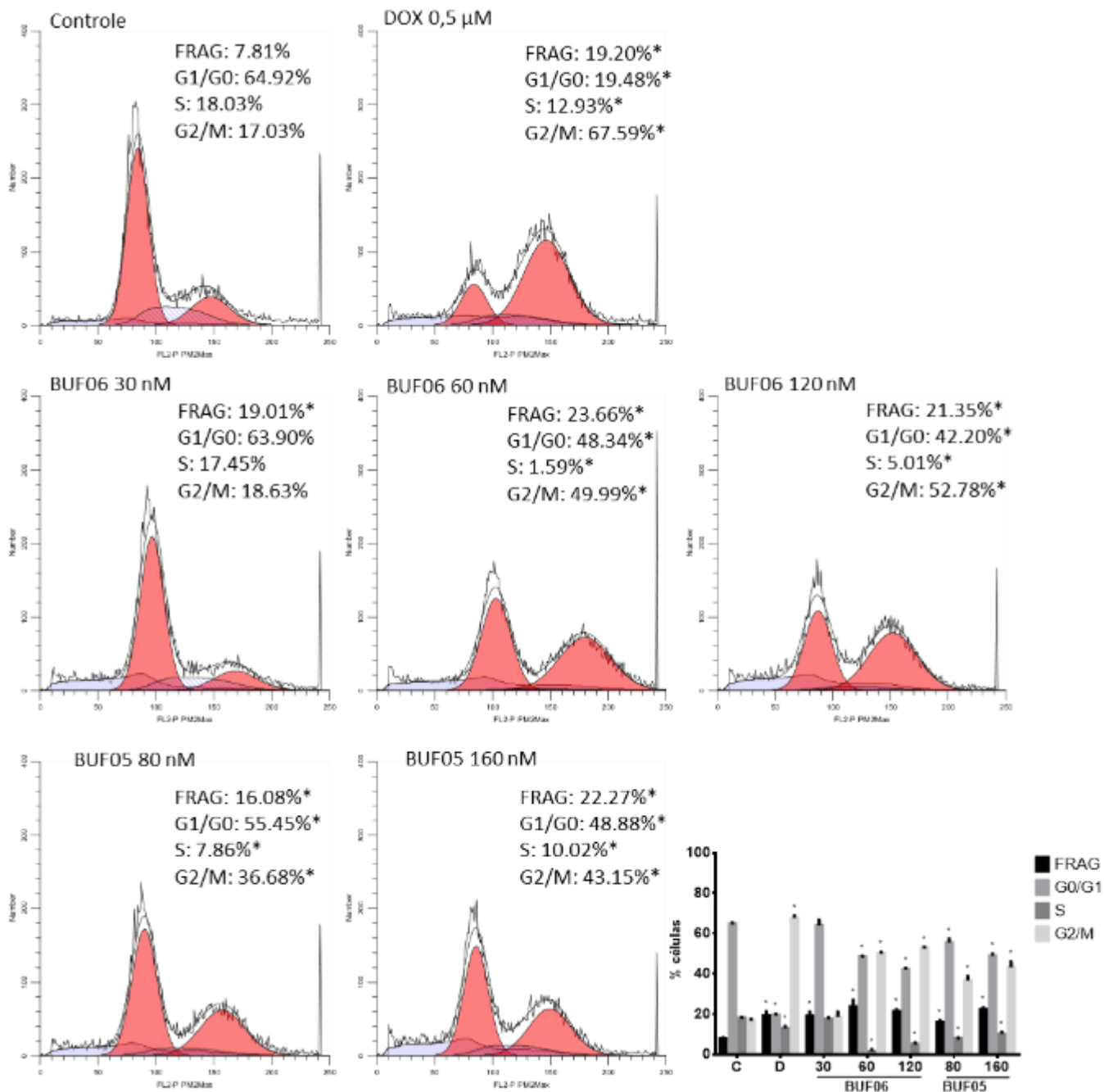
Figura 21. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF-06) e bufalina (BUF-05) sobre o conteúdo de DNA nuclear de células PC3 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de



propídeo, após 24 horas de incubação.

A figura apresenta os valores correspondentes à média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. * $p < 0,05$; quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido pelo teste de Newman Keuls. Doxorubicina foi usada como controle positivo.

Figura 22. Efeito do bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre o conteúdo de DNA nuclear de células PC-3 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de



propídeo, após 48 horas de incubação.

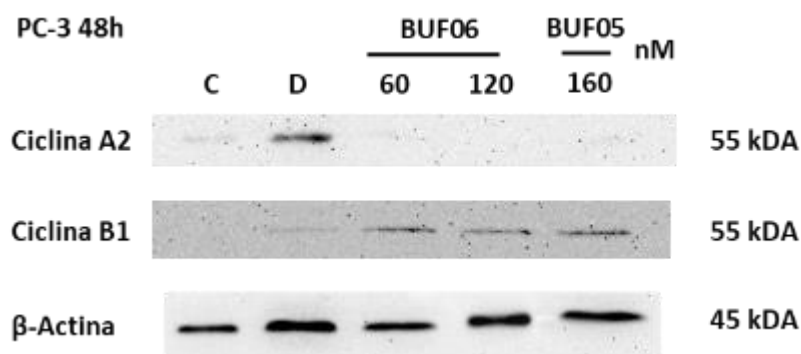
A figura apresenta os valores correspondentes à média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. * $p < 0,05$; quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido pelo teste de Newman Keuls. Doxorubicina foi usada como controle positivo.

4.8 Efeitos dos bufadienolídeos sobre ciclinas controladoras do ciclo celular

No intuito de verificar o papel das ciclinas responsáveis pelas fases G2 e M, foram analisadas as expressões de ciclina B1 e ciclina A2 após a incubação de 3-acetato de bufalina e bufalina por 48 horas em células da linhagem PC-3.

A ciclina A2, quando associada a CDK1, é responsável pela progressão da fase G2. Em nossos resultados, a ciclina A2 não teve suas expressões detectadas quando da incubação por ambos os bufadienolídeos. Já a ciclina B1, responsável pela entrada e saída de da fase M do ciclo celular, teve sua expressão aumentada quando tratada pelos bufadienolídeos (**Figura 23**). Tais resultados podem indicar que a parada do ciclo celular seja na fase mitótica (M).

Figura 23. Efeitos dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre ciclinas controladoras do ciclo celular.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo (D). Ensaio do western blot realizados em dois experimentos independentes através da extração de proteínas totais incubadas por 48 horas com os bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF-06) e bufalina (BUF-05).

4.9 DANO AO DNA POR BUFODIENOLÍDEOS.

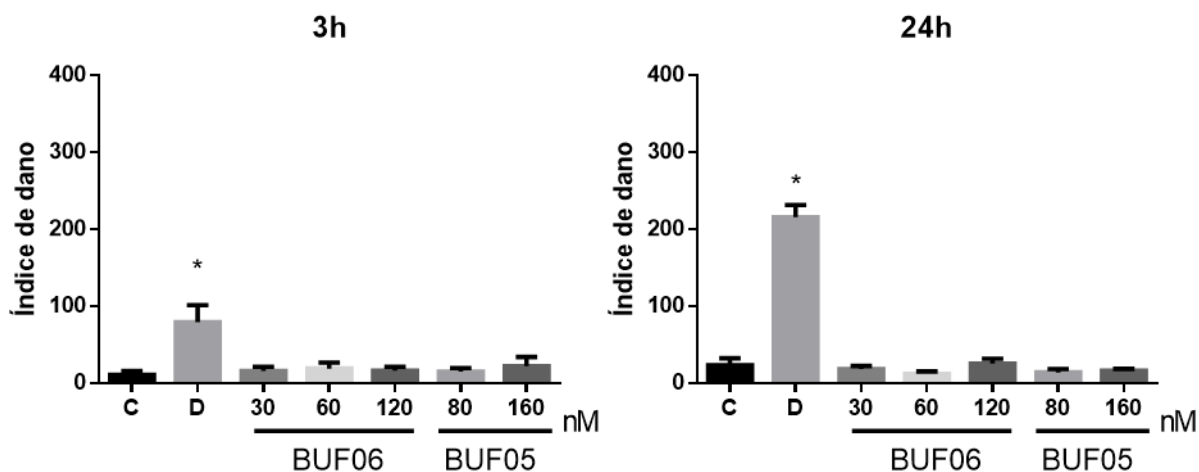
4.9.1 Avaliação do potencial de dano ao DNA pelo teste do cometa em células de próstata PC3

A avaliação do potencial de dano ao DNA pelos bufadienolídeos em PC3, foi realizado inicialmente pelo ensaio do cometa em condições alcalinas, o que torna o teste mais sensível à

detecção de danos. A doxorubicina, agente reconhecidamente genotóxico, foi usada como controle positivo. Os compostos testese os controles foram incubados por 6 e 24 horas.

Análise das lâminas de cometa mostrou que nenhum dos bufadienolídeos foram capazes de produzir quebra de fita dupla ou simples do DNA (**Figura 24**).

Figura 24. Efeito dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF06) e bufalina (BUF05) sobre a indução de dano ao DNA em células de câncer de próstata (PC-3) após 3 e 24 horas de incubação.



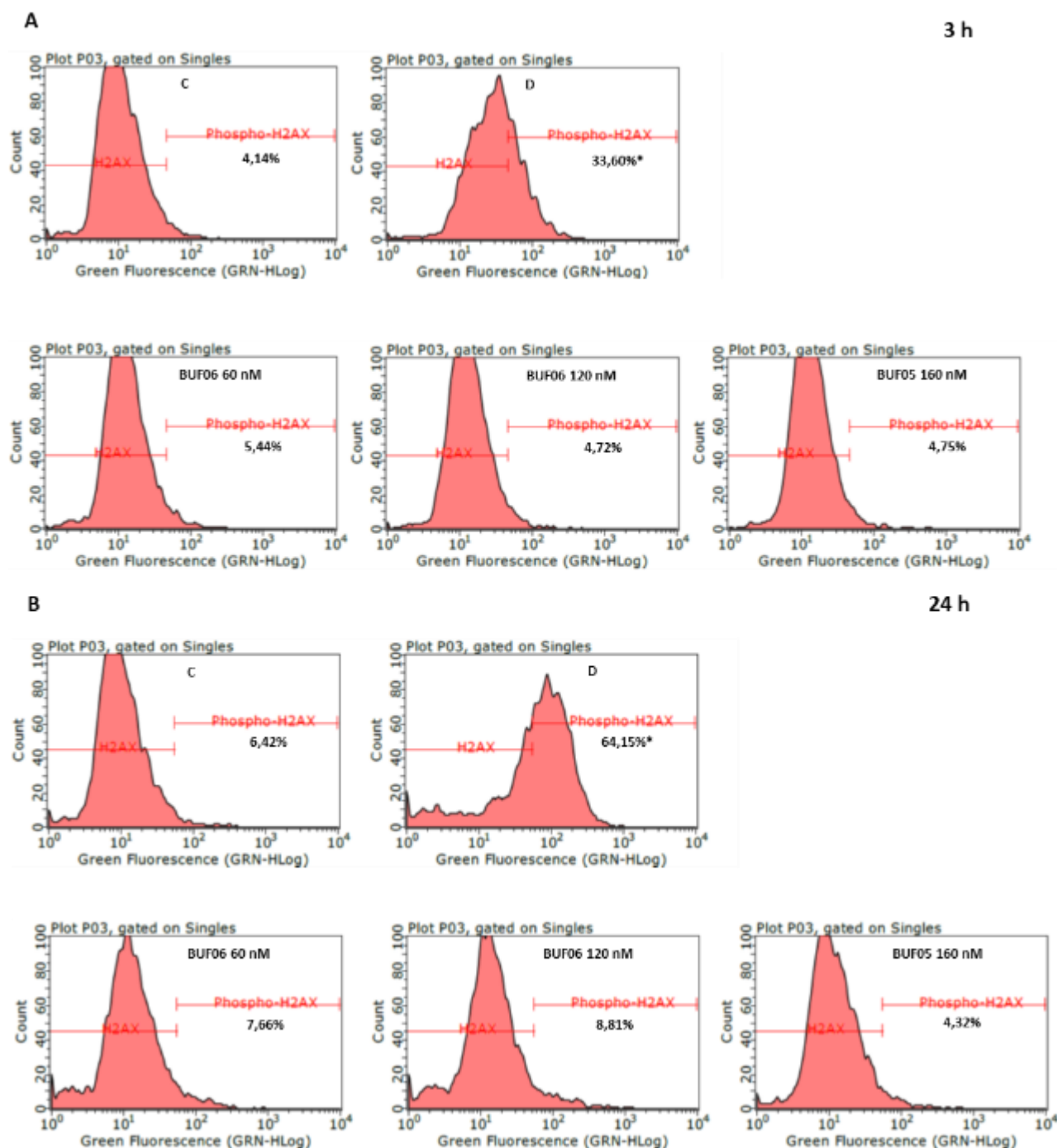
O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondem à média \pm E.P.M de três experimentos independentes. * $p < 0,001$; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman Keuls.

4.9.2 Avaliação da fosforilação de λ H2AX em células de próstata PC3

A fim de se confirmar a ausência de dano ao DNA, utilizou-se a marcação de λ H2AX, técnica bastante sensível, por citometria de fluxo. A doxorubicina mais uma vez foi utilizada como controle positivo e os compostos foram incubados por 3 e 24 horas.

O presente ensaio mostrou que os bufadienolídeos não foram capazes de aumentar a quantidade de λ H2AX fosforilado em nenhuma das concentrações utilizadas (**Figura 24**).

Figura 25. Efeito dos bufadienólídeos 3-acetato de bufalina e bufalina sobre a fosforilação de H2AX em células PC-3 por citometria de fluxo após 3 (A) e 24 (B) horas de incubação.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondem a média de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram adquiridos em cada experimento.

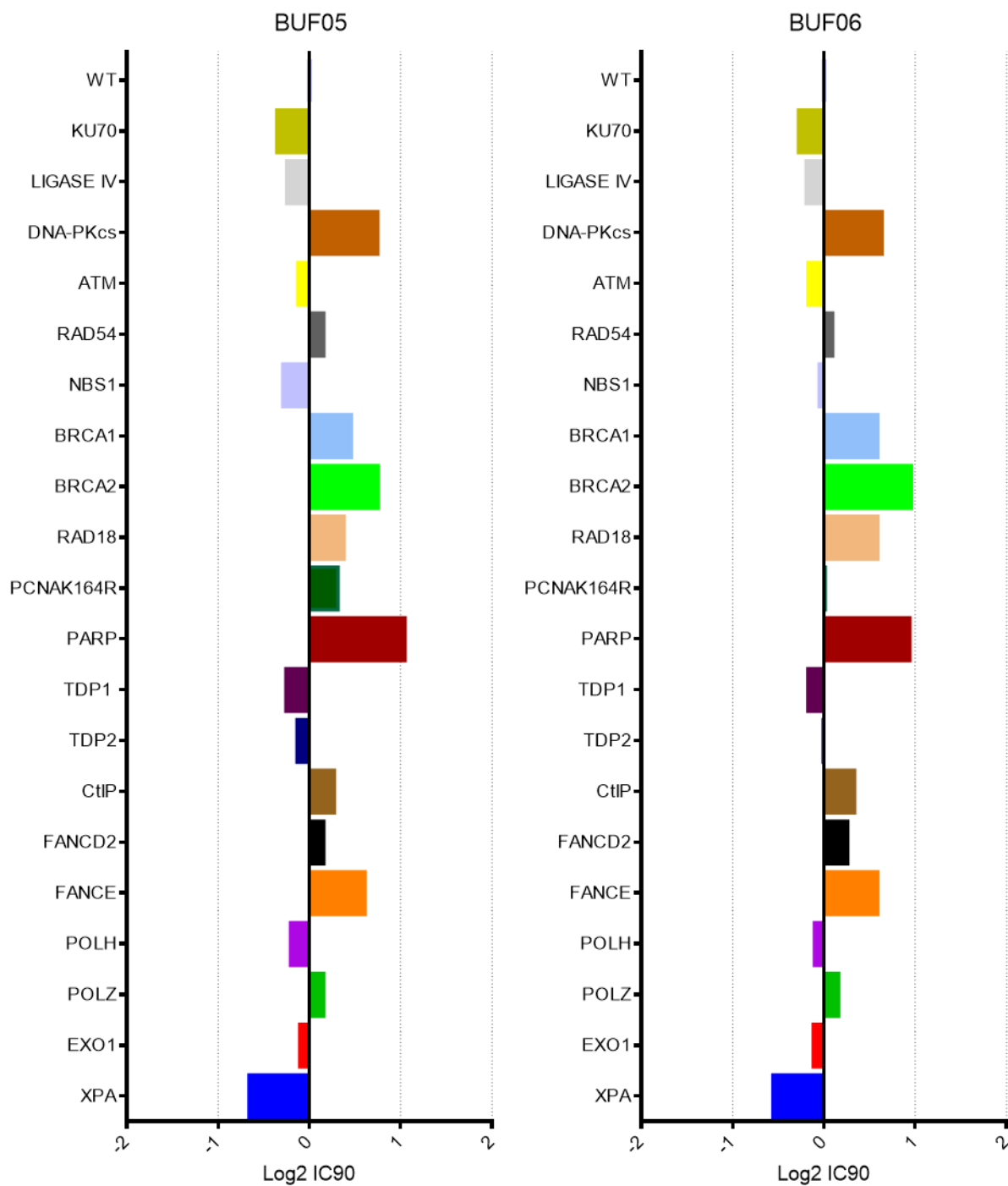
* $p < 0,001$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman Keuls.

4.9.3 Avaliação do envolvimento vias de reparo de DNA por bufadienólídeos.

A fim de avaliar a atuação de 3-acetato de bufalina e bufalina nas vias de reparo de DNA foram realizados ensaios de citotoxicidade (por mensuração de ATP) em um painel de linhagens knockout DT40 para 20 componentes das vias envolvidas no reparo de DNA. Os resultados de IC₉₀ são mostrados na escala logarítmica e em comparação com a linhagem DT40 selvagem (**Figura 26**). Os controles positivos camptotecina, etoposídeo e ICRF-193 foram utilizados.

De forma geral, a IC₉₀ (a concentração que inibe 90% das células) dos bufadienólídeos não diferiram em comparação com IC₉₀ obtida pela linhagem selvagem. No entanto, a linhagem DT40 deficiente em PARP se mostrou duas vezes mais resistente para ambos os bufadienólídeos, o que indica sua possível participação no processo de morte ocasionado pelos compostos. A linhagem deficiente em BRCA2 também se mostrou resistente em relação à linhagem selvagem quando da incubação por 3-acetato de bufalina (BUF-06).

Figura 26. Perfil de sensibilidade para os bufodienólídeos bufalina (BUF05) e 3-acetato de bufalina (BUF-06) indicados no painel da linhagem celular DT40 com deficiência em genes de reparo de DNA.



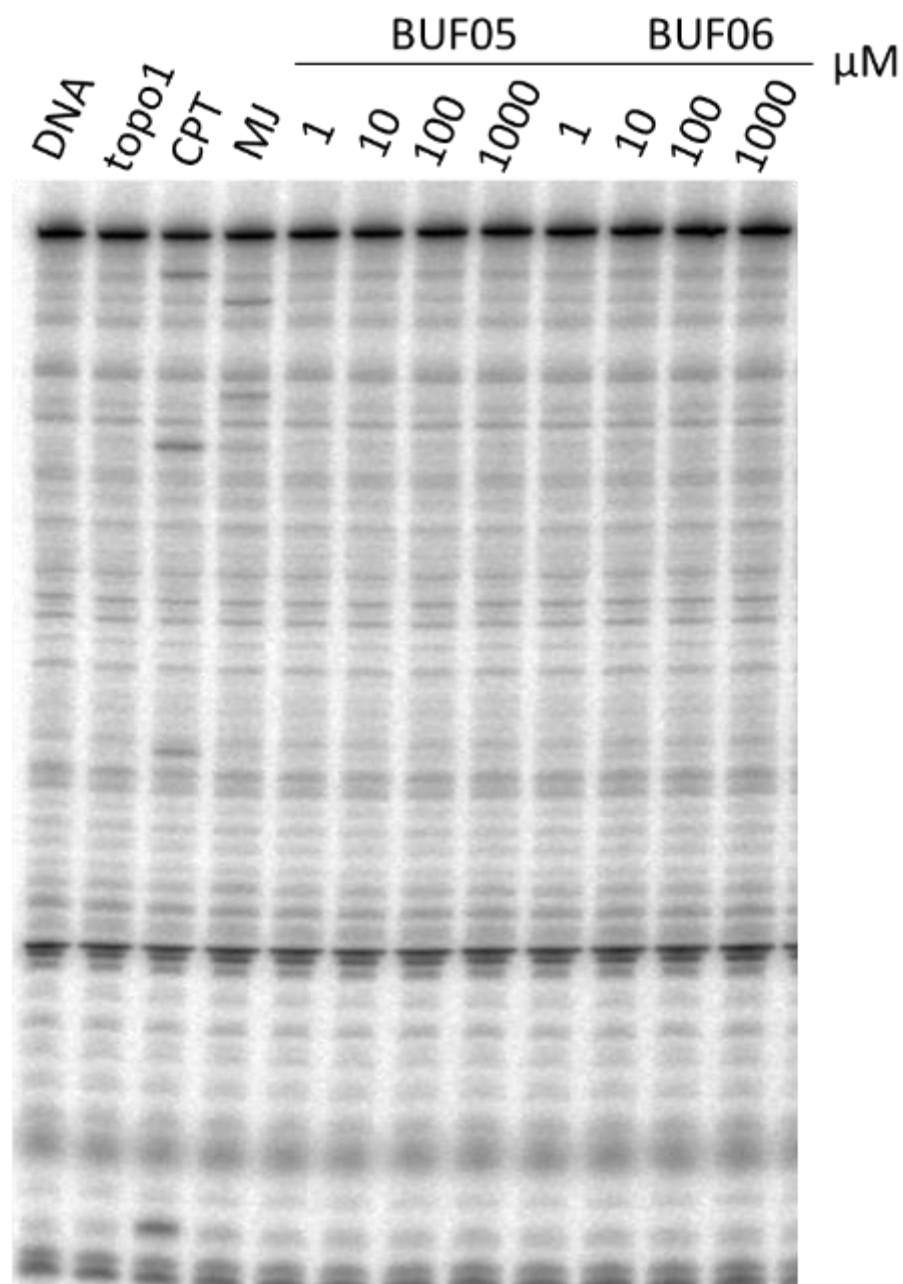
O escore negativo (esquerda) e positivo (direita) mostram que as células indicadas são sensíveis ou resistentes a determinada droga, respectivamente. A linhagem selvagem é mostrada no topo com valor de referência 0. A média da IC90 com desvio padrão para cada droga na linhagem selvagem (WT) é 1,35 μ M para BUF05 (bufalina) e 0,9 μ M para BUF06 (3-acetato de bufalina).

4.10 ENSAIOS DE TOPOISOMERASE

4.10.1 Efeito dos bufadienolídeos sobre a clivagem de DNA mediado por topoisomerase I

A topoisomerase I, responsável principalmente por resolver os pontos superenovelados do DNA, atua quebrando apenas uma fita de DNA, desfazendo sua tensão e religando-o de volta. A enzima é posta para reagir com DNA sozinho, com os controles positivos camptotecina (CPT), MJ-III-65 (MJ, uma indenoisoquinolina) e os bufadienolídeos bufalina (BUF05) e 3-acetato de bufalina (BUF06) em concentrações crescentes (1 a 1000 μM). A corrida em gel desse DNA marcado radioativamente mostrou que os bufadienolídeos não interferiram na atividade da enzima (**Figura 27**).

Figura 27. Ensaio de clivagem de DNA mediado por Topoisomerase I.

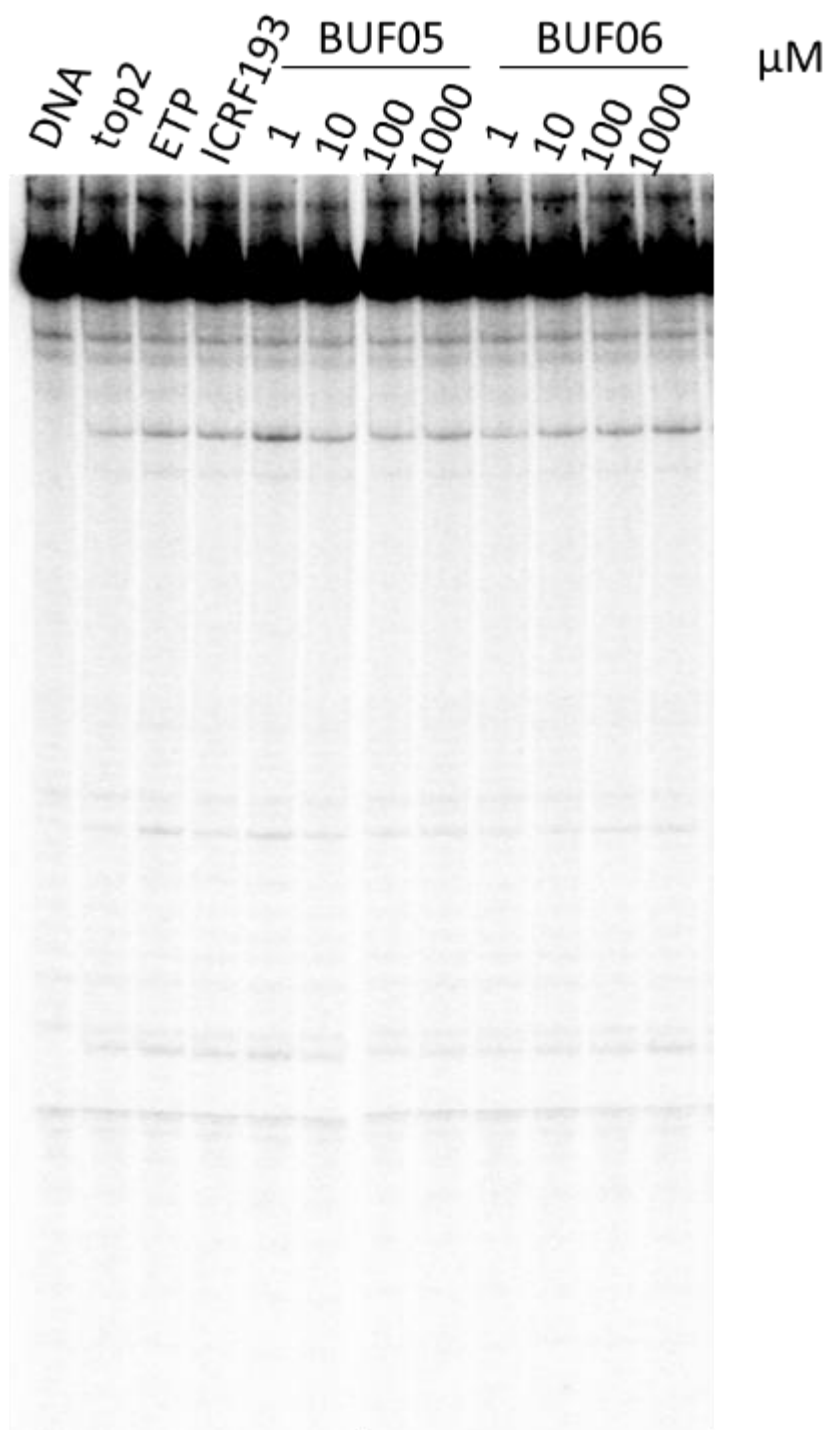


Eletroforese de DNA em gel SDS-PAGE. Incubação com a enzima por 20 minutos. Faixa 1, DNA sozinho. Faixa 2, Topoisomerase 1 (topo1) na presença de DNA. Faixa 3 e 4, controles positivos Camptotecina (CPT) e MJ-III-65 (MJ). Faixas seguintes, bufodienólídeos BUF05 e BUF06 em concentrações de 1, 10, 100 e 1000 μM .

4.10.2 Efeito dos bufadienólídeos sobre a clivagem de DNA mediado por topoisomerase II

A topoisomerase II, responsável além de desenovelar o DNA é importante no processo de separação das cromátides irmãs (decatenação) e atua quebrando ambas as fitas de DNA, desfazendo sua tensão e religando-as de volta. A enzima é posta pra reagir com DNA sozinho e ATP (necessário para sua atividade), com os controle positivos etoposídeo e ICRF-193 (uma bisdioxopiperazina) e os bufadienólídeos bufalina (BUF05) e 3-acetato de bufalina (BUF06) em concentrações crescentes (1 a 1000 μM). A corrida em gel desse DNA, marcado radioativamente, mostrou que os bufadienólídeos provocaram discreta inibição observado pela formação de bandas em todas as concentrações testadas, porém menos intensas que os controles positivos (**Figura 28**).

Figura 28. Ensaio de clivagem de DNA mediado por Topoisomerase II.



Eletroforese de DNA em gel SDS-PAGE. Incubação com a enzima por uma hora. Faixa 1, DNA sozinho. Faixa 2, Topoisomerase II (topo2) na presença de DNA. Faixa 3 e 4, controles positivos Etoposídeo (ETP) e ICRF193. Faixas seguintes, bufodienólídeos BUF05, BUF06 em concentrações de 1, 10, 100 e 1000 μM .

4.10.3 Interações moleculares *in silico* à porção catalítica de topoisomerase II por Docking Molecular

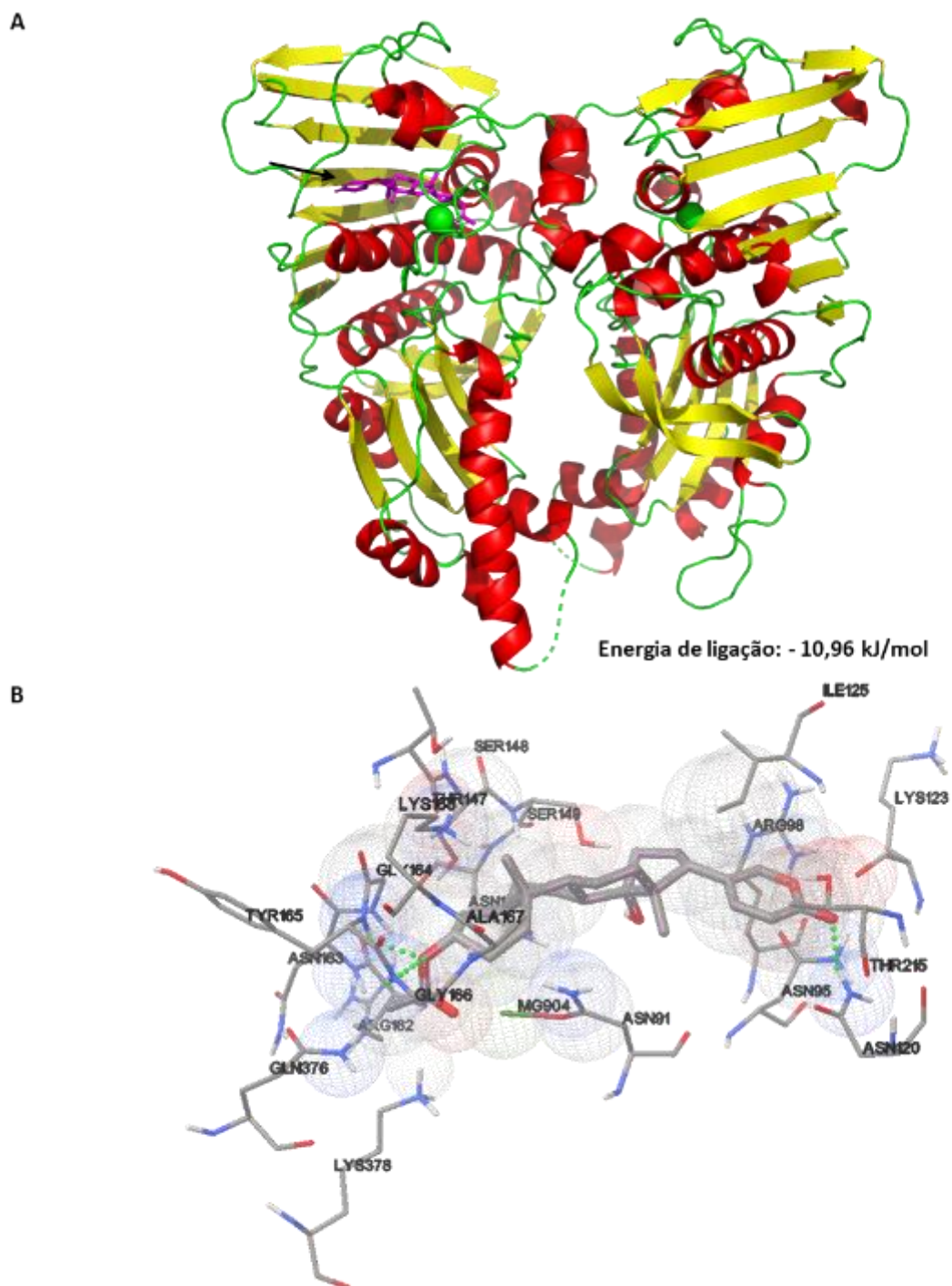
O docking molecular é uma ferramenta útil capaz de predizer a melhor orientação de um ligante a uma proteína nos permitindo caracterizar o comportamento de pequenas moléculas no sítio de ligação de proteínas alvo bem como elucidar suas interações moleculares. A análise dos resultados foi baseada na interação dos compostos (ligantes) 3-acetato de bufalina e bufalina com o sítio de ligação a ATP da topoisomerase II α (PDB: 1zxm) o qual seria a porção da enzima responsável por uma inibição catalítica. O redocking utilizando molécula de ATP (energia de ligação: -13,14 kJ/mol) para comprovação do ensaio também foi realizado.

Em relação a 3-acetato de bufalina (BUF-06), foi observado que a menor energia de ligação (-10,96 kJ/mol), ou seja, a energia mais estável, acontecia quando BUF-06 se encontrava exatamente no sítio de ligação do ATP (**Figura 29A**). A interação com o magnésio livre é importante, uma vez que tal elemento é essencial para funcionamento da enzima. Outras interações importantes são ligações hidrogênio formadas entre BUF-06 e ASN120 (asparagina), TYR165 (tirosina) e GLY166 (glicina). As demais interações, como por exemplo força de Van der Waals, estão representadas no item B da **Figura 29**.

Já para a bufalina (BUF-05), obteve-se uma energia de ligação semelhante à encontrada para bufalina (-10,58 kJ/mol) com sítio de ligação bastante parecido (**Figura 30A**). Foi possível observar também interações com o magnésio livre e ligações de hidrogênio com os aminoácidos LYS123 (lisina), GLY164 (glicina), TYR165 (tirosina), GLY166 (glicina) e THR215 (treonina). As demais interações estão representadas no item B da **Figura 30**.

Os resultados encontrados *in silico* indicam uma possível inibição de topoisomerase II por competição ao sítio de ATP da enzima.

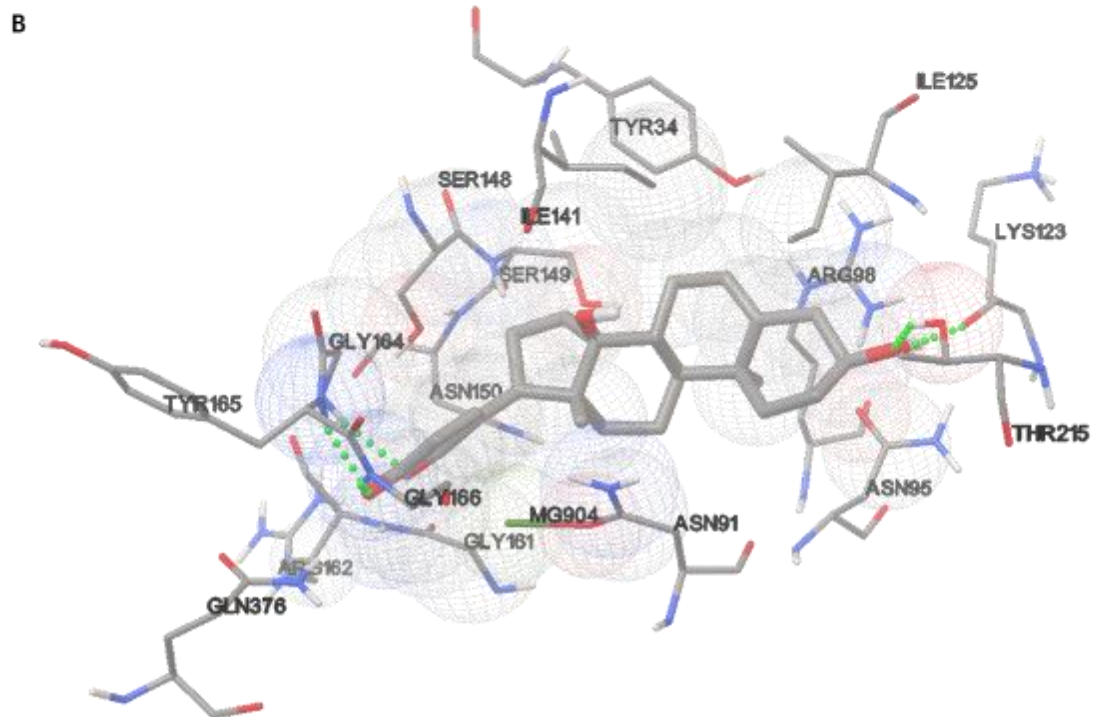
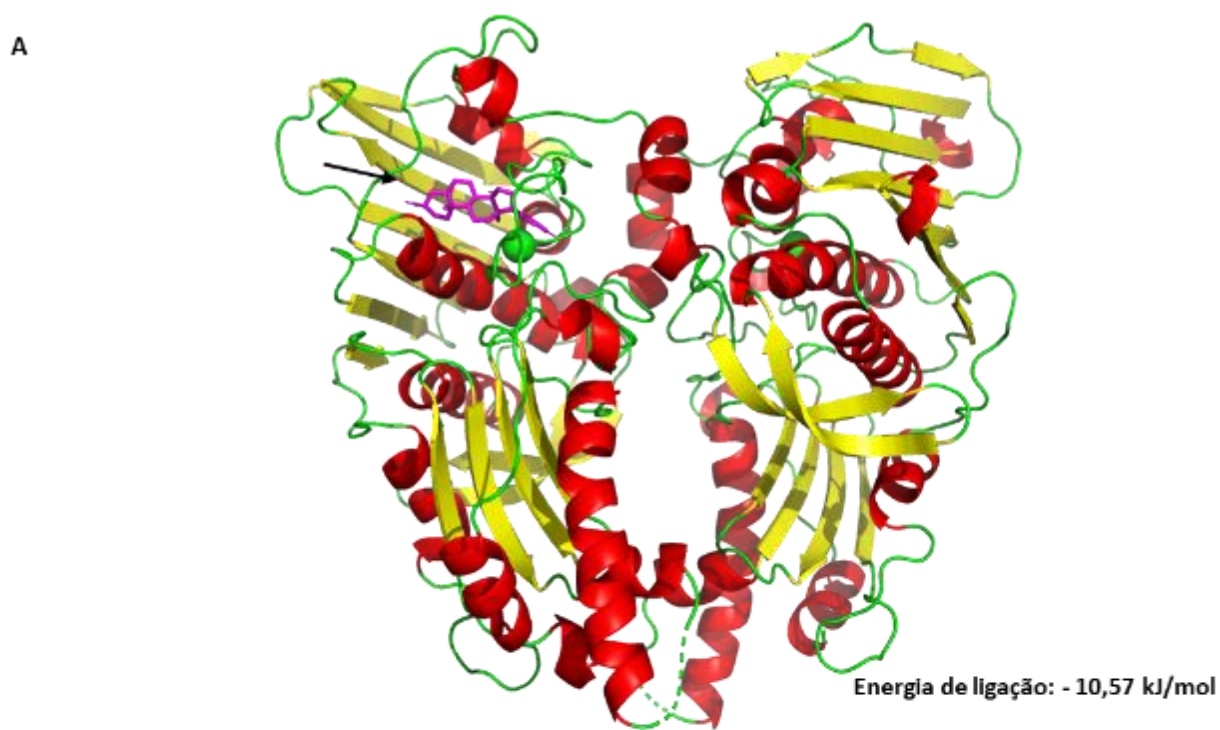
Figura 29. Docking molecular evidenciando a ligação entre porção de topoisomerase II α humana



e o bufadienólídeo 3-acetato de bufalina.

Os cálculos computacionais foram realizados através do programa Autodock. A macromolécula inteira (A) mostra o local de ligação do bufadienólídeo (seta em preto). As interações entre os aminoácidos (B) mostram as ligações de hidrogênio (tracejados em verde) e as forças Van der Waals (esferas).

Figura 30. Docking molecular evidenciando a ligação entre porção de topoisomerase II α humana



e o bufadienólídeo bufalina.

Os cálculos computacionais foram realizados através do programa Autodock. A macromolécula inteira (A) mostra o local de ligação do bufadienolídeo (seta em preto). As interações entre os aminoácidos (B) mostram as ligações de hidrogênio (tracejados em verde) e as forças Van der Waals (esferas)

5 DISCUSSÃO

Desde a antiguidade, a humanidade vem buscando fontes de cura para doenças em plantas, animais e organismos marinhos. E, ainda hoje, utilizam-se vários fármacos oriundos de produtos naturais para as mais variadas doenças, incluindo o câncer. Os produtos naturais continuam a desempenhar um forte papel no descobrimento e desenvolvimento de novas drogas (NEWMAN; CRAGG, 2016). Os compostos que foram inspirados, em sua estrutura química, na natureza são chamados sintéticos ou semissintéticos e pretendem “melhorar” as características farmacológicas de suas inspirações. Na presente tese, exploramos o mecanismo de ação do composto 3-acetato de bufalina (BUF-06), uma modificação do bufadienolídeo bufalina (BUF-05) isolado da pele do sapo *Rhinella schneideri*, em células tumorais humanas.

Inicialmente, o potencial citotóxico dos bufadienolídeos em estudo foram determinados utilizando o ensaio do MTT (**Tabela 2**). De forma geral, os bufadienolídeos bufalina (BUF-05) e 3-acetato de bufalina (BUF-06) mostraram elevada ação citotóxica para diferentes linhagens tumorais humanas (HL-60, HCT-8, MDA-MB435, OVCAR-8, PC3, PC3M e SF-295) em concentrações nanomolares (nM). O acréscimo do grupo acetil no bufadienolídeo bufalina, pareceu potencializar de forma discreta sua citotoxicidade em até cerca de três vezes para PC3M, por exemplo. Os dados corroboram com diversos autores que utilizaram o ensaio do MTT para verificar a citotoxicidade de bufadienolídeos e algumas de suas modificações (KAMANO et al., 1998; NOGAWA et al., 2001; YEH et al., 2003; KUO et al., 2008; XU et al., 2014; LI et al., 2015). Tais resultados estão, ainda, de acordo com trabalho previamente realizado pelo nosso grupo de pesquisa no qual avaliou a citotoxicidade de vários bufadienolídeos extraídos de *Rhinella schneideri*, e também suas modificações, utilizando diversas linhagens tumorais (CUNHA-FILHO et al., 2010). Esse resultados, são reforçados por outro trabalho do nosso grupo, dessa vez com extratos de *Rhinella marina*, que mostrou potente citotoxicidade com IC₅₀ entre 10 e 90 ng/mL, inclusive para bufalina (FERREIRA et al., 2013b).

Muitos fármacos que são utilizados no tratamento do câncer agem inibindo a progressão do ciclo celular e, como consequência, inibem a proliferação celular (DOBBELSTEIN; MOLL, 2014). Uma das grandes limitações evidenciadas no tratamento do câncer ao se utilizar

quimioterápicos são os seus efeitos colaterais. Grande parte desses efeitos deve-se, principalmente, à baixa seletividade desses fármacos para células tumorais, uma vez que as células normais mais afetadas são as que se proliferam rapidamente, como as da pele, do trato gastrointestinal e do sangue (ANAZETTI et al., 2003) . Assim, a busca por novos quimioterápicos tem como objetivo principal aumentar a seletividade e a efetividade dessas substâncias, procurando eliminar apenas as células tumorais e preservando as células normais.

Ao se considerar os efeitos colaterais da quimioterapia, é de grande importância verificar se a droga teste causa danos à células normais, tais como linfócitos (ZUCO et al., 2002; ANAZETTI et al., 2003). Desse modo, células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram utilizadas para avaliar a seletividade dos bufadienolídeos. Os dois bufadienolídeos avaliados não apresentaram especial sensibilidade frente as células tumorais, causando também citotoxicidade a CMSP. Entretanto, Daniel e colaboradores (2003) mostraram que bufadienolídeos modificados para remoção do sítio cardioativo não possuíam toxicidade para CMSP, mas mantiveram seus efeitos citotóxicos em células tumorais. Tal abordagem poderia ser utilizada para otimização estrutural de novos bufadienolídeos visando a redução de citotoxicidade em células normais. Cragg e colaboradores (2009) têm mostrado que compostos naturais possuem grande potencial anticâncer. Porém, é necessário otimizar suas estruturas por remoção, modificação, introdução de grupos funcionais e estereocentros, melhorando as propriedades dos compostos. Além disso, atualmente tem sido utilizadas novas estratégias para entrega dos compostos em tecidos específicos como o uso de lipossomas, microssomas e nanopartículas, reduzindo assim toxicidade e, por sua vez, seus efeitos colaterais (TIWARI et al., 2012). Tal estratégia já foi utilizada em relação aos bufadienolídeos encapsulados em lipossomas, onde foi possível aumentar a citotoxicidade frente as células tumorais, aumentar o tempo de retenção do bufadienolídeo na área do tumor bem como reduzir sua toxicidade (HU et al., 2011).

Ainda considerando as células normais, a citotoxicidade dos bufadienolídeos foi avaliada em linhagens celulares normais murinas (L929, V79 E J774) onde os dois compostos não se mostraram citotóxicos ($CI_{50} > 5 \mu M$). Apesar de controverso, uma vez que os compostos se mostraram citotóxicos para linfócitos humanos (PBMC), isso se deve ao fato das diferenças entre afinidades dos bufadienolídeos e as subunidades da Na^+/K^+ -ATPase. A bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+ -ATPase) possui duas subunidades principais: a subunidade α catalítica e a subunidade β regulatória, cada uma possuindo mais 4 subtipos. Dessa maneira, a diversidade de

Na⁺/K⁺-ATPase se dá pela combinação desses 8 tipos de subunidades (MIJATOVIC et al., 2007). No entanto, a maioria dos glicosídeos cardíacos, incluindo os bufadienolídeos, têm maior afinidade para a subunidade α_3 que é a mais abundante nas células humanas, mas não em células de roedores (NEWMAN et al., 2008; MORENO Y BANULS et al., 2013). Recentemente, alguns autores têm criticado a falta de toxicidade em alguns estudos *in vivo* quando da utilização de espécies murinas no ensaios, uma vez que ausência de toxicidade pode ser mascarada pela menor sensibilidade dos bufadienolídeos a essas espécies (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2015).

Para os estudos de mecanismo de ação da atividade antiproliferativa dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina (BUF-06) e bufalina (BUF-05) foram utilizadas as concentrações 30, 60 e 120 nM para BUF-06; e 80 e 160 nM para BUF-05; valores determinados com base na CI₅₀ de cada composto. Uma vez que ambos os bufadienolídeos não foram seletivos para nenhuma linhagem tumoral, a linhagem de câncer de próstata PC3 foi escolhida para realização dos testes. A linhagem celular PC3 é um adenocarcinoma bastante utilizado para investigação de células de próstata em estágio avançado e na resposta a agentes quimioterápicos. Ainda, o câncer de próstata tem alta prevalência na população masculina mundial e brasileira (WHO 2014; INCA 2016).

Durante o desenvolvimento de um novo protótipo com potencial anticâncer, os ensaios celulares são ferramentas que auxiliam na escolha de uma droga segura e são cruciais para implementação do conceito dos 3R's da experimentação animal: redução, substituição e refinamento. (FENWICK; GRIFFIN; GAUTHIER, 2009). Hoje em dia, diversos ensaios são utilizados no intuito de se avaliar diferentes mecanismos de morte celular como, por exemplo, apoptose ou necrose. Tais ensaios geralmente se utilizam de tempos de incubação específicos, não levando em conta a cinética envolvida nos efeitos investigados (XIA et al., 2008). Análise em tempo real por meio de impedância poderia, então, superar esse problema. Essa tecnologia permite que células vivas sejam monitoradas de forma constante e não-invasiva em relação ao seu crescimento, morfologia e dano durante um período de tempo determinado (KUSTERMANN et al., 2013). Nesse sentido foi realizado o ensaio de crescimento celular utilizando-se o aparelho *Xcelligence* (ACEA Biosciences, San Diego, CA) que utiliza as diferenças de impedância, quando da aderência das células à placas, para mensurar de forma indireta o crescimento celular. De forma controversa, houve um aumento da impedância para níveis acima do controle negativo em ambos os bufadienolídeos (em todas as concentrações testadas) entre 3 e 24 horas de

incubação (**Figura 9**). A partir de 48h, os bufadienolídeos atingiram um platô, indicando um perfil citostático nesse tempo de incubação. Efeito semelhante ocorreu com o controle positivo doxorrubicina aumentando sua impedância a partir de 3h, ocasionando em um platô até o final período de incubação apresentado (aproximadamente 72h). Kustermann e colaboradores (2013) utilizaram-se de vários ensaios de viabilidade celular, incluindo citometria, para confirmar a eficácia da análise da impedância para avaliar perfis citotóxicos e citostáticos. Diversos autores tem utilizado o mesmo sistema para avaliar a proliferação de diferentes compostos frente a linhagens tumorais (XIA et al., 2008; MÓDIS et al., 2014; PEPER et al., 2014; KHO et al., 2015).

A fim de se verificar possíveis mudanças morfológicas durante o ensaio de proliferação em tempo real, foram realizadas fotografias em microscópio de campo claro sem adição de nenhum corante (3, 6, 12, 24, e 72 horas de incubação). A análise revelou um aumento do volume celular principalmente a partir de 3 horas de incubação tanto para 3-acetato de bufalina como para bufalina em praticamente todas as concentrações testadas (**Figura 9**). O aumento do tamanho celular poderia explicar o aumento inicial durante o ensaio de proliferação em tempo real, bem como o início dos efeitos citotóxicos dos bufadienolídeos. Um aumento celular ainda mais expressivo foi observado no controle positivo doxorrubicina. Ocorre aumento da impedância, analisada pelo *Xcelligence*, quando do contato da célula com a superfície de ouro da placa utilizada no equipamento, quanto maior o contato maior a impedância (SCRACE et al., 2013). Alguns autores também relacionaram o aumento da impedância inicial com aumento do volume celular iniciado por uma entrada de osmólitos causado pela incapacidade da célula de manter sua homeostase (YEON; PARK, 2005; AHMAD; MOORE, 2009). Uma vez que os efeitos de proliferação celular em tempo real e análise em microscópio de campo claro revelaram que os efeitos foram mais pronunciados tardiamente, os tempos de incubação de 24 e 48 horas foram escolhidos para análise dos mecanismos de ação dos bufadienolídeos 3-acetato de bufalina e bufalina.

A fim de prover informações a respeito dos mecanismos de morte celular causadas pelos bufadienolídeos, foram utilizadas técnicas de microscopia ótica e citometria de fluxo. Tal abordagem é caracterizada pela mensuração de múltiplas características físicas de uma única célula como, por exemplo, tamanho e granulosidade, em uma suspensão de células que percorre uma fina canaleta através de um equipamento. Seus resultados dependem das características das

células a qual o laser atravessa, o que pode depender do corante ou do anticorpo utilizado. Os alvos podem ser tanto moléculas localizadas nas superfícies externas ou na superfície interna das células. Desse modo, a citometria de fluxo torna-se uma poderosa ferramenta para análises detalhadas de população complexas em um curto período de tempo (ADAN et al., 2017).

Inicialmente, para as análises de citometria de fluxo utilizou-se o corante iodeto de propídeo o qual cora os nucleotídeos das células cujas membranas plasmáticas estão permeáveis, bem como é possível analisar sua morfologia (tamanho e granulosidade) e concentração celular como medida de viabilidade celular (**Figuras 10 e 11**). A concentração do número de células foi reduzida para aproximadamente 2×10^5 cels/mL para 24 e 48 horas de incubação e para praticamente todas as concentrações dos dois bufadienólídeos, o que corrobora com os resultados obtidos na proliferação celular em tempo real (*Xcelligence*). Ao se observar a integridade da membrana, vemos redução discreta de células com membrana íntegra apenas nas concentrações de 60 e 120 nM (3-acetato de bufalina) e 80 nM (bufalina) em 24 horas de incubação. Tal efeito foi melhor evidenciado durante a incubação de 48 horas, quando todas as concentrações testadas dos bufadienólídeos sofreram redução de sua integridade. Dessa maneira, o efeito da diminuição da integridade de membrana parece iniciar mais tardiamente em relação à concentração do número de células, o que corrobora com a manutenção do platô da curva de crescimento observada durante análise da proliferação em tempo real. O efeito citostático acontece quando um tratamento leva à inibição ou supressão do crescimento celular o que, de fato, é o objetivo de grande parte das terapias anticâncer que buscam neutralizar o crescimento descontrolado de células tumorais (VALERIOTE; VAN PUTTEN, 1975). Estas drogas geralmente interferem com as vias de crescimento celular, tanto no nível de receptores de membranas como também no nível de moléculas sinalizadoras como por exemplo as quinases envolvida na proliferação celular (SHAWVER; SLAMON; ULLRICH, 2002). O efeito citostático é então caracterizado como uma parada do crescimento e da divisão que antecede a morte celular (HOFFMAN, 1991). Por outro lado, um efeito citotóxico engloba uma series de efeitos menores que podem levar à necrose, apoptose e/ou outros tipos de morte celular (MELINO, 2005; XIA et al., 2008). Assim, devido aos resultados obtidos pelos ensaios de proliferação celular em tempo real, microscopia de campo claro e viabilidade celular por citometria fluxo é possível sugerir um efeito citostático pelo menos inicial dos bufadienólídeos frente a linhagem de próstata PC-3.

No processo de análise por citometria de fluxo, células em suspensão são carregadas por um fluido isotônico criando um fluxo laminar que permite às células passarem individualmente por um feixe luminoso. A luz emitida é, então, coletada e direcionada a uma série de filtros e espelhos dicróicos que, por sua vez, permitem o isolamento das bandas de comprimentos de ondas. Os dois tipos de detectores básicos permitem a análise do tamanho (FSC - Forward Scatter) e granulosidade/complexidade celular (SSC - Side Scatter) (BROWN; WITTEWER, 2000). Assim sendo, utilizando-se do citômetro de fluxo pudemos observar a morfologia de 5.000 eventos (células) incubadas com os bufadienólídeos por 24 e 48 horas. De forma geral, houve aumento de células com tamanho aumentado e maior granulosidade bem como aumento de debris ou restos celulares após tratamento com os bufadienolídeos tanto em 24 como 48 horas de incubação (**Figuras 12 e 13**). No entanto, o aumento de debris celular foi mais evidente em 48 horas de incubação o que pode ser relacionado com a diminuição de células com membrana íntegra. A fim de analisar tais efeitos na morfologia celular, foram realizadas fotomicrografias nos quais as células foram coradas no intuito de se evidenciar núcleo e citoplasma (**Figuras 14 e 15**). De forma geral, observou-se células com maior volume celular, multinucleadas e membrana com aspecto translúcido, mas também com algumas características de apoptose como picnose, fragmentação nuclear e formação de *blebs* (pequenas protusões da membrana plasmática). Os aspectos morfológicos mais evidentes, também encontrados para o controle positivo doxorrubicina, como aumento do volume celular e aspecto translúcido da membrana se encaixam no conceito clássico e, agora atualizado, de morte celular por necrose (GALLUZZI et al., 2014a). Diversos autores reportam, em geral, que bufalina e outros bufadienolídeos promovem alterações morfológicas condizentes com apoptose, como formação de *blebs* e fragmentação nuclear (JIANG et al., 2014; GIRI et al., 2006; DENG et al., 2014; ZHAI et al., 2014). Ainda, trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa utilizando o bufadienolídeo hellebrigenina também mostrou alterações morfológicas condizentes com apoptose em células leucêmicas (SOARES, 2013). No entanto, os bufadienolídeos 3-acetato de bufalina e bufalina apresentaram aspectos morfológicos condizentes com necrose e apoptose em linhagem celular de tumoral de próstata PC3.

Uma característica bioquímica importante na detecção de apoptose é a externalização da fosfatidilserina (PS), mais presente na região interna da bicamada lipídica (BRATON et al., 1997). O uso de anexina V, uma proteína recombinante que interage forte e especificamente

com os resíduos de fosfatidilserina, pode e tem sido utilizada na identificação de apoptose (Arur et al., 2003). A utilização do teste de Anexina V, mostrado nas **Figuras 16 e 17**, foi realizado a fim de caracterizar bioquimicamente a indução de apoptose. Os resultados apresentados na **Figura 16** revelam que a externalização da fosfatidilserina ocorre de forma menos intensa que no controle positivo doxorrubicina, mas ainda assim foi possível observar aumento de apoptose inicial em todas as doses testadas em 24 horas de incubação. Enquanto que em 48 horas de incubação (**Figura 17**), observou-se principalmente apoptose tardia, indicando um possível efeito tempo dependente na indução de apoptose por bufadienolídeos. Ainda, o efeito apoptótico discreto pode indicar o envolvimento de outros tipos de morte celular. No entanto, diversos autores têm demonstrado externalização de fosfatidilserina quando da incubação de bufalina e outros bufadienolídeos em várias linhagens tumorais (YIN et al., 2012; DENG et al., 2014; DING et al., 2014; CHEN et al., 2015b; DELEBINSKI et al., 2015). Yeh e colaboradores (2003) mostraram que bufalina e cinobufagina foram capazes de induzir apoptose inclusive em linhagem celular PC3, a mesma do nosso estudo, de forma mais intensa, mas em concentrações bem maiores do que as utilizadas nesse estudo (10 μ M). Em estudos anteriores nosso grupo demonstrou que hellebrigenina foi capaz de induzir apoptose em células de leucemia HL-60 em baixas concentrações por meio do ensaio de acridina laranja, por alterações morfológicas e também por externalização de fosfatidilserina (SOARES, 2011; SOARES, 2013).

A ativação de endonucleases está associada ao processo de apoptose e resulta em extensa clivagem (quebra) de DNA (VERMES et al., 2000), que pode ser detectada por citometria de fluxo, utilizando o corante iodeto de propídeo. A análise da fragmentação do DNA (**Figuras 21 e 22**), observado por todas as concentrações de ambos bufadienolídeos mostrou produção de níveis significativos de DNA/sub-G1 (DNA fragmentado ou condensado) em 24 horas, mas que se tornou mais intenso nas análises de 48 horas de incubação. O caráter mais intenso quando da incubação de 48 horas corrobora com os achados de integridade de membrana e externalização de fosfatidilserina. Daniel e colaboradores (2003) também mostraram aumento de DNA fragmentado para vários bufadienolídeos em células Jukart, também como indicativo de apoptose. Deng e colaboradores (2014) observaram aumento de DNA sub-G1 mais intenso em 48 horas com hellebrigenina em doses semelhantes as utilizadas nesse trabalho na linhagem tumoral hepática HepG2.

Como característica típica de apoptose, a fragmentação internucleossomal de DNA é, costumeiramente, atribuída às caspases, enzimas pertencentes à família das cisteínas proteases dependentes de Ca^{2+} e Mg^{2+} que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (STRASSER ET AL. 2000). Existem duas vias mediadas por caspases para ativação de apoptose, a via extrínseca e a via intrínseca. A primeira delas, também chamada de via mediada por receptor de morte, desempenha um papel importante na homeostase tecidual, especialmente na resposta imune, e é iniciada pela ativação da caspase iniciadora 8. Enquanto que a outra via, também conhecida como via dependente da mitocôndria é usada extensivamente na resposta à danos intracelulares, tais como danos ao DNA, e é induzida pela ativação da caspase iniciadora 9 (DANIAL & KORSMEYE, 2004; FOSTER, 2008). A perda do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi$) é geralmente, mas não exclusivamente, relacionado à ativação da via intrínseca da apoptose (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). Nesse sentido, analisamos o $\Delta\Psi$ após a incubação dos bufadienólídeos por 24 e 48 horas (**Figura 18 e 19**). Ambos os compostos despolarizaram significativamente a mitocôndria em níveis semelhantes para 24 e 48 horas de incubação. O envolvimento da mitocôndria na indução de morte por bufalina e também por outros bufadienólídeos já vem sendo bastante estudado, indicando muitas vezes ativação da via intrínseca da apoptose (MASUDA et al., 1995; DANIEL et al., 2003; DONG et al., 2011; HUANG, 2012). No entanto, o mecanismo específico tem variado bastante entre diferentes tipos de tumor e até mesmo entre diferentes fenótipos de um mesmo tumor (CHEN et al., 2015b).

A fim de se confirmar a resposta apoptótica observada nos experimentos de externalização de fosfatidilserina e despolarização de mitocôndria, bem como confirmar as vias envolvidas nesse processo, foram realizados uma série de marcações protéicas utilizando a metodologia de *western blot*. Tal técnica tem sido usada por mais de três décadas e ainda é muito importante na detecção de proteínas em amostras complexas (TAYLOR; POSCH, 2014). A **Figura 20** mostra uma discreta clivagem de PARP1. As enzimas poli (ADP-ribose) polimerases (PARPs) são importantes em vários processos celulares incluindo modulação da estrutura da cromatina, transcrição, replicação, recombinação e reparo de DNA (MORALES et al., 2014). Em relação à morte celular, a clivagem de PARP-1 pelas caspases 3 e 7 é um importante marcador de apoptose (HUERTA et al., 2007). Embora a clivagem de PARP esteja de acordo com diversos autores que também observaram indução de apoptose para linhagens tumorais diferentes (YU et

al., 2008; SU et al., 2009; HUANG et al., 2012a; CHAN et al., 2013; LIU et al., 2013; YAN et al., 2014; CHEN et al., 2015b). Hsu e colaboradores (2013), por exemplo, não encontram clivagem de PARP em linhagem de câncer de fígado e, nesse caso, observaram morte por autofagia. Já Shen e colaboradores (2014) também observaram discreta clivagem de PARP em células de glioma e sugeriram um equilíbrio entre autofagia e apoptose quando do tipo de morte ocasionado por bufalina. Em questão aos mecanismos de morte associados à apoptose por 3-acetato de bufalina e bufalina, analisamos as caspases 9, 8, 3 e 7. As caspases pertencem à família das cisteínas proteases que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduo de aspartato. As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação, fragmentação nuclear e externalização de fosfolipídios de membrana, que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). Uma vez que as caspases são as efetoras moleculares da apoptose, a detecção de seus clivados é uma poderosa ferramenta na identificação de apoptose inicial (HUERTA et al., 2007). Em nossos achados, apenas a caspase 8 se apresentou clivada em todos os tratamentos. Observou-se ainda diminuição na expressão de caspase 3 na maior dose (120nM) de 3-acetato de bufalina bem como para caspase 7 na dose 160 nM de bufalina. Não houve, ainda, diferença na expressão de caspase 9. A caspase 8 é principalmente associada a via extrínseca da apoptose, sendo extensivamente utilizada para indicar morte celular apoptótica induzida por sinais extracelulares, que são identificados e propagados por receptores transmembrana específicos (GALLUZZI et al., 2012). Já a caspase 9 é associada à via intrínseca, onde uma grande variedade de estresses intracelulares como dano ao DNA, estresse oxidativo, aumento excessivo de cálcio, entre outros promovem um desbalanceamento entre os fatores pro e anti-apoptóticos na mitocôndria que culmina em permeabilidade de sua membrana e alteração de seu $\Delta\Psi$ (TAIT; GREEN, 2010). Assim, a apoptose intrínseca resulta de uma catástrofe bioenergética e metabólica associada à múltiplos executores de morte propriamente dita, como a cascata na qual caspase 9 participa (GALLUZZI et al., 2012). De maneira geral, os bufadienólídeos ativam tanto via extrínseca quanto a via intrínseca da apoptose, com variações dependendo da estrutura química e/ou tecido em estudo (DANIEL et al., 2003; YU et al., 2008; SU et al., 2009; QI et al., 2012; CHAN et al., 2013; CHEN et al., 2015b). Autores como Yan e colaboradores (2014) mostraram o envolvimento apenas da caspase 8 na apoptose ocasionada por bufalina em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. Já Huang e colaboradores (2012a) não observaram

ativação de caspase 8, mas sim caspase 9 e, por sua vez, ativação da via intrínseca para linhagem de câncer de bexiga. As caspases chamadas de efetoras, como as caspases 3 e 7, são responsáveis por eventos finais de clivagem de substratos que, de fato, causam a morte celular (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). Apesar de termos observado clivagem de PARP e caspase 8, não foi observado clivagem de caspase 3 e 7. Além disso, houve uma discreta diminuição na expressão dessas duas caspases. Embora ativação das caspases se dê por meio de suas clivagens, a diminuição das pró-caspases pode estar relacionada a sua ativação. Hong & Choi (2011), por exemplo, mostraram que bufalina provocou diminuição de expressão de pro-caspases 9, 8 e 3 e, ao mesmo tempo, mostrou aumento da atividade enzimática das mesmas caspases, indicando ativação das vias extrínseca e intrínseca da apoptose. No entanto, algumas vezes a ausência de clivados para caspase 3 associado à morfologia celular característica e marcação de outros fatores, como Beclin1 e LC3, indicou via de morte por autofagia (HUANG, 2012; HSU et al., 2013). Mas, de forma geral, em relação a bufalina e outros bufadienolídeos, quando houve ativação e/ou clivagem de caspase 9 e 8, também ocorreu ativação de caspase 3 ou 7 bem como clivagem de PARP evidenciado pelos autores já citados acima. Em nossos estudos, foram avaliados ainda a expressão de Bcl-xL, Bcl-2 e Bax, que regulam ativamente a apoptose. Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-xL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo *c* e são chamados de reguladores anti-apoptóticos. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas. A homeostasia celular é mantida pelo balanço da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pro-apoptóticas (BORNER, 2003). Em nossos achados, é possível observar a diminuição da expressão de Bcl-xL, Bcl-2 e também Bax. No entanto, existe uma sensível diminuição da expressão de Bax na menor concentração de 3-acetato de bufalina (60 nM), enquanto Bcl-2 e Bcl-xL parecem diminuir de forma concentração dependente. Esse desbalanceamento discreto entre as proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 e Bcl-xL) e pro-apoptóticas (Bax) pode explicar a discreta ativação de apoptose observada até então. Em linhagem tumoral de câncer de fígado tanto Bcl-2 como Bax tiveram suas expressões diminuídas quando tratadas com bufalina, o que levou a um tipo de morte não apoptótico como já foi citado acima (HSU et al., 2013). Outros autores, no entanto, observaram apoptose intrínseca com aumento de expressão de Bax e diminuição de Bcl-2 e Bcl-xL para linhagens diferentes por bufalina (NASU et al., 2005a; HONG; CHOI, 2011; ZHU et al., 2012; SHEN et al., 2014). As características apontadas até então para 3-acetato de bufalina e bufalina para a linhagem de próstata PC-3 apontam para um

papel secundário de apoptose em relações ao tipo de morte causado pelos bufadienolídeos estudados.

O surgimento de um tumor pode ser consequência de vários fatores, dentre os quais estão a herança genética e os fatores ambientais (raios UV, poluição, alimentação, estresse, etc.) que podem desencadear um acúmulo de alterações gênicas que não conseguiram ser reparadas e agregam a células características moleculares próprias de um câncer (desdiferenciação, alto grau de mitose e, dentre outros, mecanismos de proteção contra morte celular programada) (DANIAL, 2007; BUCHAKJAN & KORNBLUTH, 2010). Durante décadas, a apoptose foi considerada como a morte celular padrão durante os processos de desenvolvimento, homeostase, infecção e patogênese, onde necrose era considerada como um tipo de morte “acidental” decorrente de reposta a insultos físico-químicos (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008b; SUZANNE; STELLER, 2013). Recentemente, evidências genéticas, bem como a descoberta de inibidores de necrose, tem mudado esse ponto vista, e revelado a existência de várias vias de necrose regulada. A necrose regulada é definida como um processo de morte celular geneticamente controlada que eventualmente resulta em extravasamento celular, e é caracterizada morfológicamente por granulação do citoplasma e também aumento de volume celular (VANDEN BERGHE et al., 2014). Diversos tipos de morte celular compartilham essas características morfológicas e precisam, agora, serem examinados em relação a suas vias sinalizadoras em comuns ou distintas. Várias tentativas em definir e classificar esses “novos” tipos de morte resultaram em múltiplos neologismos, como necroptose, parthanatos, oxitose, ferroptose, ETose, NETose, pironecrose e piroptose; onde todos estes processos caracterizam um aspecto particular de morte celular (KACZMAREK; VANDENABEELE; KRYSKO, 2013).

Ainda no intuito de se caracterizar o mecanismo de ação de 3-acetato de bufalina, foi analisado o conteúdo total de DNA por citometria de fluxo das células de câncer de próstata PC-3, que reflete as fases do ciclo celular. A análise do ciclo celular bem como proliferação celular é importante no estudo de crescimento, senescência e apoptose. Isso permite a investigação dos mecanismos básicos bem como a avaliação à eficácia dos efeitos terapêuticos de drogas anti-câncer. Durante a progressão do ciclo celular, células em crescimento transicionam entre as fases $G1 > S > G2 > M$, de síntese de DNA, preparação para divisão e subsequente mitose celular (MALUMBRES; BARBACID, 2009). Os bufadienolídeos foram capazes de provocar acúmulo de células em G2/M, mas também discreta diminuição de células em G0/G1 e em S, tanto em 24

horas quanto em 48 horas de incubação em todas doses testadas, exceto 30 nM de 3-acetato de bufalina após 48 horas (**Figura 21 e 22**). Houve ainda aumento significativo de DNA sub-G1 (fragmentado) para todas as concentrações utilizadas. A parada do ciclo celular por bufalina e outros bufadienolídeos já é descrita na literatura. Existem relatos de parada de ciclo celular em G0/G1 para leucemia, câncer de fígado e bexiga e em células do endométrio (NASU et al., 2005a; GIRI et al., 2006; HUANG et al., 2012b; ICHIKAWA et al., 2015). Jiang e colaboradores (2014) descreveram parada do ciclo em S por bufalina em duas linhagens tumorais de vesícula biliar (SCG996 e GBC-SD) com diminuição de G0/G1 e G2/M. No entanto, a maioria do relatos descreve parada do ciclo celular em G2/M, para bufalina e outros bufadienolídeos, em vários tipos de tecidos tumorais (MASUDA et al., 1995; XIE et al., 2011b; ZHU et al., 2012; HSU et al., 2013; HUANG et al., 2013; DENG et al., 2014). Estudos prévios do nosso grupo utilizando linhagem tumoral leucêmica HL-60, hellebrigenina também mostrou parada em G2/M após 24 horas de incubação (SOARES, 2011; SOARES, 2013). Xie e colaboradores (2013) mostraram que a possível parada por bufalina identificada como G2/M poderia estar relacionada em parte com parada do ciclo em mitose e parte com avanço de células com o dobro de DNA (2N) para fase em G1 e, nesse caso, seria identificado por citometria de fluxo como G2/M. Tais achados reforçam nosso resultados de ciclo celular e abre espaço para discussões acerca do envolvimento de outros tipos de morte celular induzidas por 3-acetato de bufalina e bufalina em células de câncer de próstata.

A fim de elucidar os mecanismos envolvidos na parada em G2/M pelos bufadienolídeos estudados, foi realizado *western blot* para dois “*checkpoints*” do ciclo celular envolvidos nessas fases do ciclo celular. Em nosso estudo, foram marcadas a ciclinas A2 e B1 (**Figura 23**). As ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs) são responsáveis pelo controle do ciclo celular. A atividade das CDKs requer a ligação à uma ciclina e são responsáveis por enviar os sinais que irão de fato controlar o crescimento e a divisão celular (MALUMBRES; BARBACID, 2009). A incubação de 3-acetato de bufalina e bufalina diminui ou inibiu completamente a expressão de ciclina A2 ao mesmo tempo que aumentou a expressão de ciclina B1. Ambas as ciclinas tem papel importante durante a fase G2 e M. A ciclina A2 é essencial em pelo menos dois pontos do ciclo celular: durante a fase S, quando ativa CDK2, e durante a fase G2 em transição para fase M quando ativa CDK1. A ciclina A2 é encontrada, geralmente, no núcleo durante a fase S onde regula a iniciação e progressão da síntese de DNA (YAM; FUNG; POON,

2002). No final de G2, a ciclina A2 se realocaliza para os centrossomos no citoplasma onde se liga aos polos do fuso mitótico e, junto com a ciclina B, regula a passagem da fase G2 para M (FUNG; MA; POON, 2007). Já a ciclina B, em geral, é responsável pelo rompimento do invólucro nuclear, formação do fuso mitótico, condesação dos cromossomos e ativação do checkpoint do fuso mitótico (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008). O checkpoint do fuso mitótico monitora o ancoramento dos cromossomos aos fusos e atrasa a progressão da anáfase até que todos os cromossomos estejam corretamente aderidos ao fuso bipolar. Uma vez que o ancoramento foi realizado corretamente, o checkpoint é ‘desligado’ e Cdc20 ativa o ubiquitina ligase E3 que, então, degrada ciclina B (SACRISTAN; KOPS, 2015). Quando da não degradação de ciclina B, o complexo CDK1/ciclina B, ainda ativo, pode atuar fosforilando e inativando a família de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 o que levaria à indução de apoptose, ao mesmo tempo que CDK1 poderia fosforilar e inativar as caspases responsáveis por essa morte celular (MC GEE, 2015). Isso explicaria em parte a ausência de clivagem (forma ativa) das caspases 9, 3 e 7 em nossos achados bem como a diminuição da expressão de Bcl-2. Como já foi mencionado anteriormente, os bufadienolídeos possuem diferentes respostas dependendo do tipo de tecido analisado. No casos da expressões de ciclinas, em geral, autores mostraram diminuição da expressão de ciclina A2 e ciclina B1 (TAKAI et al., 2008; HUANG et al., 2012b; JIANG et al., 2014). No entanto, Deng e colaboradores (2014) mostraram que helebrigenina provocou aumento da expressão de ciclina B1 em linhagem tumoral de fígado HepG2 e morte celular por apoptose. Já Nasu e colaboradores (2005b) não mostraram alteração da expressão de ciclina B1 em célula endometriais por bufalina. O aumento da expressão de ciclina B1 tem sido relacionado à relatos de catástrofe mitótica. O aumento da expressão ou não degradação, em nossos resultados, de ciclina B1 pode ainda indicar a participação de catástrofe mitótica. Assim, nossos achados em célula tumoral prostática PC3 indicam que a parada do ciclo causada pelos bufadienolídeos pode estar mais relacionada à metáfase do que à fase G2 do ciclo celular.

Os diversos mecanismos de morte e parada de ciclo celular têm sido observados para os bufadienolídeos e têm sido associados muitas vezes ao dano causado por esses compostos ao DNA. No intuito de se verificar possível dano ao DNA causado por 3-acetato de bufalina e bufalina, foi realizado o Ensaio do Cometa em células tumorais de próstata PC-3. Uma vez que o dano ao DNA é um evento que ocorre durante as primeiras horas de incubação, o ensaio foi realizado em 3 e 24 horas de incubação. Em nosso ensaio não foram observados danos ao DNA

para nenhuma das doses ou tempos testados (**Figura 24**). Um dos primeiros eventos em resposta ao dano de DNA em humanos é a fosforilação da histona H2AX e, na última década, o H2AX fosforilado se tornou um poderoso biomarcador de danos de dupla fita em células e tecidos (JI et al., 2017). Para confirmar a ausência de dano, foi realizado por citometria de fluxo a marcação de H2AX fosforilado. Em nossos ensaios, mais uma vez utilizando 3 e 24 horas de incubação, não foram observados aumentos significativos de H2AX fosforilado com nenhum dos bufadienolídeos (**Figura 25**). Embora, em nosso estudo tenhamos encontrado DNA fragmentado (Sub-G1) na análise por citometria de fluxo, tais resultados não necessariamente se relacionam com os danos de dupla-fita que podem ser identificados por Cometa e H2AX fosforilado. É pouco provável que os fragmentos ocasionados por apoptose, por exemplo, sejam identificados pelo ensaio do Cometa, uma vez que durante o processo de apoptose o DNA é quebrado em pedaços maiores compatíveis com o tamanho de nucleossoma (COLLINS et al., 2008). Pastor e colaboradores (2002) mostraram que bufalina não induziu dano ao DNA em células de ovário de hamster chinês. Mais tarde, o mesmo grupo, mostrou o efeito da bufalina no adiamento da ação das vias de reparo de DNA (PASTOR; CORTÉS, 2003). Recentemente, Wu e colaboradores (2014) indicaram dano ao DNA pelo ensaio do cometa por bufalina bem como inibição da resposta a esse dano em células de câncer de pulmão NCI-H460. Outros autores também observaram genotoxicidade (tanto por ensaio do cometa como por fosforilação de H2AX) de outros esteróides cardiotônicos (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2013; LEE et al., 2014). As diferenças entre os resultados podem ser, mais uma vez, atribuída as diferentes linhagens tumorais utilizadas em cada estudo.

Tendo em vista a controvérsia acerca do envolvimento dos bufadienolídeos em relação inibição de resposta ao dano em DNA, decidimos realizar um ‘*screening*’ em vias de reparo DNA em linhagem de galinha DT40 com genes *knockout* (deficientes) para diversas vias do reparo de DNA. A linhagem DT40 possui a maior coleção de clones mutantes em células vertebradas, devido à eficiência em tornar deficientes genes específicos, mas manter seu cariótipo estável. Além disso, como células DT40 não possuem checkpoint G1/S e proliferam numa taxa extremamente rápida (+ ou - 8 horas de tempo de duplicação), tais células possuem, então, características em comum às células tumorais (WINDING; BERCHTOLD, 2001). Quase todos os elementos estruturais do DNA podem ser danificados, de sua base até quebra das pontes fosfodiéster. Devido a sua existência delicada bem como sua necessidade de manter a

estabilidade do genoma e prevenir morte celular ou tumorigênese, o reparo de DNA é uma importante função celular (NICKOLOFF et al., 2017). Em nosso *'screening'*, foi possível observar que as células deficientes de PARP-/- foram mais resistentes ao tratamento com os bufadienolídeos (**Figura 26**). Existem quatro vias principais de reparo de DNA, cada uma com vários subtipos: reparo de dupla-fita, reparo de excisão de base (BER – “*base excision repair*”), reparo de excisão de nucleotídeo (NER – “*nucleotide excision repair*”) e reparo do emparelhamento errôneo de DNA (MMR – “*mismatch repair*”) (CICCIA; ELLEDGE, 2010). Nesse contexto, PARP tem papel no reparo de quase todos os tipos de dano em DNA tornando-o um alvo promissor para a clínica, a exemplo dos inibidores de PARP utilizados em câncer de mama para mutação em BRCA1 e/ou BRCA2 (DZIADKOWIEC et al., 2016). Em nosso ensaio, a célula deficiente em PARP se tornou mais resistente aos bufadienolídeos, o que pode vir a indicar uma possível participação de PARP na ação citotóxica/citostática dos compostos. Apesar de extensivamente estudada em suas participações no reparo de DNA e também sua clivagem durante os processos de morte apoptótica, apenas recentemente PARP tem tido destaque em relação à processos de necrose programada. Ainda assim parthanatos, junção de PAR e Thanatos (deus grego da morte), é um dos mecanismos de necrose regulada mais estudados (FATOKUN; DAWSON; DAWSON, 2014; SOSNA et al., 2014). É, geralmente, provocado pelos estímulos que também induzem danos ao DNA, como a irradiação ultravioleta, agentes alquilantes e espécies reativas de oxigênio que hiperativam PARP (CHIU et al., 2011). Essa hiperativação de PARP induz intenso acúmulo de polímeros PAR, causando depleção de NAD⁺ e ATP, o que leva a célula à uma catástrofe energética. A hiperativação de PARP produz ainda polímeros de PAR que induzem a liberação da forma truncada do fator indutor de apoptose (AIF, do inglês *apoptosis-inducing factor*) da membrana externa da mitocôndria bem como sua entrada no núcleo, onde o AIF induzirá fragmentação nuclear por uma série de mecanismos ainda não conhecidos (FATOKUN; DAWSON; DAWSON, 2014). Em nossos resultados, algumas características quando da incubação por 3-acetato de bufalina e bufalina como por exemplo a despolarização da mitocôndria, mas com pouca indução de apoptose em geral e ainda a morfologia necrótica de parte das células em nossas micrografias, nos levam a sugerir morte por parthanatos. Apesar disso, a ausência de dano ao DNA, característico desse tipo de morte, nos leva a pensar ao contrário.

As topoisomerasas desempenham papel importante em diversos aspectos do metabolismo de DNA através da sua função em modelar as tensões topológicas necessárias para replicação, transcrição, recombinação e segregação das moléculas filhas (POMMIER et al., 2016). Tendo em vista os papéis desempenhados pelas topoisomerasas, não é surpresa que essas enzimas sejam o foco de pesquisas na terapia do câncer (LIU, 1989). Os bufadienolídeos, em especial a bufalina, já possuem atividade inibitória da topoisomerase II descrita por alguns autores, no entanto, não tem tido muita importância nos últimos anos (HASHIMOTO et al., 1997; WATABE et al., 1997; DOMÍNGUEZ et al., 2001). Recentemente, Calderón-Montaña e colaboradores (2013) mostraram a relação entre as lactonas alfa e beta insaturadas dos glicosídeos cardíacos (incluindo os bufadinolídeos) e sua relação com a formação de complexos clivados de DNA ocasionados por topoisomerase I e II. Nesse sentido, foi realizado o ensaio de clivagem de DNA para topoisomerase I e II quando incubados por 3-acetato de bufalina e bufalina (**Figura 27 e 28**). Nossos ensaios revelaram que não houve a formação de complexos de clivados para topoisomerase I, mas houve uma discreta formação de clivados para topoisomerase II, o que indicaria possível inibição da enzima por 3-acetato de bufalina e bufalina. Existem dois tipos de inibidores de topoisomerase II, os inibidores clássicos, também chamados '*poisons*' e os inibidores catalíticos. O tipo clássico, ou *poison*, age estabilizando os complexos de clivagem de DNA, produzindo quebra de fita de DNA e interferindo a replicação e/ou transcrição. Já os inibidores catalíticos interferem diretamente no sítio catalítico da enzima, interrompendo sua função e, por sua vez, não produzem quebra das fitas do DNA (POMMIER, 2013). Além disso, como observaram Pastor e colaboradores (2002), a bufalina mostrou ser capaz de inibir cataliticamente topoisomerase II em células de ovário de hamster. Da mesma forma, Hashimoto e colaboradores (1997) observaram que a bufalina reduziu a atividade das topoisomerasas II α e II β em células leucêmicas HL-60. A ausência de dano em DNA por duas metodologias (Ensaio do Cometa e fosforilação de H2AX) nos levou a crer que 3-acetato de bufalina possa inibir de forma catalítica a enzima topoisomerase II.

Na tentativa de se elucidar possível inibição catalítica de topoisomerase II por 3-acetato de bufalina, foram realizados ensaios *in silico* de modelagem molecular (*docking*). O *docking* molecular pode ser utilizado para criação de modelos de interação entre uma molécula pequena (ligante) e uma proteína (macromolécula) que permite caracterizar o comportamento de ligantes alvos em seus sítios nas macromoléculas, bem como elucidar seus processos bioquímicos

(MCCONKEY; SOBOLEV; EDELMAN, 2002). Diversos programas baseados em diferentes algoritmos foram desenvolvidos para uso em *docking* molecular, o que tem feito seu uso uma importante ferramenta em pesquisas farmacêuticas (MENG et al., 2011). Uma vez que a estrutura completa da topoisomerase II α ainda não está disponível, em nossos ensaios *in silico* foi utilizada porção responsável pelo sítio ATPásico (PDB: 1zxm). Tanto 3-acetato de bufalina como bufalina obtiveram grande afinidade pela topoisomerase II humana indicada pela baixa energia de ligação (-10,96 kJ/mol para BUF06 e -10,57 kJ/mol para BUF05) como mostrado nas **Figuras 29 e 30**. Além disso, os sítios de ligação sobrepõem a localização da molécula de ATP, indicando possível competição e, dessa forma, inibindo a função da enzima. A interação com a molécula de MG torna a hipótese de inibição plausível, pois tal molécula é necessária juntamente com o ATP para o correto funcionamento da topoisomerase II. Jun e colaboradores (2011) mostraram a síntese de um análogo de xantona que obteve resultados semelhantes para *docking* molecular utilizando a mesma porção de topoisomerase II e com confirmada ação inibitória da enzima por ensaios biológicos. A topoisomerase II utiliza a energia vinda da hidrólise do ATP para completar a replicação do DNA. Portanto, esforços têm sido feitos para desenvolver novos inibidores catalíticos por atenuar a atividade ATPásica por bloquear ou impedir o ATP de se ligar ao seu sítio de ligação na enzima. Um inibidor de ATPase como um inibidor catalítico de topoisomerase II pode ser considerado uma abordagem benéfica para tratamentos anticâncer em termos de baixa toxicidade ao DNA e seu coincidente potencial de atividades inibitórias de histonas HSP90 (FURET et al., 2009).

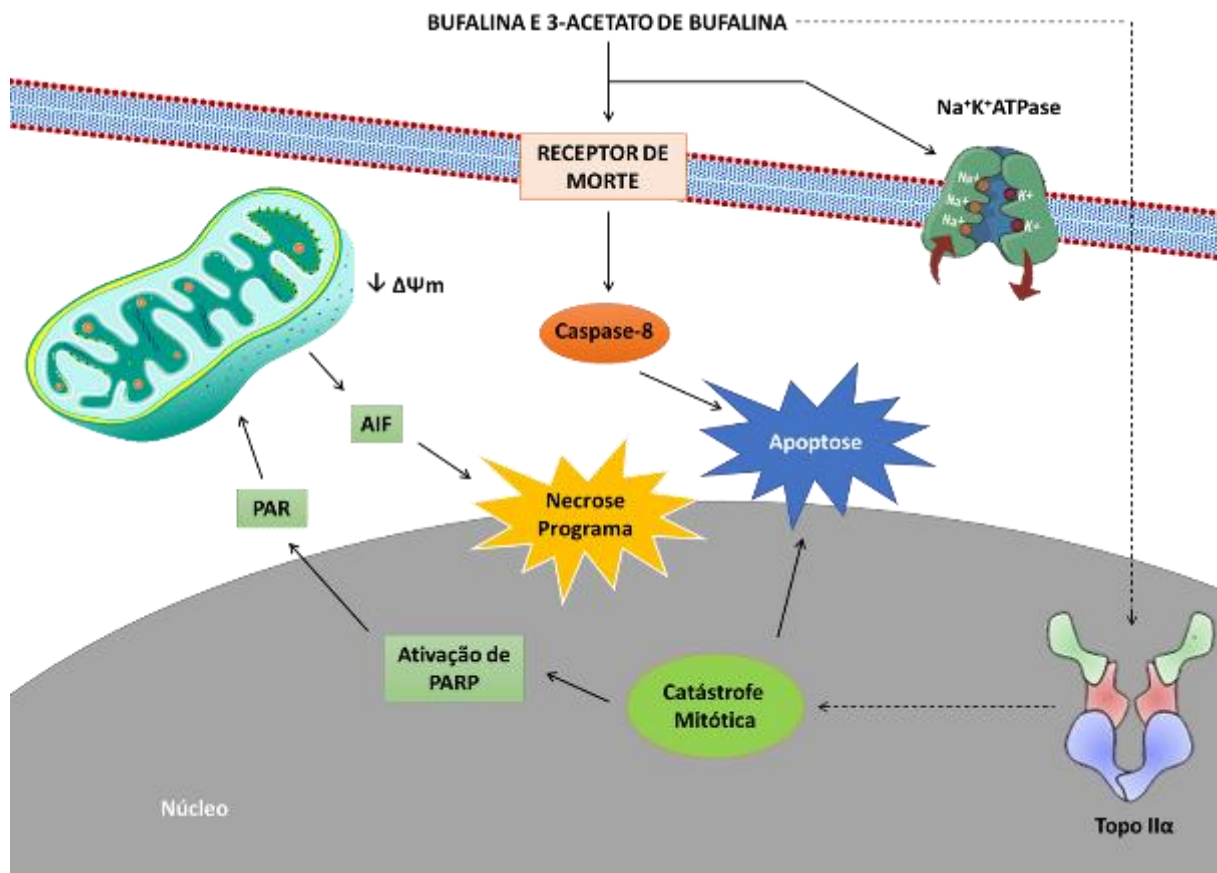
Além disso, as topoisomerasas II são importantes na separação (decataneção) dos cromossomos durante a mitose. O checkpoint do fuso mitótico é o mecanismo de controle que regula a segregação dos cromossomos e um dos passos importantes é a formação do complexo promotor de anáfase/ciclossomo (APC/C do inglês *anaphase-promoting complex*). O APC/C é formado pela ubiquitina ligase E3 que controla a progressão mitótica bem como a separação das cromátides. Durante a progressão da mitose, CDC20 age como ativador de APC/C promovendo a degradação dos substratos mitóticos como securina e ciclina B1. A degradação de ciclina B1 leva à inativação de CDK1 e inicia a saída da fase mitótica (PETERS, 2002). Geralmente, o checkpoint mitótico monitora também o estado de catenação dos cromossomos. As células são paradas na fase G2 do ciclo celular, e o progresso da mitose é atrasada, caso as cromátides não sejam completamente separadas (DEMING et al., 2001). A topoisomerase II α possui 3

subunidades distintas de dimerização com o máximo de suas expressões durante as G2 e M do ciclo celular, sendo específicas para o desenovelamento dos cromossomos e essenciais para sua separação na transição de metáfase para anáfase (CHEN et al., 2015a). Nossos resultados, revelaram possível inibição do sítio ATPásico de topoisomerase II α . A parada do ciclo celular em G2/M, o acúmulo de ciclina B1 e o surgimento de células grandes e com mais de um núcleo são indícios que nos levam a crer no mal funcionamento dos checkpoints mitóticos provocados tanto por 3-acetato de bufalina como bufalina. Ishida e colaboradores (1991) observaram que ICRF-193, um inibidor catalítico de topoisomerase II, levou a diminuição da segregação de cromossomos e surgimento de células poliploides. Outros autores também revelaram que ICRF-187 também provocou grande aumento de células poliploides (HASINOFF et al., 2001). Ainda, o acúmulo de ciclina B1 e inibição catalítica da topoisomerase II, atrapalhando a segregação dos cromossomos, pode levar a célula a uma desregulação semelhante ao que vimos para catástrofe mitótica que, por sua vez, pode direcionar a célula a vários tipos de morte celular.

O Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (NCCD do inglês *Nomenclature Committee on Cell Death*) define catástrofe mitótica não mais como um tipo de morte celular, mas sim como um mecanismo oncosupressivo. Esse mecanismo é iniciado por (i) perturbações no aparato mitótico (como por exemplo, inibição de topoisomerase II α , que impede a correta separação dos cromossomos); (ii) é iniciado durante a fase M do ciclo celular; (iii) é associado à algum grau de parada mitótica; e (iv) por último aciona morte celular ou senescência (GALLUZZI et al., 2012). Em nosso caso, a possível inibição de topoisomerase II α por 3-acetato de bufalina pode ter ocasionado falha na segregação dos cromossomos, evidenciado pelo aumento do volume celular e presença de células multinucleadas. O aumento da ploidia de células, como encontrado em algumas células tratadas pelos nossos bufadienólídeos, pode levar a formação de células gigantes com até 32 N de conteúdo de DNA, a exemplo de células de ovário de hamster (CHO) (HASINOFF et al., 2000). No entanto, para a maioria das células, o aumento da ploidia leva à catástrofe mitótica (LARSEN; ESCARGUEIL; SKLADANOWSKI, 2003). Como já foi mencionado, o acúmulo de ciclina B1, ocasionado pelos bufadienólídeos, pode ser também um indicativo de catástrofe mitótica (MC GEE, 2015). Essa via pode ter sido favorecida também pelo fato de a linhagem de próstata PC-3 não possuir *p53*, um conhecido inibidor de catástrofe mitótica. Como mencionando anteriormente, a catástrofe mitótica pode levar a outros processos de morte. Apoptose induzida pelos bufadienólídeos foi confirmada pela externalização de

fosfatidilserina e aumento de fragmentação celular e também por clivagem de caspase 8 (via extrínseca) e clivagem de PARP. Apesar de confirmada por essas características, a discreta ativação das mesmas nos leva a questionar a participação de outras vias no processo. É sabido que o complexo ciclina B1/CDK1, observado em nossos resultados, pode levar a inativação de Bcl-2 e Bcl-xL, ambos fatores antipoptóticos, levando a ativação de via não apoptótica (DUTTA et al., 2012). No entanto, em nossos resultados o fator pró-apoptótico Bax também teve sua expressão diminuída, o que pode ter reduzido a indução de apoptose, como confirmado pela ausência dos clivados de caspase 9, 3 e 7. Assim, por não conseguir ativar a via de morte por apoptose em todo seu potencial, a célula findou por ativar outros mecanismos de morte, em especial necrose programada. As células deficientes em PARP quando tratada pelos bufadienolídeos se tornaram sensivelmente mais resistentes, o que nos indicaria a participação de PARP em seu mecanismo de morte. A fragmentação de DNA sub-G1, o que geralmente indicaria apoptose intrínseca, pode também ser um indício de morte por PARP (parthanatos), uma vez que ativação de PARP libera AIF que poder ser indicado pela despolarização mitocondrial, também mostrado por nossos bufadienolídeos. A despolarização mitocondrial também pode ter sido ocasionada ainda pelo aumento de cálcio intracelular e como consequência a permeabilização de sua membrana com liberação de AIF, sinalizando para uma via de morte não-apoptótica (ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2015). Sabe-se que os bufadienolídeos, como por exemplo a bufalina, por sua inibição da Na^+/K^+ ATPase, causam aumento notável de cálcio intracelular reforçado por vários autores (WINNICKA et al., 2008; YU et al., 2008; GAO et al., 2011). O cálcio é essencial na atividade de PARP1 e acredita-se que o mesmo possa por si só ativa-lo (BÜRKLE; VIRÁG, 2013). Em resumo, esquematizado na **Figura 31**, a inibição de topoisomerase II α , e sua importante função na separação dos cromossomos durante mitose, por 3-acetato de bufalina e bufalina levaria à estado de catástrofe mitótica. A prolongação de tal estado sinalizaria a célula para morte celular primeiramente por apoptose e secundariamente por necrose programada, em especial parthanatos. No entanto, são necessários estudos posteriores a fim se de confirmar a participação desse e outros tipos de morte celular.

Figura 31. Mecanismos de ação proposto para os bufadienolídeos bufalina e 3-acetato de bufalina.



6 CONCLUSÃO

O bufadienolídeo 3-acetato de bufalina (BUF-06) se mostrou ligeiramente mais potente que bufalina (BUF-05) sendo capaz de promover efeito citostático em linhagem de câncer de próstata PC-3, promovendo eventos de morte celular do tipo necrótico e apoptótico por sua inibição de topoisomerase II e possível ativação do mecanismo oncosupressivo compatível com catástrofe mitótica. Portanto, pode ser considerado um novo protótipo de molécula com potencial anticâncer.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAHI, A. A. Trends and challenges of traditional medicine in Africa. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 5 SUPPL., p. 115–123, 2011.

ADAN, A.; ALIZADA, G.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y.; NALBANT, A. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163–176, 17 fev. 2017.

AHMAD, A.; MOORE, E. J. Comparison of Cell-Based Biosensors with Traditional Analytical Techniques for Cytotoxicity Monitoring and Screening of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment. **Analytical Letters**, v. 42, n. 1, p. 1–28, 20 jan. 2009.

ALEVIZOPOULOS, K.; CALOGEROPOULOU, T.; LANG, F.; STOURNARAS, C. Na⁺/K⁺ ATPase inhibitors in cancer. **Curr Drug Targets**, v. 15, n. 10, p. 988–1000, 2014.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, n. 2–3, p. 261–74, 30 jun. 2003.

BENDRIS, N.; LEMMERS, B.; BLANCHARD, J. M. **Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors** *Cell Cycle*, 2015.

BLOCK, K. I.; GYLLENHAAL, C.; LOWE, L.; AMEDEI, A.; RUHUL AMIN, A. R. M. et. al. Designing a broad-spectrum integrative approach for cancer prevention and treatment. **Seminars in Cancer Biology**, 2015. .

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular immunology**, v. 39, n. 11, p. 615–47, jan. 2003.

BROWN, M.; WITTEWER, C. Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8 II, p. 1221–1229, 2000.

BÜRKLE, A.; VIRÁG, L. Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 6, p. 1046–1065, 2013.

CALDERÓN-MONTAÑO, J. M.; BURGOS-MORÓN, E.; ORTA, M. L.; PASTOR, N.; AUSTIN, C. A.; MATEOS, S.; LÓPEZ-LÁZARO, M. Alpha, beta-unsaturated lactones 2-

furanone and 2-pyrone induce cellular DNA damage, formation of topoisomerase I- and II-DNA complexes and cancer cell death. **Toxicology Letters**, v. 222, p. 64–71, 2013.

CALDERÓN-MONTAÑO, J. M.; BURGOS-MORÓN, E.; ORTA, M. L.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, I.; MALDONADO-NAVAS, D.; LÓPEZ-LÁZARO, M. Bufalin is a steroid receptor coactivator inhibitor - Letter. **Cancer Research**, v. 75, n. 6, p. 1156, 2015.

CALDERÓN-MONTAÑO, J. M.; BURGOS-MORÓN, E.; ORTA, M. L.; MALDONADO-NAVAS, D.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, I.; LÓPEZ-LÁZARO, M. Evaluating the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides. **BioMed Research International**, 2014. .

CHAN, S. H.; LEU, W. J.; HSU, L. C.; CHANG, H. S.; HWANG, T. L.; CHEN, I. S.; CHEN, C. S.; GUH, J. H. Reevesioside F induces potent and efficient anti-proliferative and apoptotic activities through Na⁺/K⁺-ATPase α 3 subunit-involved mitochondrial stress and amplification of caspase cascades. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 11, p. 1564–1575, 2013.

CHAPARRO, J. C.; PRAMUK, J. B.; GLUESENKAMP, A. G. A new species of arboreal *Rhinella* (Anura : Bufonidae) from cloud forest of southeastern Peru. **Herpetologica**, v. 63, n. 2, p. 203–212, 2007.

CHEN, K. K.; CHEN, A. L. NOTES ON THE POISONOUS SECRETIONS OF TWELVE SPECIES OF TOADS. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 47, n. 3, p. 281–293, 1933.

CHEN, T.; SUN, Y.; JI, P.; KOPETZ, S.; ZHANG, W. Topoisomerase II α in chromosome instability and personalized cancer therapy. **Oncogene**, v. 34, n. 31, p. 4019–4031, 30 jul. 2015a.

CHEN, Y.; LI, M.; LI, Z.; GAO, P.; ZHOU, X.; ZHANG, J. Bufalin induces apoptosis in the U-2OS human osteosarcoma cell line via triggering the mitochondrial pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 1, p. 527–534, 1 jan. 2015b.

CHIPUK, J. E.; MOLDOVEANU, T.; LLAMBI, F.; PARSONS, M. J.; GREEN, D. R. **The BCL-2 Family Reunion** *Molecular Cell*, 2010. .

CHIU, L.-Y.; HO, F.-M.; SHIAH, S.-G.; CHANG, Y.; LIN, W.-W. Oxidative stress initiates DNA damager MNNG-induced poly(ADP-ribose)polymerase-1-dependent parthanatos cell death. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 3, p. 459–470, 1 fev. 2011.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 179–204, 22 out. 2010.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 72, n. 3, p. 365–79, 1997.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143–51, maio 2008.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012–43, jul. 2009.

CRAWFORD, E. D.; WELLS, J. A. Caspase Substrates and Cellular Remodeling. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 1055–1087, 2011.

CUMMINGS, J.; SMYTH, J. DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs. **Annals of Oncology**, v. 4, p. 533–543, 1993.

CUNHA-FILHO, G. A.; RESCK, I. S.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C. Ó.; MORAES, M. O.; FERREIRA, J. R. O.; RODRIGUES, F. A. R.; MARIA, L. Toxicity profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, v. 56, n. 3, p. 339–348, 2010.

CUNHA FILHO, G. a; SCHWARTZ, C. A.; RESCK, I. S.; MURTA, M. M.; LEMOS, S. S.; CASTRO, M. S.; KYAW, C.; PIRES, O. R.; LEITE, J. R. S.; BLOCH, C.; SCHWARTZ, E. F. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 6, p. 777–82, maio 2005.

DALY, J. W.; NOIMAI, N.; KONGKATHIP, B.; KONGKATHIP, N.; WILHAM, J. M.; GARRAFFO, H. M.; KANEKO, T.; SPANDE, T. F.; NIMIT, Y.; NABHITABHATA, J.; CHAN-ARD, T. Biologically active substances from amphibians: preliminary studies on anurans from twenty-one genera of Thailand. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 44, n. 8, p. 805–15, 15 dez. 2004.

DANIEL, D.; SÜSAL, C.; KOPP, B.; OPELZ, G.; TERNESS, P. Apoptosis-mediated selective killing of malignant cells by cardiac steroids: maintenance of cytotoxicity and loss of cardiac activity of chemically modified derivatives. **International immunopharmacology**, v. 3, n. 13–14, p. 1791–801, dez. 2003.

DARREL R., F. **Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0.**

Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>.

DELEBINSKI, C. I.; GEORGI, S.; KLEINSIMON, S.; TWARDZIOK, M.; KOPP, B.; MELZIG, M. F.; SEIFERT, G. Analysis of proliferation and apoptotic induction by 20 steroid glycosides in 143B osteosarcoma cells in vitro. **Cell Proliferation**, v. 48, n. 5, p. 600–610, 2015.

DEMING, P. B.; CISTULLI, C. a; ZHAO, H.; GRAVES, P. R.; PIWNICA-WORMS, H.; PAULES, R. S.; DOWNES, C. S.; KAUFMANN, W. K. The human decatenation checkpoint. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 12044–12049, 2001.

DENG, L.-J.; HU, L.-P.; PENG, Q.-L.; YANG, X.-L.; BAI, L.-L.; YIU, A.; LI, Y.; TIAN, H.-Y.; YE, W.-C.; ZHANG, D.-M. Hellebrigenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells through inhibition of Akt. **Chemico-biological interactions**, v. 219, n. June, p. 184–94, 2014.

DING, D.-W.; ZHANG, Y.-H.; HUANG, X.-E.; AN, Q.; ZHANG, X. Bufalin induces mitochondrial pathway-mediated apoptosis in lung adenocarcinoma cells. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 15, n. 23, p. 10495–10500, 2014.

DIX, M. M.; SIMON, G. M.; CRAVATT, B. F. Global Mapping of the Topography and Magnitude of Proteolytic Events in Apoptosis. **Cell**, v. 134, n. 4, p. 679–691, 2008.

DOBDELSTEIN, M.; MOLL, U. Targeting tumour-supportive cellular machineries in anticancer drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 3, p. 179–196, 2014.

DOBOS, G. J.; TAN, L.; COHEN, M. H.; MCINTYRE, M.; BAUER, R.; LI, X.; BENSOUSSAN, A. Are national quality standards for traditional Chinese herbal medicine sufficient? Current governmental regulations for traditional Chinese herbal medicine in certain Western countries and China as the Eastern origin country. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 13, n. 3, p. 183–190, 2005.

DOMÍNGUEZ, I.; PASTOR, N.; MATEOS, S.; CORTÉS, F. Testing the SCE mechanism with non-poisoning topoisomerase II inhibitors. **Mutation research**, v. 497, n. 1–2, p. 71–9, 18 out. 2001.

DONG, Y.; YIN, S.; LI, J.; JIANG, C.; YE, M.; HU, H. Bufadienolide compounds sensitize human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of STAT3/Mcl-1 pathway. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 16, n. 4, p. 394–403, abr. 2011.

DUTTA, C.; DAY, T.; KOPP, N.; VAN BODEGOM, D.; DAVIDS, M. S.; RYAN, J.; BIRD, L.; KOMMAJOSYULA, N.; WEIGERT, O.; YODA, A.; FUNG, H.; BROWN, J. R.; SHAPIRO, G. I.; LETAI, A.; WEINSTOCK, D. M. BCL2 suppresses PARP1 function and nonapoptotic cell death. **Cancer Research**, v. 72, n. 16, p. 4193–4203, 15 ago. 2012.

DZIADKOWIEC, K. N.; GAŚSIOROWSKA, E.; NOWAK-MARKWITZ, E.; JANKOWSKA, A. PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting. **Menopause review**, v. 15, n. 4, p. 215–219, 2016.

FATOKUN, A. A.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Parthanatos: Mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 8, p. 2000–2016, 2014.

FENWICK, N.; GRIFFIN, G.; GAUTHIER, C. The welfare of animals used in science: how the ‘Three Rs’ ethic guides improvements. **The Canadian veterinary journal = La revue vétérinaire canadienne**, v. 50, n. 5, p. 523–30, maio 2009.

FERREIRA, P. M. P.; LIMA, D. J. B.; DEBIASI, B. W.; SOARES, B. M.; MACHADO, K. da C.; NORONHA, J. da C.; RODRIGUES, D. de J.; SINHORIN, A. P.; PESSOA, C.; VIEIRA JÚNIOR, G. M. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon. **Toxicon**, v. 72, p. 43–51, 2013b.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 2017.

FROST, D. R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R. H.; HAAS, A.; HADDAD, C. F. B.; DE SÁ, R. O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S. C.; RAXWORTHY, C. J.; CAMPBELL, J. A.; BLOTTO, B. L.; MOLER, P.; DREWES, R. C.; NUSSBAUM, R. A.; LYNCH, J. D.; GREEN, D. M.; WHEELER, W. C. THE AMPHIBIAN TREE OF LIFE. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 297, p. 1–291, 2006.

FULDA, S.; GORMAN, A. M.; HORI, O.; SAMALI, A. Cellular stress responses: Cell survival and cell death. **International Journal of Cell Biology**, 2010. .

FUNG, T. K.; MA, H. T.; POON, R. Y. C. Specialized roles of the two mitotic cyclins in somatic cells: cyclin A as an activator of M phase-promoting factor. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 5, p. 1861–73, maio 2007.

FURET, P.; SCHOEPFER, J.; RADIMERSKI, T.; CHÈNE, P. Discovery of a new class of catalytic topoisomerase II inhibitors targeting the ATP-binding site by structure based design.

Part I. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 4014–4017, 2009.

GALLUZZI, L.; BAEHRECKE, E. H.; BALLABIO, A.; BOYA, P. et. al. Molecular definitions of autophagy and related processes. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 13, p. 1811–1836, 2017.

GALLUZZI, L.; BRAVO-SAN PEDRO, J. M.; VITALE, I.; AARONSON, S. a; ABRAMS, J. M.; ADAM, D.; ALNEMRI, E. S.; ALTUCCI, L.; ANDREWS, D. et. al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell death and differentiation**, n. 2014, p. 1–16, 2014a.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KRAUTWALD, S.; KROEMER, G.; LINKERMANN, A. Molecular mechanisms of regulated necrosis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 2014b. .

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S. et. al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell death and differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–20, 2012.

GALM, U.; SHEN, B. Natural Product Drug Discovery: The Times Have Never Been Better. In: Chemistry and Biology, 10, **Anais...**2007.

GAO, H.; POPESCU, R.; KOPP, B.; WANG, Z. Bufadienolides and their antitumor activity. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 5, p. 953, 2011.

GIRI, B.; GOMES, a; DEBNATH, a; SAHA, a; BISWAS, a K.; DASGUPTA, S. C. Antiproliferative, cytotoxic and apoptogenic activity of Indian toad (*Bufo melanostictus*, Schneider) skin extract on U937 and K562 cells. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 48, n. 4, p. 388–400, 15 set. 2006.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancrologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

GULLETT, N. P.; MAZURAK, V. C.; HEBBAR, G.; ZIEGLER, T. R. Nutritional Interventions for Cancer-Induced Cachexia. **Current Problems in Cancer**, v. 35, n. 2, p. 58–90, 2011.

HAMILTON, G. R.; BASKETT, T. F. In the arms of Morpheus the development of morphine for postoperative pain relief. **Canadian journal of anaesthesia**, v. 47, n. 4, p. 367–74, 2000.

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

70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARBOUR, J. W.; LUO, R. X.; DEI SANTI, A.; POSTIGO, A. A.; DEAN, D. C. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. **Cell**, v. 98, n. 6, p. 859–869, 1999.

HARTWELL, L.; WEINERT, T. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, n. 4930, p. 629–634, 1989.

HASHIMOTO, S.; JING, Y.; KAWAZOE, N.; MASUDA, Y.; NAKAJO, S.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y.; NAKAYA, K. Bufalin reduces the level of topoisomerase II in human leukemia cells and affects the cytotoxicity of anticancer drugs. **Leukemia research**, v. 21, n. 9, p. 875–83, set. 1997.

HASINOFF, B. B.; ABRAM, M. E.; BARNABÉ, N.; KHÉLIFA, T.; ALLAN, W. P.; YALOWICH, J. C. The catalytic DNA topoisomerase II inhibitor dexrazoxane (ICRF-187) induces differentiation and apoptosis in human leukemia K562 cells. **Molecular pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 453–461, 2001.

HASINOFF, B. B.; ABRAM, M. E.; CHEE, G. L.; HUEBNER, E.; BYARD, E. H.; BARNABÉ, N.; FERRANS, V. J.; YU, Z. X.; YALOWICH, J. C. The catalytic DNA topoisomerase II inhibitor dexrazoxane (ICRF-187) induces endopolyploidy in Chinese hamster ovary cells. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 295, n. 2, p. 474–83, nov. 2000.

HAUCK, C.; FRISHMAN, W. H. Systemic hypertension: the roles of salt, vascular Na⁺/K⁺ ATPase and the endogenous glycosides, ouabain and marinobufagenin. **Cardiology in review**, v. 20, n. 3, p. 130–8, 2012.

HOCHEGGER, H.; TAKEDA, S.; HUNT, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 11, p. 910–916, 24 nov. 2008.

HOFFMAN, R. M. In vitro sensitivity assays in cancer: a review, analysis, and prognosis. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 5, n. 2, p. 133–43, 1991.

HONG, J. **Role of natural product diversity in chemical biology** *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011. .

HONG, S. H.; CHOI, Y. H. Bufalin induces apoptosis through activation of both the intrinsic and extrinsic pathways in human bladder cancer cells. **Oncology Reports**, n. 15, p. 114–120, 2011.

HSU, C. M.; TSAI, Y.; WAN, L.; TSAI, F. J. Bufalin induces G2/M phase arrest and triggers autophagy via the TNF, JNK, BECN-1 and ATG8 pathway in human hepatoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 1, p. 338–348, 2013.

HU, K.; ZHU, L.; LIANG, H.; HU, F.; FENG, J. Improved antitumor efficacy and reduced toxicity of liposomes containing bufadienolides. **Archives of pharmacal research**, v. 34, n. 9, p. 1487–94, set. 2011.

HUANG, H.; CAO, Y.; WEI, W.; LIU, W.; LU, S.-Y.; CHEN, Y.-B.; WANG, Y.; YAN, H.; WU, Y.-L. Targeting Poly (ADP-Ribose) Polymerase Partially Contributes to Bufalin-Induced Cell Death in Multiple Myeloma Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

HUANG, W.-W. Bufalin increases sensitivity to AKT/mTOR-induced autophagic cell death in SK-HEP-1 human hepatocellular carcinoma cells. **International Journal of Oncology**, n. 500, p. 1431–1442, 2012.

HUANG, W.-W.; YANG, J.-S.; PAI, S.-J.; WU, P.-P.; CHANG, S.-J.; CHUEH, F.-S.; FAN, M.-J.; CHIOU, S.-M.; KUO, H.-M.; YEH, C.-C.; CHEN, P.-Y.; TSUZUKI, M.; CHUNG, J.-G. Bufalin induces G(0)/G(1) phase arrest through inhibiting the levels of cyclin D, cyclin E, CDK2 and CDK4, and triggers apoptosis via mitochondrial signaling pathway in T24 human bladder cancer cells. **Mutation research**, v. 732, n. 1–2, p. 26–33, 1 abr. 2012a.

HUERTA, S.; GOULET, E. J.; HUERTA-YEPEZ, S.; LIVINGSTON, E. H. Screening and detection of apoptosis. **The Journal of surgical research**, v. 139, n. 1, p. 143–56, 1 maio 2007.

ICHIKAWA, M.; SOWA, Y.; IIZUMI, Y.; AONO, Y.; SAKAI, T. Resibufogenin induces G1-phase arrest through the proteasomal degradation of cyclin D1 in human malignant tumor cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–12, 2015.

ISHIDA, R.; MIKI, T.; NARITA, T.; YUI, R.; SATO, M.; UTSUMI, K. R.; TANABE, K. Inhibition of Intracellular Topoisomerase II by Antitumor Bis (2 , 6-dioxopiperazine) Derivatives : Mode of Cell Growth Inhibition Distinct from that of Cleavable Complex-forming Type Inhibitors1. **Electronics**, p. 4909–4916, 1991.

JANSE VAN VUUREN, R.; VISAGIE, M. H.; THERON, A. E.; JOUBERT, A. M.

Antimitotic drugs in the treatment of cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 76, p. 1101–1112, 2015.

JI, J.; ZHANG, Y.; REDON, C. E.; REINHOLD, W. C.; CHEN, A. P.; FOGLI, L. K.; HOLBECK, S. L.; PARCHEMENT, R. E.; HOLLINGSHEAD, M.; TOMASZEWSKI, J. E.; DUDON, Q.; POMMIER, Y.; DOROSHOW, J. H.; BONNER, W. M. Phosphorylated fraction of H2AX as a measurement for DNA damage in cancer cells and potential applications of a novel assay. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–18, 2017.

JIANG, L.; ZHAO, M.-N.; LIU, T.-Y.; WU, X.-S.; WENG, H.; DING, Q.; SHU, Y.-J.; BAO, R.-F.; LI, M.-L.; MU, J.-S.; WU, W.-G.; DING, Q.-C.; CAO, Y.; HU, Y.-P.; SHEN, B.-Y.; TAN, Z.-J.; LIU, Y.-B. Bufalin induces cell cycle arrest and apoptosis in gallbladder carcinoma cells. **Tumor Biology**, v. 35, n. 11, p. 10931–10941, 2014.

JOO, Y.-E. Natural product-derived drugs for the treatment of inflammatory bowel diseases. **Intestinal research**, v. 12, n. 2, p. 103–9, 2014.

JUN, K. Y.; LEE, E. Y.; JUNG, M. J.; LEE, O. H.; LEE, E. S.; PARK CHOO, H. Y.; NA, Y.; KWON, Y. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking study of 3-(3'-heteroatom substituted-2'-hydroxy-1'-propyloxy) xanthone analogues as novel topoisomerase II α catalytic inhibitor. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 1964–1971, 2011.

KACZMAREK, A.; VANDENABEELE, P.; KRYSKO, D. V. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. **Immunity**, v. 38, p. 209–223, 2013.

KAMANO, Y.; KOTAKE, a; HASHIMA, H.; INOUE, M.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; NANDACHI, N.; SEGAWA, T.; YUKITA, a; SAITOU, K.; KATSUYAMA, M.; PETTIT, G. R. Structure-cytotoxic activity relationship for the toad poison bufadienolides. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 6, n. 7, p. 1103–15, jul. 1998.

KAMANO, Y.; SATOH, N.; NAKAYOSHI, H.; PETTIT, G. R.; SMITH, C. R. Rhinovirus inhibition by bufadienolides. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 36, n. 1, p. 326–32, jan. 1988.

KHANNA, C.; ROSENBERG, M.; VAIL, D. M. A review of paclitaxel and novel formulations including those suitable for use in dogs **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 2015. .

KHO, D.; MACDONALD, C.; JOHNSON, R.; UNSWORTH, C.; O'CARROLL, S.;

MEZ, E.; ANGEL, C.; GRAHAM, E. Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. **Biosensors**, v. 5, n. 2, p. 199–222, 16 abr. 2015.

KRENN, L.; KOPP, B. Bufadienolides from animal and plant sources. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 1–29, maio 1998.

KUO, P.-C.; KUO, T.-H.; SU, C.-R.; LIOU, M.-J.; WU, T.-S. Cytotoxic principles and α -pyrone ring-opening derivatives of bufadienolides from *Kalanchoe hybrida*. **Tetrahedron**, v. 64, n. 15, p. 3392–3396, 7 abr. 2008.

KUSTERMANN, S.; BOESS, F.; BUNESS, A.; SCHMITZ, M.; WATZELE, M.; WEISER, T.; SINGER, T.; SUTER, L.; ROTH, A. A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 5, p. 1589–1595, ago. 2013.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. **Mechanisms and functions of inflammasomes** *Cell*, 2014. .

LARSEN, A. K.; ESCARGUEIL, A. E.; SKLADANOWSKI, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, n. 2, p. 167–181, 2003.

LEE, C.-D.; SUI, X.; HOOKER, S. P.; HÉBERT, J. R.; BLAIR, S. N. Combined impact of lifestyle factors on cancer mortality in men. **Annals of epidemiology**, v. 21, n. 10, p. 749–54, 2011.

LEE, S.; LEE, Y.; CHOI, Y. J.; HAN, K.-S.; CHUNG, H. W. Cyto-/genotoxic effects of the ethanol extract of Chan Su, a traditional Chinese medicine, in human cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, n. 2, p. 372–376, 2014a.

LI-WEBER, M. New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. **Cancer Treatment Reviews**, 2009. .

LI, B. J.; TIAN, H. Y.; ZHANG, D. M.; LEI, Y. H.; WANG, L.; JIANG, R. W.; YE, W. C. Bufadienolides with cytotoxic activity from the skins of *Bufo bufo gargarizans*. **Fitoterapia**, v. 105, p. 7–15, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2015.05.013>>.

LICHTSTEIN, D.; GATI, I.; BABILA, T.; HAVER, E.; KATZ, U. Effect of salt acclimation on digitalis-like compounds in the toad. **BBA - General Subjects**, v. 1073, n. 1, p. 65–68, 1991.

LIMA, D. J. B. **Estudo da atividade anticâncer da marinobufagenina, um bufadienolídeo extraído de anfíbios da espécie *Rhinella marina***. 2016. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LIU, J.; ZHANG, D.; LI, Y.; CHEN, W.; RUAN, Z.; DENG, L.; WANG, L.; TIAN, H.; YIU, A.; FAN, C.; LUO, H.; LIU, S.; WANG, Y.; XIAO, G.; CHEN, L.; YE, W. Discovery of bufadienolides as a novel class of CIC-3 chloride channel activators with antitumor activities. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5734–5743, 2013.

LIU, L. F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. **Annual review of biochemistry**, v. 58, n. type I, p. 351–375, 1989.

LU, C.-X.; NAN, K.-J.; LEI, Y. Agents from amphibians with anticancer properties. **Anti-cancer drugs**, v. 19, n. 10, p. 931–9, nov. 2008.

LUNDBERG, A. S.; WEINBERG, R. A. Functional Inactivation of the Retinoblastoma Protein Requires Sequential Modification by at Least Two Distinct Cyclin-cdk Complexes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 2, p. 753–761, 1998.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Review Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, p. 823–837, 2009.

MAHRUS, S.; TRINIDAD, J. C.; BARKAN, D. T.; SALI, A.; BURLINGAME, A. L.; WELLS, J. A. Global sequencing of proteolytic cleavage sites in apoptosis by specific labeling of protein N termini. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 866–876, 2008.

MALUMBRES, M. Physiological Relevance of Cell Cycle Kinases. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 3, p. 973–1007, 2011.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. TO CYCLE OR NOT TO CYCLE : A CRITICAL DECISION IN CANCER. v. 1, n. December, p. 222–231, 2001.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends in Biochemical Sciences**, 2005. .

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153–166, 2009.

MASUDA, Y.; KAWAZOE, N.; NAKAJO, S.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y.; NAKAYA, K. Bufalin induces apoptosis and influences the expression of apoptosis-related genes in human leukemia cells. **Leukemia research**, v. 19, n. 8, p. 549–56, ago. 1995.

MC GEE, M. M. Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer.

Mediators of Inflammation, v. 2015, 2015.

MCCONKEY, B. J.; SOBOLEV, V.; EDELMAN, M. The performance of current methods in ligand – protein docking. **Current Science**, v. 83, n. 7, p. 845–856, 2002.

MELINO, G. Discovery of the ubiquitin proteasome system and its involvement in apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, p. 1155–1157, 2005.

MENG, X.-Y.; ZHANG, H.-X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–57, jun. 2011.

MENG, Y.; WHITING, P.; ŠIK, V.; REES, H. H.; DINAN, L. Ecdysteroids and bufadienolides from *Helleborus torquatus* (Ranunculaceae). **Phytochemistry**, v. 57, n. 3, p. 401–407, 2001.

MIJATOVIC, T.; VAN QUAQUEBEKE, E.; DELEST, B.; DEBEIR, O.; DARRO, F.; KISS, R. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1776, n. 1, p. 32–57, set. 2007.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 107–132, 2011.

MÓDIS, K.; COLETTA, C.; ASIMAKOPOULOU, A.; SZCZESNY, B.; CHAO, C.; PAPAPETROPOULOS, A.; HELLMICH, M. R.; SZABO, C. Effect of S-adenosyl-l-methionine (SAM), an allosteric activator of cystathionine- β -synthase (CBS) on colorectal cancer cell proliferation and bioenergetics in vitro. **Nitric Oxide**, v. 41, p. 146–156, 15 set. 2014.

MORALES, J.; LI, L.; FATTAH, F. J.; DONG, Y.; BEY, E. A.; PATEL, M.; GAO, J.; BOOTHMAN, D. A. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 24, n. 1, p. 15–28, 2014.

MORENO Y BANULS, L.; KATZ, A.; MIKLOS, W.; CIMMINO, A.; TAL, D. M.; AINBINDER, E.; ZEHL, M.; URBAN, E.; EVIDENTE, A.; KOPP, B.; BERGER, W.; FERON, O.; KARLISH, S.; KISS, R. Hellebrin and its aglycone form hellebrigenin display similar in vitro growth inhibitory effects in cancer cells and binding profiles to the alpha subunits of the Na⁺/K⁺-ATPase. **Molecular cancer**, v. 12, n. 1, p. 33, 2013.

MUSACCHIO, A.; SALMON, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time.

Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 8, n. 5, p. 379–393, 2007.

NASU, K.; NISHIDA, M.; UEDA, T.; TAKAI, N.; BING, S.; NARAHARA, H.; MIYAKAWA, I. Bufalin induces apoptosis and the G0/G1 cell cycle arrest of endometriotic stromal cells: a promising agent for the treatment of endometriosis. **Molecular human reproduction**, v. 11, n. 11, p. 817–23, nov. 2005b.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NEWMAN, R. A.; YANG, P.; PAWLUS, A. D.; BLOCK, K. I. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. **Mol.Interv.**, v. 8, p. 36–49, 2008.

NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st Century natural product research and drug development and traditional medicines. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 4, p. 584, 2013.

NICKOLOFF, J. A.; JONES, D.; LEE, S. H.; WILLIAMSON, E. A.; HROMAS, R. **Drugging the Cancers Addicted to DNA Repair** *Journal of the National Cancer Institute*, 2017.

NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 5, p. 338–350, 2009.

NODA, N. N.; INAGAKI, F. Mechanisms of Autophagy. **Annual Review of Biophysics**, v. 44, n. 1, p. 101–122, 2015.

NOGAWA, T.; KAMANO, Y.; YAMASHITA, A.; PETTIT, G. R. Isolation and Structure of Five New Cancer Cell Growth Inhibitory Bufadienolides from the Chinese Traditional Drug Ch'an Su. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 9, p. 1148–1152, set. 2001.

NUMAZAWA, S.; SHINOKI, M. A.; ITO, H.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y. Involvement of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase inhibition in K562 cell differentiation induced by bufalin. **Journal of cellular physiology**, v. 160, n. 1, p. 113–20, jul. 1994.

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 460, p. 72–81, 2015.

OW, Y.-L. P.; GREEN, D. R.; HAO, Z.; MAK, T. W. Cytochrome c: functions beyond respiration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 7, p. 532–542, 2008.

PALUMBO, M. O.; KAVAN, P.; MILLER, W. H.; PANASCI, L.; ASSOULINE, S.; JOHNSON, N.; COHEN, V.; PATENAUDE, F.; POLLAK, M.; JAGOE, R. T.; BATIST, G.

Systemic cancer therapy: Achievements and challenges that lie ahead. **Frontiers in Pharmacology**, 2013. .

PASPARAKIS, M.; VANDENABEELE, P. Necroptosis and its role in inflammation. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 311–320, 2015.

PASTOR, N.; CORTÉS, F. Bufalin influences the repair of X-ray-induced DNA breaks in Chinese hamster cells. **DNA Repair**, v. 2, n. 12, p. 1353–1360, dez. 2003.

PASTOR, N.; DOMÍNGUEZ, I.; MATEOS, S.; CORTÉS, F. A comparative study of genotoxic effects of anti-topoisomerase II drugs ICRF-193 and bufalin in Chinese hamster ovary cells. **Mutation research**, v. 515, n. 1–2, p. 171–80, 25 mar. 2002.

PEPER, J. K.; SCHUSTER, H.; LÖFFLER, M. W.; SCHMID-HORCH, B.; RAMMENSEE, H.-G.; STEVANOVIĆ, S. An impedance-based cytotoxicity assay for real-time and label-free assessment of T-cell-mediated killing of adherent cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 405, p. 192–198, mar. 2014.

PERERA CÓRDOVA, W. H.; LEITÃO, S. G.; CUNHA-FILHO, G.; BOSCH, R. A.; ALONSO, I. P.; PEREDA-MIRANDA, R.; GERVOU, R.; TOUZA, N. A.; QUINTAS, L. E. M.; NOËL, F. Bufadienolides from parotoid gland secretions of Cuban toad *Peltophyryne fustiger* (Bufonidae): Inhibition of human kidney Na⁺/K⁺-ATPase activity. **Toxicon**, v. 110, p. 27–34, 2016.

PETERS, J. M. The anaphase-promoting complex: Proteolysis in mitosis and beyond. **Molecular Cell**, 2002. .

POMMIER, Y. Finding the interface: More than an image. **Cancer Biology and Therapy**, 2007. .

POMMIER, Y. Drugging topoisomerases: Lessons and Challenges. **ACS Chemical Biology**, 2013. .

POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.; MARCHAND, C. Review DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. **Chemistry & Biology**, v. 17, n. 5, p. 421–433, 2010a.

POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.; MARCHAND, C. **DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs** *Chemistry and Biology*, 2010b.

POMMIER, Y.; SUN, Y.; HUANG, S. N.; NITISS, J. L. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. **Nature Reviews Molecular**

Cell Biology, v. 17, n. 11, p. 703–721, 21 set. 2016.

POTAPOVA, T. A.; DAUM, J. R.; PITTMAN, B. D.; HUDSON, J. R.; JONES, T. N.; SATINOVER, D. L.; STUKENBERG, P. T.; GORBISKY, G. J. The reversibility of mitotic exit in vertebrate cells. **Nature**, v. 440, n. 7086, p. 954–958, 2006.

POURQUIER, P.; UENG, L.-M.; FERTALA, J.; WANG, D.; PARK, H.-J.; ESSIGMANN, J. M.; BJORNSTI, M.-A.; POMMIER, Y. Induction of Reversible Complexes between Eukaryotic DNA Topoisomerase I and DNA containing Oxidative Base Damages. 7,8-Dihydro-8-Oxoguanine and 5-Hydroxycytosine. **J. Biol. Chem.** 1999, 274, 8516–8523.

PRAMUK, J. B. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 146, n. 3, p. 407–452, 2006.

QI, F.; LI, A.; INAGAKI, Y.; XU, H.; WANG, D.; CUI, X.; ZHANG, L.; KOKUDO, N.; DU, G.; TANG, W. Induction of apoptosis by cinobufacini preparation through mitochondria- and Fas-mediated caspase-dependent pathways in human hepatocellular carcinoma cells. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 50, n. 2, p. 295–302, fev. 2012.

REES, L.; WEIL, a. Integrated medicine. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 322, n. 7279, p. 119–120, 2001.

REN, D.; TU, H.-C.; KIM, H.; WANG, G. X.; BEAN, G. R.; TAKEUCHI, O.; JEFFERS, J. R.; ZAMBETTI, G. P.; HSIEH, J. J.-D.; CHENG, E. H.-Y. BID, BIM, and PUMA Are Essential for Activation of the BAX- and BAK-Dependent Cell Death Program. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1390–1393, 2010.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.;* DA SILVA, C. H. P., Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos, **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p.739-736, dez., 2012.

RONINSON, I. B.; BROUDE, E. V.; CHANG, B.-D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. **Drug Resistance Updates**, v. 4, n. 5, p. 303–313, 2001.

SACRISTAN, C.; KOPS, G. J. P. L. Joined at the hip: kinetochores, microtubules, and spindle assembly checkpoint signaling. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 1, p. 21–28, 1 jan. 2015.

SALERNO, S.; DA SETTIMO, F.; TALIANI, S.; SIMORINI, F.; LA MOTTA, C.; FORNACIARI, G.; MARINI, A. M. Recent advances in the development of dual topoisomerase I and II inhibitors as anticancer drugs. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 35, p. 4270–4290, 2010.

SALMELA, A.-L.; KALLIO, M. J. Mitosis as an anti-cancer drug target. **Chromosoma**, v. 122, n. 5, p. 431–449, 2013.

SCIANI, J. M.; DE-SÁ-JÚNIOR, P. L.; FERREIRA, A. K.; PEREIRA, A.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; PIMENTA, D. C. Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 10–18, 2013.

SCRACE, S.; O'NEILL, E.; HAMMOND, E. M.; PIRES, I. M. Use of the xCELLigence System for Real-Time Analysis of Changes in Cellular Motility and Adhesion in Physiological Conditions. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.]1046p. 295–306.

SHAWVER, L. K.; SLAMON, D.; ULLRICH, A. Smart drugs:Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. v. 1, 2002.

SHEN, S.; ZHANG, Y.; WANG, Z.; LIU, R.; GONG, X. Bufalin induces the interplay between apoptosis and autophagy in glioma cells through endoplasmic reticulum stress. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 2, p. 212–224, 2014.

SHI, Q.-W.; LI, L.-G.; HUO, C.-H.; ZHANG, M.-L.; WANG, Y.-F. Study on natural medicinal chemistry and new drug development. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, v. 41, n. 10, p. 1583–1589, 2010.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.

SOARES, B. M. **Efeitos citotóxicos *in vitro* do bufodienolídeo hellebrigenina isolado do sapo *Rhinella schneideri* (Werner, 1984)**. 2010. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SOARES, B. M. **Hellebrigenina, um bufodienolídeo com potencial ação compatível de inibidor catalítico da topoisomerase II**. 2013. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. Carcinogenesis explained within the context of a theory of organisms. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 122, n. 1, p. 70–76, out.

2016.

SOSNA, J.; VOIGT, S.; MATHIEU, S.; LANGE, A.; THON, L.; DAVARNIA, P.; HERDEGEN, T.; LINKERMANN, A.; RITTGER, A.; CHAN, F. K.-M.; KABELITZ, D.; SCHÜTZE, S.; ADAM, D. TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 2, p. 331–348, 13 jan. 2014.

SRINIVASULA, S. M.; AHMAD, M.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; LITWACK, G.; ALNEMRI, E. S. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 25, p. 14486–91, 1996.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. World cancer report 2014. **World Health Organization**, p. 1–2, 2014.

STEYN, P. S.; VAN HEERDEN, F. R. Bufadienolides of plant and animal origin. **Natural product reports**, v. 15, n. 4, p. 397–413, ago. 1998.

STILL, J. Use of animal products in traditional Chinese medicine: Environmental impact and health hazards. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 11, n. 2, p. 118–122, 2003.

SU, C.-L.; LIN, T.-Y.; LIN, C.-N.; WON, S.-J. Involvement of caspases and apoptosis-inducing factor in bufotalin-induced apoptosis of Hep 3B cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 1, p. 55–61, 14 jan. 2009.

SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. **New insecticidal bufadienolide, bryophyllin C, from Kalanchoe pinnata. Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 2000. .

SUZANNE, M.; STELLER, H. Shaping organisms with apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 20, n. 5, p. 669–675, 2013.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 621–632, 4 set. 2010.

TAKAI, N.; UEDA, T.; NISHIDA, M.; NASU, K.; NARAHARA, H. Bufalin induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 21, n. 5, p. 637–643, 2008.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 231–241, 1 mar. 2008b.

TAYLOR, S. C.; POSCH, A. The design of a quantitative western blot experiment. **BioMed research international**, v. 2014, p. 361590, 2014.

TEMPONE, A. G.; PIMENTA, D. C.; LEBRUN, I.; SARTORELLI, P.; TANIWAKI, N. N.; DE ANDRADE, H. F.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 52, n. 1, p. 13–21, jul. 2008.

TIWARI, G.; TIWARI, R.; SRIWASTAWA, B.; BHATI, L.; PANDEY, S.; PANDEY, P.; BANNERJEE, S. K. Drug delivery systems: An updated review. **International journal of pharmaceutical investigation**, v. 2, n. 1, p. 2–11, jan. 2012.

VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n. 7, p. 1153–1162, 2008.

VALERIOTE, F.; VAN PUTTEN, L. Proliferation-dependent cytotoxicity of anticancer agents: a review. **Cancer research**, v. 35, n. 10, p. 2619–30, out. 1975.

VANDEN BERGHE, T.; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P.; BERGHE, T. Vanden; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 2, p. 135–47, 2014.

VANLANGENAKKER, N.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. **Cell death and differentiation**, v. 19, n. 1, p. 75–86, jan. 2012.

VITALE, I.; GALLUZZI, L.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 6, p. 385–392, 2011.

WAJANT, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1635–1636, 2002.

WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.

105, n. Supplement 1, p. 11466–11473, 2008.

WANG, D. L.; QI, F. H.; TANG, W.; WANG, F. S. Chemical constituents and bioactivities of the skin of *Bufo bufo gargarizans cantor*. **Chemistry and Biodiversity**, 2011. .

WANG, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 3, n. 6, p. 430–440, 2002.

WATABE, M.; NAKAJO, S.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y.; NAKAYA, K. Treatment of U937 cells with bufalin induces the translocation of casein kinase 2 and modulates the activity of topoisomerase II prior to the induction of apoptosis. **Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research**, v. 8, n. 8, p. 871–9, ago. 1997.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Genetic Implications of the structure of Deoxyribonucleic Acid. **Nature**, v. 171, p. 964–967, 1953.

WINDING, P.; BERCHTOLD, M. W. The chicken B cell line DT40: A novel tool for gene disruption experiments. **Journal of Immunological Methods**, v. 249, n. 1–2, p. 1–16, 2001.

WINNICKA, K.; BIELAWSKI, K.; BIELAWSKA, A.; SURAZYŃSKI, A. Antiproliferative activity of derivatives of ouabain, digoxin and proscillaridin A in human MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. **Biological & pharmaceutical bulletin**, 2008. .

WU, S.-H.; HSIAO, Y.-T.; CHEN, J.-C.; LIN, J.-H.; HSU, S.-C.; HSIA, T.-C.; YANG, S.-T.; HSU, W.-H.; CHUNG, J.-G. Bufalin alters gene expressions associated DNA damage, cell cycle, and apoptosis in human lung cancer NCI-H460 cells in vitro. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 5, p. 6047–6057, 2014.

XIA, M.; HUANG, R.; WITT, K. L.; SOUTHALL, N.; FOSTEL, J.; CHO, M.-H.; JADHAV, A.; SMITH, C. S.; INGLESE, J.; PORTIER, C. J.; TICE, R. R.; AUSTIN, C. P. Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. **Environmental health perspectives**, v. 116, n. 3, p. 284–91, mar. 2008.

XIE, C.-M.; CHAN, W. Y.; YU, S.; ZHAO, J.; CHENG, C. H. K. Bufalin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation and JNK activation. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 7, p. 1365–75, 1 out. 2011a.

XIE, C. M.; LIU, X. Y.; YU, S.; CHENG, C. H. K. Cardiac glycosides block cancer growth through HIF-1 α -and NF- κ B-mediated Plk1. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 8, p. 1870–1880,

2013.

XIE, R.-F.; LI, Z.-C.; GAO, B.; SHI, Z.-N.; ZHOU, X. Bufotionine, a possible effective component in cinobufocini injection for hepatocellular carcinoma. **Journal of ethnopharmacology**, v. 141, n. 2, p. 692–700, 1 jun. 2011b.

XU, R.; XIE, H. Q.; DENG, L. L.; ZHANG, J. X.; YANG, F. M.; LIU, J. H.; HAO, X. J.; ZHANG, Y. H. A new bufadienolide with cytotoxic activity from the Chinese traditional drug Ch'an Su. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 8, p. 623–627, 2014.

YAM, C. H.; FUNG, T. K.; POON, R. Y. C. Cyclin A in cell cycle control and cancer. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 59, n. 8, p. 1317–26, ago. 2002.

YAN, S.; QU, X.; XU, L.; CHE, X.; MA, Y.; ZHANG, L.; TENG, Y.; ZOU, H.; LIU, Y. Bufalin enhances TRAIL-induced apoptosis by redistributing death receptors in lipid rafts in breast cancer cells. **Anticancer Drugs**, v. 25, n. 6, p. 683–689, 2014.

YANG, Q.; ZHOU, X.; ZHANG, M.; BI, L.; MIAO, S.; CAO, W.; XIE, Y.; SUN, J.; TANG, H.; LI, Y.; MIAO, Q.; WANG, S. Angel of human health: Current research updates in toad medicine. **American Journal of Translational Research**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2015.

YE, M.; QU, G.; GUO, H.; GUO, D. Novel cytotoxic bufadienolides derived from bufalin by microbial hydroxylation and their structure-activity relationships. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 91, n. 1–2, p. 87–98, jun. 2004.

YEH, J. Y.; HUANG, W. J.; KAN, S. F.; WANG, P. S. Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. **Prostate**, v. 54, n. 2, p. 112–124, 2003.

YEON, J. H.; PARK, J.-K. Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip. **Analytical Biochemistry**, v. 341, n. 2, p. 308–315, jun. 2005.

YIN, P.-H.; LIU, X.; QIU, Y.-Y.; CAI, J.; QIN, J.; ZHU, H.-R.; LI, Q. Anti-tumor activity and apoptosis-regulation mechanisms of bufalin in various cancers: new hope for cancer patients. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 13, n. 11, p. 5339–43, 2012.

YIN, X. M.; WANG, K.; GROSS, A.; ZHAO, Y.; ZINKEL, S.; KLOCKE, B.; ROTH, K. A.; KORSMEYER, S. J. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. **Nature**, v. 400, n. 6747, p. 886–891, 1999.

YU, C.; KAN, S.; PU, H.; CHIEN, E. J.; WANG, P. S. Apoptotic signaling in bufalin-

and cinobufagin-treated androgen-dependent and -independent human prostate cancer cells. **Cancer Science**, v. 99, n. 12, p. 2467–2476, 2008.

YUAN, H.; MA, Q.; YE, L.; PIAO, G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 559, 29 abr. 2016.

ZAKERI, Z.; QUAGLINO, D.; AHUJA, H. S. Apoptotic cell death in the mouse limb and its suppression in the hammertoe mutant. **Developmental Biology**, v. 165, n. 1, p. 294–297, 1994.

ZHAI, X.; LU, J.; WANG, Y.; FANG, F.; LI, B.; GU, W. Reversal effect of bufalin on multidrug resistance in K562/VCR vin- cristine-resistant leukemia cell line. 2014.

ZHANG, L.; NAKAYA, K.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y. Bufalin as a potent inducer of differentiation of human myeloid leukemia cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 178, n. 2, p. 686–693, 1991.

ZHU, Z.; LI, E.; LIU, Y.; GAO, Y.; SUN, H.; MA, G.; WANG, Z.; LIU, X.; WANG, Q.; QU, X.; LIU, Y.; YU, Y. Inhibition of Jak-STAT3 pathway enhances bufalin-induced apoptosis in colon cancer SW620 cells. **World journal of surgical oncology**, v. 10, n. 1, p. 228, 2012.
Disponível em:

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S. C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; FORMELLI, F.; MIYASHITA, T.; REED, J. .; ZUNINO, F.; SPINELLI, S.; FARRELL, N.; ZUNINO, F.; GUPTA, T. K. .; PEZZUTO, J. . Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer letters**, v. 175, n. 1, p. 17–25, 10 jan. 2002.