



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

**Tese de Doutorado**

**Título:**

**ESTAUROSPORINAS DE *Eudistoma vannamei*:  
QUÍMICA E BIOATIVIDADE**

**Paula Christine Jimenez**

**Fortaleza - CE**

**2009**

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

**ESTAUROSPORINAS DE *Eudistoma vannamei*: QUÍMICA E BIOATIVIDADE**

**Paula Christine Jimenez**

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

**Orientadora:  
Leticia Veras Costa Lotufo**

**Fortaleza - CE  
Julho, 2009**

# ESTAUROSPORINAS DE *Eudistoma vannamei*: QUÍMICA E BIOATIVIDADE

**Paula Christine Jimenez**

Tese submetida à coordenação do curso de Pós-graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

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

Fortaleza, 15 de julho de 2009.

## BANCA EXAMINADORA

---

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Leticia Veras Costa Lotufo**  
Universidade Federal do Ceará

---

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

---

**Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao**  
Universidade Federal do Ceará

---

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Glaucia Machado Santelli**  
Universidade de São Paulo

---

**Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego**  
Universidade de São Paulo

*À minha mãe, que me criou como  
princesa, dedico o meu reino.*

*Aos que amo;*

*Aos noctívagos, insones e existencialistas do mundo inteiro;*

*Aos que sabem que ternura, compaixão e solidariedade não são  
fraquezas;*

*Aos que confiam ser na educação aonde jaz a salvação da humanidade;*

*Aos que defendem a Universidade pública e reconhecem a grande fortuna  
de estudar numa instituição gratuita e de qualidade;*

*Aos que fazem ciência e acreditam que a pesquisa básica, desatada das  
amarras do sistema, é o naipe essencial para a edificação do  
conhecimento;*

*Aos que cederam ao desejo desvairado de sair correndo e encontraram o  
caminho de volta pra casa;*

*Aos que crêem, por cima das explicações e quantificações científicas, que  
se paire qualquer coisa de mística sobre a nossa existência;*

*Aos que são demasiadamente humanos;*

*E aos que encerram a bravura de ser, deslavadamente, aquilo o que são,  
dedico.*

*O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:  
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois  
desinquieta.*

*O que ela quer da gente é coragem.*

João Guimarães Rosa, 1958,  
em *Grande sertão: veredas*

## Agradecimentos

Na vida, sobretudo nas circunstâncias profissionais, do que mais se precisa é de alguém que acredite em nós. Agradeço à **Dra. Letícia Lotufo**, orientadora científica deste trabalho, pela confiança aqui depositada. Empós, absolutamente despojada de si própria, nem sucumbiu às provações; compreendeu este coração inquieto, estas noites insones e esta alma cigana, e nunca perdeu a fé. Obrigada pelo respeito. Nesta jornada inicial pela Academia e a pesquisa, tanto experimentei das decepções quanto dos instantes sublimes. Determinadas conjunturas parecem lançar atalhos que nos assentam no centro ou nos jogam para lados extremos, e ainda que o trato político zele pelos meios-termos, o essencial é saber onde encontrar o seu ponto particular de equilíbrio e não se trair jamais. Obrigada por me invadir com o seu entusiasmo por cometer, antes de tudo, ciência, por mediar as pazes com a minha vocação, por me trajar adequadamente para enfrentar este ofício e por me trazer, feliz, de volta pra casa.

Ao idealista de inabalável otimismo **Dr. Manoel Odorico de Moraes** que já me deu 10 anos de asilo no LOE e uma acolhida carinhosa desmedida. Obrigada por proporcionar a todos nós que trazemos também o coração para a bancada, a instrumentação, o financiamento e o incentivo incondicional para seguirmos pesquisando com tanta satisfação. Espero, hoje, estar me fazendo merecida da terceira *estrelinha*...

Ao **Dr. Norberto Peporine Lopes**, pela generosa oportunidade em conviver com a química de produtos naturais, a imensurável orientação científica oferecida a este trabalho e pelo estímulo no estudo dos produtos marinhos. Estendo a gratidão, pois, aos demais colegas do Laboratório de Química Orgânica da USP-RP, em especial, à **Renata Takeara**, por emendar meus tropeços químicos e pela ajuda indispensável durante a etapa de fracionamento deste estudo.

Ao queridíssimo **Dr. Edilberto Rocha Silveira**, pelo dedicado empenho na elucidação estrutural das moléculas aqui estudadas, pelas esmeradas tentativas em me fazer entender os tais espectros e por oferecer, indubitavelmente, o melhor *cappuccino-com-cream-cracker* da cidade!

Ao **Dr. Tito Lotufo**, pela identificação da espécie estudada nesse trabalho e pelo constante apoio no estudo das ascídias. Aproveito cá a oportunidade para anotar a minha admiração pela sensatez, equidade e inteireza com que dirige a sua atuação acadêmica.

Ao **Dr. Márcio Viana**, por emprestar sua bancada, seu tempo e seu pessoal para o cumprimento de algumas etapas deste trabalho. Estendo o agradecimento aos integrantes do Laboratório de Bioquímica de Proteínas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, Cléverson, Fabiano, Diego e, em especial, ao colega **Jefferson Oliveira**, pela desapegada e imprescindível ajuda.

À **Dra. Claudia Pessoa**, pelo empreendimento na pesquisa de produtos naturais e o apoio de todo dia.

À **Dra. Elisabete Moraes**, pelo suporte incondicional e absoluto da estrutura da Unidade de Farmacologia Clínica para a realização de algumas etapas deste trabalho, aos colegas Demétrius Fernandes e Ismênia Osório, pela agradável companhia, e pelos préstimos do Raimundinho.

À **Dra. Rosângela Epifânio**, pelo constante incentivo ao estudo dos produtos marinhos.

À amiga **Raquel Montenegro**, registro cá a admirável retidão, competência e seriedade com que conduz a sua postura profissional. Pelos afortunados como eu, agradeço, acima de tudo, a honra de merecer a sua confiança e a sua amizade.

À amiga **Marne Vasconcellos**, metódica, organizada e indispensável que só ela, agradeço o empenho em me manter na linha, dentro dos prazos, bem alimentada, e por perto, sempre.

À amiga **Isabelle Arthaud**, companheira dos vícios (lícitos!) das noites insones, das alongadas conversas existencialistas e da paixão por seriados americanos. Esta é a legítima prova de que o *poetinha* Vinícius bem tinha razão quando falou dos amigos: “a gente reconhece-os”.

Ao amigo **Diego Wilke**, o moço que recupera até as almas mais cínicas da descrença na humanidade e faz impraticável confeccionar aqui um agradecimento à sua altura. Nestes conformes, registro, pois, o meu profundo orgulho por termos marchado juntos, horas a passos lentos, mas sempre adiante, nessa jornada. Faço nota, ainda, à fortuna de poder conviver com a sua família, em especial, o seu pai e meu amigo **Rogério Wilke** (*in memoriam*), invariavelmente arrebatado pelas descobertas científicas...

Ao amigo **Elthon Ferreira**, o melhor coletor de *Eudistoma* de que se tem notícia, agradeço pela disponibilidade incondicional, pelo entusiasmo inspirador e pela desmesurada honra em receber tanta consideração quanto aos meus “ensinamentos” sobre a ciência, o samba e a vida.

Aos amigos **Ana Jérsia Araújo, Bruno Cavalcante, Danilo Damasceno, Delano Marinho e Felipe Rocha** pela mãozinha oferecida à execução dos experimentos, pela frutífera troca de idéias e pelas recorrentes quintas-feiras de cervejinha e caranguejo, porque ninguém é de ferro!

Aos demais membros do LOE, Adriana, Aline, Arinice, Bruno, Carla, Cecília, Daniel, Deisy, Evelyne, Gardênia, Hemerson, Hidemburgo, Igor, Ivana, Kézia, Kristiana, Márcio, Michel, Miller, Patrícia, Paula, Rafael, Vanessa, Venúcia, Washington e Zé Roberto, pela companhia e o entretenimento ao longo de tantas e tantas semanas (e fins de semanas!) de pesquisa. Em especial, agradeço à **Dra. Vanesca Frota** pelos empréstimos, esclarecimentos e toda a sua disponibilidade.

Ao apoio técnico indispensável de Erivanda, D. Rogéria, Luciana, Maria de Fátima, Paulo e Evanir. De modo especial, agradeço à **Silvana França** pelo imprescindível suporte de sempre.

Às secretárias Fábيا, Flávia, Maria Tereza, D. Graça e, especialmente, à **Aura Rhanes**, pela inesgotável paciência em lidar e prontamente solucionar todos os meus “descuidos”. Mais além, reconheço o empenho de singular dedicação e competência de **Adelânia Marinho** e **Sheyla Prado** em resolver as papeladas e burocracias do nosso dia-a-dia.

Às meninas do Laboratório de Ecotoxicologia, Janaína, Janisi, Jeamylye, Lívia, Marcela, Marcionília e, em especial à amiga **Josy Siebra**, por comprar junto a “briga” pelos microorganismos marinhos e pela confiança em se render às minhas orientações acadêmicas. Junto delas, faço jus ao rapaz, meu amigo **Lucas Buruaem**, sem meias-palavras, nem atalhos.

Ao restante da galera do “subsolo ao nível do mar”, faço honrosa menção aos membros do Laboratório de Ecologia Animal, do Laboratório de Efluentes e Qualidade de Água e ao **Buda**, em especial, o ser onipresente do Labomar que aparece, pra mim, sempre na hora certa.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Alana, Sr. Carlos, Chiquinho, Fernando, Haroldo, Íris e Sílvio, da Unidade de Farmacologia Clínica, D. Bia, Sr. Dantas e Sr. Francisco, e do Instituto de Ciências do Mar, Francisco, Jandeilson, Leonardo e Wagner por zelar pela nossa segurança e a estrutura da Universidade. Agradeço, ainda, ao Flávio e ao João Paulo, por me guardarem sempre as melhores vagas.

À amiga **Nívea Macedo**, pela prática e dedicada orientação cibernética sem a qual *meus blots* certamente não teriam dado certo. Principalmente, agradeço o apoio, as caronas e a melhor das companhias enquanto nos aventurávamos em resistir ao calorão de Ribeirão Preto.

À amiga **Ana Paula Moreira**, pela ajuda e incentivo durante os meus primeiros passos na microbiologia marinha e por todo apoio dispensado durante as estadas no Rio de Janeiro.

Ao amigo **Jerson Silva**, pela atenção, lealdade e carinho irrestritos.

Ao amigo **Moisés Marinho**, pelo generoso abrigo na Cidade Maravilhosa e por me confidenciar as suas verdadeiras maravilhas. Particularmente, apesar de tudo e independente de qualquer coisa, agradeço também pelo torto, mas franco, amor.

Ao amigo **Lula** (não, o outro!), “o homem da gravata florida”, que carrega um coração tão grande que lhe extravasa pelas pontas dos dedos. O homem que cuida do céu e do mar e cuidou também de mim nestes tempos tortuosos, por demasiado sensíveis, e solitários que cobram o findar de uma tese. O homem que me educou a despertar mais cedo e me ofereceu o dia. E, no fim do dia, minha grande dádiva e maior glória foi mesmo a de compartilhar-lhe tantos dias...

Ao amigo **Márcio Kley**, que tentou passar pela vida sem deixar rastro e, culpa minha, nem conseguiu. Contra qualquer estimativa, anti todas as probabilidades, continua gostando de mim sem renunciar o meu avesso, e me desvenda à minha força do meio das minhas fraquezas.

Aos amigos **George Sampaio**, **Gina Capistrano** e **Marco Pessoa**, que são, até hoje, sem disputa nem concorrência, a minha maior descoberta no campo da Biologia. Presentemente, sinto-me plena de orgulho dos cientistas que foram formados comigo, ainda que com uma pontinha de nostalgia do tempo em que apenas imaginávamos...

Aos amigos de toda a vida que, perto ou longe, cedo ou tarde, sol ou chuva, sempre chegam: Alexandre, Bernardo, Carol B., Carol M., Catarina, Igor, Marcelle, René, Rolando, Samuel, Sérgio e Sílvio.

À minha mãe, **Susana**, todos os dias olhando por mim...

Ao meu pai, **Paul**, agradeço, de saída, os bons genes da curiosidade investigativa e inclinação para as ciências. Agradeço-lhe, também, o respeito de assistir de longe o meu desenvolvimento pessoal e acadêmico sem me questionar as decisões nem perder o entusiasmo ou o orgulho.

À **Nágela**, a irmã que a vida trouxe à minha porta e fez dela parte imperativa de mim.

Às primas **Yáskara** e **Yamara** pela vida inteira de companheirismo e cumplicidade. Que sigamos assim, nós três, sempre, como tem que ser.

Aos primos **Yuri** e **Liz** e às meninas mais lindas do mundo, **Luana** e **Sophia**, que sempre me emprestam o seu quarto para eu dormir até tarde em São Paulo.

Às tias **Salésia** e **Simone** e demais familiares pelo apoio e incentivo.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos que se fizeram presentes durante a minha formação pessoal e acadêmica.

## **Apoio Financeiro**

Este trabalho contou com o imprescindível suporte financeiro das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará

Universidade de São Paulo

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa – FUNCAP

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP

Banco do Nordeste do Brasil - BNB

Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP

International Foundation for Science - IFS

Instituto Claude Bernard – InCb

# ÍNDICE

<i>Lista de Tabelas</i> .....	<i>xiv</i>
<i>Lista de Figuras</i> .....	<i>xv</i>
<i>Lista de Símbolos e Abreviaturas</i> .....	<i>xix</i>
<i>Resumo</i> .....	<i>xx</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>xxi</i>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1. Os Produtos Naturais .....	1
1.1. A Empreitada dos Produtos Naturais Marinhos .....	5
1.2. Etapas Envolvidas no Desenvolvimento de uma Droga Anticâncer a Partir de Organismos Marinhos .....	9
2. Ascídias: Considerações sobre Defesa Química e Importância Biomédica .....	12
2.1. Potencial Farmacológico das Ascídias Brasileiras .....	17
2.2. Resultados Preliminares dos Estudos com <i>Eudistoma vannamei</i> .....	22
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
1. Geral .....	26
2. Específicos .....	26
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
1. Materiais Utilizados .....	27
2. Metodologia Experimental .....	27
2.1. Coleta e Identificação do Material .....	27
2.2. Fracionamento Químico Bioguiado .....	28
2.2.1. Obtenção dos extratos brutos .....	28
2.2.2. Fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto (EHA) .....	28
2.2.3. Processamento da fase DCM .....	29
2.3. Avaliação da Atividade Citotóxica <i>in vitro</i> .....	32
2.3.1. Linhagens e modelos celulares .....	33
2.3.2. Ensaio do MTT .....	33
2.3.3. Ensaio de AlamarBlue® .....	35

2.4. Análise dos Efeitos sobre Células HL-60 .....	35
2.4.1. Estudos por citometria de fluxo .....	35
2.4.2. Análise morfológica – coloração diferencial por hematoxilina/eosina .....	39
2.4.3. Teste do cometa .....	40
2.4.4. Western blot .....	42
<b>RESULTADOS</b> .....	46
1. Fracionamento Bioguiado .....	46
2. Determinação Estrutural .....	51
3. Avaliação da Atividade Biológica .....	52
3.1. Estudo da Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	52
3.2. Efeitos sobre Células HL-60 .....	53
3.2.1. Curva concentração-efeito .....	53
3.2.2. Estudos por citometria de fluxo .....	53
3.2.3. Análise morfológica .....	71
3.2.4. Teste do cometa .....	75
3.2.5. Análises por western blot .....	76
<b>DISCUSSÃO</b> .....	82
<b>CONCLUSÕES</b> .....	98
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	99
<b>ANEXO I – Soluções e Kits</b> .....	118
<b>ANEXO II – Fracionamento Químico</b> .....	122
<b>ANEXO III – Determinação Estrutural</b> .....	126

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** p. 3 Categoria terapêutica das novas entidades derivadas de produtos naturais nos diferentes estágios do processo de desenvolvimento de medicamentos. Fonte: Base de dados Pharmaprojects (março, 2008). Adaptação por Harvey, 2008.
- Tabela 2** p. 8 Compostos derivados de fontes marinhas em fase de ensaio clínico. Fonte: Newman & Cragg, 2004; Fenical, 2006; Molinski *et al.*, 2009; Costa-Lotufo *et al.*, 2009.
- Tabela 3** p. 32 Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de MTT.
- Tabela 4** p. 47 Atividade citotóxica *in vitro* do extrato hidroalcoólico bruto de *Eudistoma vannamei* em 3 linhagens tumorais avaliadas pelo ensaio do MTT, 72 h. IC<sub>50</sub> e CI 95% (□g/mL) obtidas a partir da média e respectivos E.P.M. de 2 experimentos independentes em duplicata determinadas por regressão não-linear gerado no programa GraphPad Prism 5.0.
- Tabela 5** p. 47 Atividade citotóxica *in vitro* das partições do extrato hidroalcoólico bruto de *Eudistoma vannamei* em 3 linhagens tumorais avaliadas pelo ensaio do MTT, 72 h. IC<sub>50</sub> e CI 95% (□g/mL) obtidas a partir da média e respectivos E.P.M. de 2 experimentos independentes em duplicata determinadas por regressão não-linear gerado no programa GraphPad Prism 5.0.
- Tabela 6** p. 48 Atividade citotóxica *in vitro* do tratamento com 10□g/mL de cada fração obtida da partição DCM em 3 linhagens tumorais avaliadas pelo ensaio do MTT, 72 h. Inibição média da proliferação celular (%) e respectivos E.P.M. obtidas a partir da média de 2 experimentos independentes em duplicata calculadas no programa GraphPad Prism 5.0.
- Tabela 7** p. 49 Atividade citotóxica *in vitro* das frações 11 a 18 obtidas da partição DCM em 3 linhagens tumorais avaliadas pelo ensaio do MTT, 72 h. IC<sub>50</sub> e CI 95% (□g/mL) obtidas a partir da média e respectivos E.P.M. de 2 experimentos independentes em duplicata determinadas por regressão não-linear gerada no programa GraphPad Prism 5.0.
- Tabela 8** p. 50 Atividade citotóxica *in vitro* da sub-fração DCM 14.3 em 4 linhagens tumorais avaliadas pelo ensaio do MTT, 72 h. IC<sub>50</sub> e CI 95% (ng/mL) obtidas a partir da média e respectivos E.P.M. de pelo menos 2 experimentos independentes em duplicata determinadas por regressão não-linear gerada no programa GraphPad Prism 5.0.
- Tabela 9** p. 52 Atividade citotóxica de **I/II** e STP em diversas linhagens celulares e em PBMC avaliada por MTT ou AlamarBlue, 72h. IC<sub>50</sub> e CI 95% (ng/mL) obtidas a partir da média e respectivos E.P.M. de 2 experimentos em duplicata determinadas por regressão não-linear no programa GraphPad Prism 5.0.
- Tabela 10** p. 57 Efeito de **I/II** (40 e 80ng/mL) sobre a distribuição das fases do ciclo celular em células HL-60 tratadas por 3, 6, 12, 24, 48 e 72h medido por citometria de fluxo. Os valores apresentados correspondem às médias (E.P.M.) de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata. Os histogramas obtidos no programa Guava Express Plus foram quantificados pelo programa ModFit LT 3.2 e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \*p < 0,05.
- Tabela 11** p. 58 Efeito de STP (40, 100, 200 e 500ng/mL) sobre a distribuição das fases do ciclo celular em células HL-60 tratadas por 24, 48 e 72h medido por citometria de fluxo. Os valores apresentados correspondem às médias (E.P.M.) de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata. Os histogramas obtidos no programa Guava Express Plus foram quantificados pelo programa ModFit LT 3.2 e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \*p < 0,05.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** p. 2 Distribuição por origem de todas as entidades químicas identificadas no período de 01/1981 a 06/2006. “B” Biológico, geralmente uma proteína ou um peptídeo grande (>45 resíduos) isolado de um organismo ou linhagem celular ou produzido por meios biotecnológicos; “N” Produto natural em si; “ND” Derivado semi-sintético de produto natural; “S” Totalmente sintético, normalmente encontrado de modo randômico ou modificado a partir de um agente pré-existente; “S\*” Originado por síntese total, mas com o grupo farmacofórico de produto natural; “V” Vacina; “NM” Mínico funcional de um produto natural. Fonte: Newman & Cragg, 2007.
- Figura 2** p. 4 Distribuição por origem de todos os agentes anticâncer identificados no período de 1940 a 06/2006. “B” Biológico, geralmente uma proteína ou um peptídeo grande (>45 resíduos) isolado de um organismo ou linhagem celular ou produzido por meios biotecnológicos; “N” Produto natural em si; “ND” Derivado semi-sintético de produto natural; “S” Totalmente sintético, normalmente encontrado de modo randômico ou modificado a partir de um agente pré-existente; “S\*” Originado por síntese total, mas com o grupo farmacofórico de produto natural; “V” Vacina; “NM” Mínico funcional de um produto natural. Fonte: Newman & Cragg, 2007.
- Figura 3** p. 5 Espongouridina (A; R = H) e espongotimidina (A; R = Me) e os análogos sintéticos Ara-A (B) e Ara-C (C).
- Figura 4** p. 7 Produtos naturais de origem marinha isolados entre 1965 e 2006. Fonte: Costa-Lotufo *et al.*, 2009 (adaptada de Blunt *et al.*, 2007; 2008; 2009).
- Figura 5** p. 11 Etapas envolvidas no desenvolvimento de uma droga anti-câncer a partir de organismos marinhos. Adaptado de Wagner-Döbler *et al.*, 2002.
- Figura 6** p. 13 Estrutura química da geranil-hidroquinona.
- Figura 7** p. 15 Estrutura química de didemnina B (X = □-OH) e aplidina (X=O).
- Figura 8** p. 16 Estrutura química de trabectedina (ET-743).
- Figura 9** p. 19 Compostos isolados de *Didemnum granulatum*: granulatomida (A) e isogranulatomida (B).
- Figura 10** p. 19 Compostos isolados de *Cystodytes dellechiaiei*: sebastianina A (A) e sebastianina B (B).
- Figura 11** p. 20 Compostos isolados de *Clavelina oblonga*: (2*S*,3*R*)-2-aminododecan-3-ol (A) e 3,5-dibromo-4-(2-oxo-5-oxazolidinil) metoxifenil-2-oxazolidinona (B).
- Figura 12** p. 21 Compostos isolados de *Didemnum* sp.: tamandarina A (R = CH<sub>3</sub>) e tamandarina B (R = H).
- Figura 13** p. 21 Ésteres metílicos obtidos em mistura do extrato metanólico de *Didemnum psammatoles*.
- Figura 14** p. 23 Colônia da ascídia *Eudistoma vannamei* Millar, 1977 fotografada na praia da Taíba, município de São Gonçalo do Amarante, CE. Por Diego Wilke.

- Figura 15** Compostos obtidos do extrato bruto de *Eudistoma vannamei* (Takeara, 2006).  
p. 24
- Figura 16** Estrutura da dicetopiperazina isolada de *Eudistoma vannamei* (Jimenez, 2004).  
p. 25
- Figura 17** Mapa identificando os pontos de coleta do material a ser estudado ao longo da costa do estado do Ceará.  
p. 28
- Figura 18** Tipos de cometa e classificação por categoria de dano: 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%).  
p. 42
- Figura 19** Esquema do fracionamento bioguiado resolvido pelo extrato bruto de *Eudistoma vannamei*.  
p. 46
- Figura 20** Estruturas sugeridas para as duas moléculas em mistura da sub-fração DCM 14.3.1.3, 2-hidroxi-7-oxoestaurosporina (**I**. R1 = OH; R2 = H) e 3-hidroxi-7-oxoestaurosporina (**II**. R1 = H; R2 = OH). A sugestão foi baseada em análises de ESIMS ( $M^+ + 1 = 487$ ) e RNM 2D, particularmente por HSQC e HMBC (500/125 MHz, Pyr- $d_5$ ), e por comparação com dados da literatura.  
p. 51
- Figura 21** Curvas concentração-efeito de **I/II** (linha cheia) ou STP (linha descontínua) sobre células HL-60, avaliadas pelo ensaio do MTT em 24, 48 ou 72h (**A**). IC<sub>50</sub> e CI 95% (ng/mL) de **I/II** ou STP sobre células HL-60, avaliadas pelo ensaio do MTT em 24, 48 ou 72h (**B**). Curvas, IC<sub>50</sub> e CI 95% obtidas a partir da média e respectivos E.P.M. de 2 experimentos em duplicata determinadas por regressão não-linear no programa GraphPad Prism 5.0.  
p. 53
- Figura 22** Curva de crescimento das células HL-60 tratadas com 10, 20, 40 e 80ng/mL **I/II**. Viabilidade e número de células determinada por citometria de fluxo. Os valores apresentados correspondem às medias (E.P.M.) de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata. Os histogramas foram adquiridos e quantificados no programa Guava Express Plus e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (● viabilidade de células controle; ■ número de células controle; ○ viabilidade de células tratadas com **I/II**; □ número de células tratadas com **I/II**).  $p > 0,05$  (a - significativo em relação ao controle para viabilidade; b - significativo em relação ao controle para número de células).  
p. 54
- Figura 23** Curva de crescimento das células HL-60 tratadas com 40, 100, 200 e 500ng/mL STP. Viabilidade e número de células determinada por citometria de fluxo. Os valores apresentados correspondem às medias (E.P.M.) de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata. Os histogramas foram adquiridos e quantificados no programa Guava Express Plus e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (● viabilidade de células controle; ■ número de células controle; ○ viabilidade de células tratadas com STP; □ número de células tratadas com STP).  $p > 0,05$  (a - significativo em relação ao controle para viabilidade; b - significativo em relação ao controle para número de células).  
p. 55
- Figura 24** Distribuição das fases do ciclo celular como observado na análise por citometria de fluxo, destacando-se os picos de G0/G1 e G2/M, o platô em S e as células quantificadas em sub-G1 (> G1) e super-G2/M (> G2/M).  
p. 56
- Figura 25** Efeito de **I/II** (40 e 80ng/mL) sobre a distribuição das fases do ciclo celular em células HL-60 tratadas por 3, 6, 12, 24, 48 e 72h medido por citometria de fluxo. Os histogramas obtidos no programa Guava Express Plus foram modelados pelo programa Cyflogic 1.2.1. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento (**A**). Efeito tempo-dependente de **I/II** (40 e 80ng/mL) sobre as fases do ciclo celular em HL-60. Os histogramas foram quantificados pelo programa ModFit LT 3.2 e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \* $p > 0,05$   
p. 58

- Figura 26** p. 60 Efeito de **I/II** (40 e 80ng/mL) sobre a fragmentação internucleossomal de DNA em células HL-60 tratadas por 3, 6, 12, 24, 48 e 72h determinada por citometria de fluxo. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento (**A**). Efeito tempo-dependente de **I/II** (40 e 80ng/mL) sobre a fragmentação internucleossomal de DNA (**B**). Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata no programa Guava Express Plus e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \* $p > 0,05$ .
- Figura 27** p. 61 Avaliação do efeito de **I/II** (40ng/mL) sobre a distribuição das fases do ciclo celular em células HL-60 tratadas por 24h e reincubadas em meio livre da droga por mais 24 ou 48h e medido por citometria de fluxo. Os histogramas obtidos no programa Guava Express Plus foram modelados pelo programa Cyflogic 1.2.1. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento.
- Figura 28** p. 62 Avaliação do efeito de **I/II** (40ng/mL) em células HL-60 tratadas por 24h e reincubadas em meio livre da droga por mais 24 ou 48h e medido por citometria de fluxo. Os histogramas obtidos no programa Guava Express Plus foram quantificados pelo programa ModFit LT 3.2 e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 para a determinação das células na fase G2/M (**A**) e mostrando fragmentação internucleossomal (**C**). A contagem de células viáveis (**B**) e a determinação da viabilidade celular (**D**) foram obtidas no programa Guava Express Plus e analisadas por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. (\*: significância em relação ao respectivo controle; a: significância em relação ao tratamento contínuo por 24h;  $p > 0,05$ ).
- Figura 29** p. 63 Avaliação do efeito de **I/II** (40ng/mL) em células HL-60 tratadas continuamente por 24h ou por 3, 6 ou 12h e reincubadas em meio livre da droga por, respectivamente, 21, 18 ou 12h e medido por citometria de fluxo. Os histogramas obtidos no programa Guava Express Plus foram quantificados pelo programa ModFit LT 3.2 e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 para a determinação das células na fase G2/M (**A**) e mostrando fragmentação internucleossomal (**C**). A contagem de células viáveis (**B**) e a determinação da viabilidade celular (**D**) foram obtidas no programa Guava Express Plus e analisadas por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. (\*: significância em relação ao respectivo controle; a: significância em relação ao tratamento contínuo por 24h; b: significância em relação ao respectivo tempo de tratamento, anterior à incubação em meio livre da droga;  $p > 0,05$ ).
- Figura 30** p. 64 Efeito de **I/II** (40 e 80ng/mL) sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células HL-60 tratadas por 24, 48 e 72h, determinada por citometria de fluxo. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento (**A**). Efeito tempo-dependente de **I/II** (40 e 80ng/mL) sobre o potencial transmembrânico mitocondrial (**B**). Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata no programa Guava Express Plus e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \* $p > 0,05$ .
- Figura 31** p. 66 Efeito de STP (100, 200 e 500ng/mL) sobre a distribuição das fases do ciclo celular em células HL-60 tratadas por 24, 48 e 72h medido por citometria de fluxo. Os histogramas obtidos no programa Guava® Express Plus foram modelados pelo programa Cyflogic 1.2.1. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento (**A**). Efeito tempo-dependente de STP (100, 200 e 500ng/mL) sobre as fases do ciclo celular em HL-60. Os histogramas foram quantificados pelo programa ModFit LT 3.2 e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \* $p > 0,05$ .
- Figura 32** p. 67 Diagrama de análise da distribuição das células quanto à marcação com os fluorocromos anexina-V e 7-AAD oferecido pelo programa Guava® Express Plus.

- Figura 33** p. 69 Efeito de **I/II** (40 e 80ng/mL) sobre a externalização da fostatidilserina na membrana de células HL-60 tratadas por 24, 48 e 72h determinado por citometria de fluxo. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento (**A**). Porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia e em necrose para os tratamentos controle ou **I/II** (40 e 80ng/mL) por 24, 48 e 72h (**B**). Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata no programa Guava Expres Plus e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \* $p < 0,05$ .
- Figura 34** p. 70 Efeito de STP (100 e 200ng/mL) sobre a externalização da fostatidilserina na membrana de células HL-60 tratadas por 24, 48 e 72h determinado por citometria de fluxo. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento (**A**). Porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia e em necrose para os tratamentos controle ou STP (100 e 200ng/mL) por 24, 48 e 72h (**B**). Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata no programa Guava Expres Plus e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \* $p < 0,05$ .
- Figura 35 A** p. 72 Microfotografias de células HL-60 controle ou tratadas com **I/II** (40 ou 80ng/mL) durante 3 e 6h e coradas com hematoxilina e eosina. As células foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico sob aumento de 400X. Ilustração de um campo representativo de cada tratamento (**A**).
- Figura 35 B** p. 73 Microfotografias de células HL-60 controle ou tratadas com **I/II** (40 ou 80ng/mL) durante 12 e 24h e coradas com hematoxilina e eosina. As células foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico sob aumento de 400X. Ilustração de um campo representativo de cada tratamento (**B**).
- Figura 35 C** p. 74 Microfotografias de células HL-60 controle ou tratadas com **I/II** (40 ou 80ng/mL) durante 48 e 72h e coradas com hematoxilina e eosina. As células foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico sob aumento de 400X. Ilustração de um campo representativo de cada tratamento (**C**).
- Figura 36** p. 75 Efeito de **I/II** (40 e 80ng/mL) sobre a indução de quebras de DNA de fita-dupla em células HL-60 tratadas por 24 (**A**), 48 (**B**) ou 72h (**C**), avaliado pelo teste do cometa neutro. Determinação do índice de dano em DNA de fita-dupla induzido por **I/II** (40 e 80ng/mL); (**D**). 100 eventos foram analisados em cada amostra ao quais se atribuiu escores de acordo com o nível de dano observado. Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  E.P.M. de 2 experimentos realizados em triplicatas e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \* $p < 0,05$ .
- Figura 37** p. 77 Expressão de Cdc2 (Cdk 1), Cdk 2, ciclina A (Cyc A) e ciclina B1 (Cyc B1) em células HL-60 controle e tratadas com 40 ou 80ng/mL **I/II** durante 24, 48 ou 72h avaliada por western blot.
- Figura 38** p. 79 Expressão de p-ATM (Ser1981), p-Chk 1 (Ser296), p-H2A.X (Ser139), p-BRCA1 (Ser1524), p53 e p-Cdc25c (Ser216) em células HL-60 controle e tratadas com 40 ou 80ng/mL **I/II** durante 24, 48 ou 72h avaliada por western blot.
- Figura 39** p. 80 Expressão das pro-caspases e caspases 3 (Asp175), 7 (Asp198) e 9 (Asp330) em células HL-60 controle e tratadas com 40 ou 80ng/mL **I/II** durante 24, 48 ou 72h avaliada por western blot.
- Figura 40** p. 81 Expressão e clivagem de PARP (Asp214) em células HL-60 controle e tratadas com 40 ou 80ng/mL **I/II** durante 24, 48 ou 72h e avaliadas por western blot. (N.T.: não testado).

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>7-AAD</b>	7-aminoactinomicina D
<b>AcOEt</b>	Acetato de etila
<b>ATM</b>	<i>Ataxia Telangectasia Mutated</i>
<b>ATR</b>	<i>Ataxia Telangectasia Mutated and Rad3-related</i>
<b>BRCA1</b>	<i>Breast Cancer Associated Gene 1</i>
<b>CCDC</b>	Cromatografia de camada delgada comparativa
<b>CCDP</b>	Cromatografia de camada delgada preparativa
<b>Cdc25</b>	<i>Cell Division Cycle 25</i>
<b>Cdk</b>	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
<b>Chk 1</b>	<i>Checkpoint Kinase 1</i>
<b>Chk 2</b>	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
<b>Cyc</b>	Ciclina
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DSB</b>	Quebras de dupla-fita (do inglês, <i>Double Strand Break</i> )
<b>EtOH</b>	Álcool etílico
<b>H/E</b>	Hematoxilina/Eosina
<b>HTS</b>	Rastreamento automatizado de alta demanda (do inglês, <i>High Throughput Screening</i> )
<b>MDR</b>	Resistência a múltiplas drogas (do inglês, <i>Multi-Drug Resistance</i> )
<b>MeOH</b>	Álcool metílico
<b>n-BuOH</b>	n-Butanol
<b>NCE</b>	Novas entidades químicas (do inglês, <i>New Chemical Entities</i> )
<b>PARP</b>	Poli ADP-Ribose Polimerase
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>PI</b>	Iodeto de propídeo
<b>PKC</b>	Proteína-quinase C
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>REB</b>	Rebecamicina
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de carbonos
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de prótons
<b>STP</b>	Estaurosporina
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Potencial transmembrana mitocondrial

## **Estaurosporinas de *Eudistoma vannamei*: Química e Bioatividade.**

Tese de Doutorado. Autor: Paula Christine Jimenez. Orientador: Letícia Veras Costa Lotufo. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. 15 de julho de 2009.

### **Resumo:**

*Eudistoma vannamei* (Millar, 1977) é uma ascídia endêmica do litoral do Nordeste brasileiro, largamente encontrado nas praias rochosas do estado do Ceará. Previamente, o extrato bruto apresentou um interessante perfil em termos de bioatividade. O fracionamento bioguiado identificou uma mistura 1:1 altamente citotóxica, contendo dois derivados inéditos de estaurosporina, 2-hidroxi-7-oxoestaurosporina (**I**) e 3-hidroxi-7-oxoestaurosporina (**II**). IC<sub>50</sub> para **I/II** e estaurosporina (STP) foram obtidas após 72h de incubação com diversas linhagens de células tumorais, utilizando-se o ensaio do MTT, e em linfócitos humanos normais, através do ensaio de AlamarBlue. **I/II** superou a citotoxicidade de STP em 7 vezes, em média, para as células tumorais, ao passo que mostrou-se tão ativa quanto frente às células normais. Uma análise cinética sobre a progressão de ciclo celular, ativação de resposta a dano e vias de reparo de DNA, e indução de apoptose de células HL-60 (leucemia) foi conduzida com 40 ou 80ng/mL **I/II** e acessada por citometria de fluxo e western blotting. Estudos de ciclo celular indicaram que **I/II** (40ng/mL) induz bloqueio de ciclo celular em G2/M e que este efeito prossegue irreversível mediante a remoção do estímulo. STP (200ng/mL) induziu o bloqueio quase que completo em G2/M após 24h de incubação, enquanto períodos mais longos de incubação provocam um aumento substancial de células poliplóides. A expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular (Cdk1, Cdk2, ciclina A e ciclina B1), associada à observação morfológica de células tratadas com 40ng/mL **I/II** e coradas com H/E em lâminas de vidro sugere que o bloqueio está ocorrendo, de fato, na fase G2. O bloqueio em G2 foi parcialmente observado em células tratadas com 80ng/mL **I/II**, conquanto características apoptóticas fizeram-se deveras evidentes. A avaliação de dano à fita dupla de DNA através do teste do cometa neutro indica a indução apenas de baixo nível de dano de DNA em células tratadas com 40ng/mL **I/II** por 24, 48 ou 72h. Entretanto, células tratadas com 80ng/mL **I/II** exibiram níveis mais elevados de dano. A expressão de proteínas relacionadas a dano de DNA (ATM e H2A.X) deu-se numa forma tempo- e concentração-dependente, enquanto o bloqueio de ciclo e os marcadores de reparo (Chk1, Cdc25C, BRCA1) foram ativados, predominantemente, em células tratadas com 40ng/mL **I/II**. Inversamente, a externalização de PS e a ativação das caspases efetoras 3 e 7 e de PARP mostraram-se altamente expressos em células tratadas com 80ng/mL **I/II** mostrou um claro efeito citostático em células HL-60 na menor concentração testada, evidenciado pelo persistente bloqueio de ciclo celular e baixo dano em DNA; e um objetivo efeito citotóxico na concentração maior, motivado pelo extensivo dano em DNA e indução de apoptose.

## **Staurosporines from *Eudistoma vannamei*: Chemistry and Bioactivity.**

Doctorate Thesis. Author: Paula Christine Jimenez. Advisor: Leticia Veras Costa Lotufo. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. July 15<sup>th</sup>, 2009.

### **Abstract:**

*Eudistoma vannamei* Millar, 1977 is an endemic tunicate from the northeastern Brazilian coast, widely distributed over the rocky beaches of Ceará State. Previously, the crude extract showed an interesting bioactivity profile. Bioassay-guided fractionation yielded a highly cytotoxic 1:1 mixture identified as two novel staurosporine derivatives, 2-hydroxy-7-oxostaurosporine (**I**) and 3-hydroxy-7-oxostaurosporine (**II**). IC<sub>50</sub> for **I/II** and staurosporine (STP) were obtained after 72h incubation with various tumor cell lines using the MTT assay and in normal human lymphocytes, by the AlamarBlue assay, where **I/II** outperformed STP in a 7-fold average. On normal cells, **I/II** showed to be equally effective as STP and, thus, showed a 25-fold average selectivity towards tumor cells. A kinetic analysis on cell cycle progression, activation of DNA damage and repair pathways and apoptosis induction of HL-60 cells (leukemia), was carried out with 40 or 80ng/mL **I/II** and accessed by flow cytometry and western blotting. Cell cycle studies indicated that **I/II** induces a G2-M arrest (at 40ng/mL, 45, 63 and 94% of arrested cells after 24, 48 and 72h treatment, respectively, against 9, 10 and 13% for the non-treated culture). Moreover, 24h-G2/M arrest is sustained and irreversible following removal of stimuli. STP induces 83% G2/M arrest at 200ng/mL after 24h incubation, whilst longer incubation periods provoke a substantial increase in polyploidy. Expression-rate of cell cycle related proteins (Cdk1, Cdk2, cyclin A and cyclin B1) paired with morphological observation of 40ng/mL **I/II**-treated H/E-stained cells placed on glass slides suggest that arrest is actually occurring at the G2 phase. G2 arrest is merely seen in 80ng/mL **I/II**-treated cells, while apoptotic features were quite evident. Double-strand breaks evaluated by the neutral comet assay indicates only low scored DNA damage against 24, 48 or 72h 40ng/mL **I/II** treated cells. However, 80ng/mL **I/II**-treated cells exhibited higher scored damage. DNA damage proteins (ATM and H2A.X) were expressed in a time- and concentration-dependent manner; while, cycle arrest and repair markers (Chk1, Cdc25C, BRCA1) were activated mostly on 40ng/mL **I/II**-treated cells. Conversely, PS externalization and activation of effector caspases 3 and 7 and PARP were highly blotted mostly for 80ng/mL **I/II**-treated cells. **I/II** induced a clear cytostatic effect on HL-60 cells at the lower concentration, distinguished by persistent cell cycle arrest and low DNA damage; and an objective cytotoxic effect at the higher concentration, motivated by extensive DNA damage and induction of apoptosis.

**ESTAUROSPORINAS DE *Eudistoma vannamei*:**

**QUÍMICA E BIOATIVIDADE**

## INTRODUÇÃO

### 1. Os Produtos Naturais

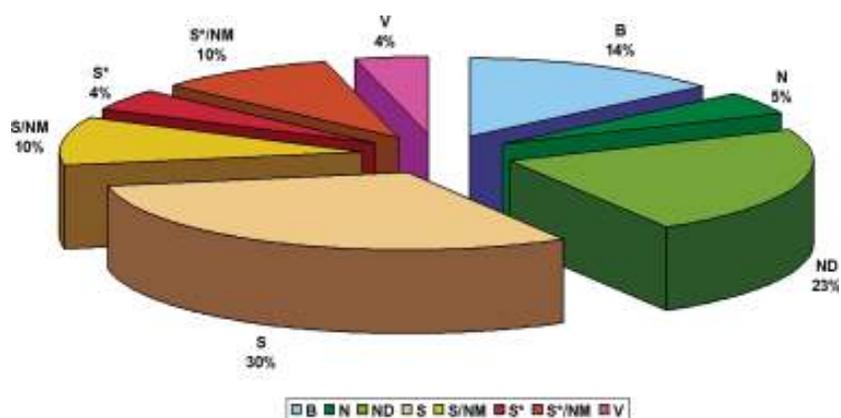
O reconhecimento da natureza como fonte de compostos com funções biológicas e a utilização destes como medicamentos data desde as civilizações mais antigas, donde foram arriscadas as ferramentas para as primeiras intervenções farmacêuticas. O registro mais antigo data provavelmente de 2697 a.C., na China, durante a dinastia do imperador Huang Di, em que prosperaram as artes, a filosofia e as ciências. O tratado terapêutico *Nei Ching* contém as bases teóricas e filosóficas de vários tratamentos em onde alicerçaram a medicina chinesa, como acupuntura, massoterapia e fitoterapia.

Os registros egípcios quanto ao uso de ervas medicinais datam de 1500 a.C., sendo o Papiro de Ebers o mais conhecido e citado destes documentos. Asclepius, um médico da Grécia antiga, contemporâneo de Ebers, também deixou de rastro os seus importantes apontamentos quanto ao uso de plantas na sua prática. Aliás, os gregos supriram a história de imprescindíveis subsídios de medicina tradicional, cujas obras mais relevantes são a História das Plantas, por Theophrastus, 300 a.C., e *De Materia Medica*, por Discorides, em aproximadamente 100 d.C. Neste elo, o boticário Galeno, que praticou e ensinou farmácia e medicina em Roma, cerca-200 d.C., era sabido por suas complexas formulações herbáceas e consentiu a dispersão da sua ciência pela Europa em quase 30 publicações. Nas Américas, quando os colonizadores chegaram vazios de treinamento ou informações terapêuticas, foram nas comunidades indígenas nativas onde resgataram valiosos ditames para a prática medicinal e registraram-nos produzindo diversos tratados de etnofarmacologia (revisado por Spainhour, 2005).

Não obstante, a exploração de substâncias derivadas de organismos vivos, *i.e.*, os produtos naturais, floresce até os dias atuais. A grande diversidade química distribuída em milhões de espécies não é meramente ocasional, e reflete o impacto da evolução na seleção e conservação de estratégias de sucesso para defesa contra predadores, competição por espaço e alimento ou resistência a condições extremas (Farnsworth *et al.*, 1985; Cragg *et al.*, 1997). Dotados desta bagagem, a prospecção de substâncias naturais de importância biomédica segue, porquanto, embolsando altas expectativas de medrar novos tratamentos.

Nestes conformes, os produtos naturais arrecadaram incontestável estima na história da farmacologia, abalizando um papel fundamental e mandatário na descoberta de novos medicamentos. Newman & Cragg (2007) analisaram os fármacos introduzidos na clínica entre 1981 e 2006 e encontraram um único composto (sorafenib, Nevaxar®) descoberto de uma biblioteca construída exclusivamente a partir de química combinatória. Este dado reforça o argumento quanto à privilegiada posição alocada pelos produtos naturais na busca por moléculas de valor biológico, cuja distinção estrutural parece promover um pareamento mais certo à aplicação farmacológica (Feher & Schmidt, 2003; Grabowski & Schneider, 2007; Harvey, 2008).

Não apenas entre os compostos que alcançaram a clínica, mas entre as novas entidades químicas (do inglês, *New Chemical Entities* - NCE) que deram entrada ao processo de desenvolvimento de medicamentos, os produtos naturais mantêm preeminência como estruturas líderes de fármacos, provendo, se não o esqueleto definitivo, mas o molde químico ou o grupamento farmacofórico. Inclusive, em revisão recente, as NCE dos últimos 25 anos foram distribuídas quanto à sua fonte, e os produtos naturais cumprem ou estão envolvidos em mais de 50% das ocorrências (figura 1, Newman & Cragg, 2007).



**Figura 1** – Distribuição por origem de todas as entidades químicas identificadas no período de 01/1981 a 06/2006. “B” Biológico, geralmente uma proteína ou um peptídeo grande (>45 resíduos) isolado de um organismo ou linhagem celular ou produzido por meios biotecnológicos; “N” Produto natural em si; “ND” Derivado semi-sintético de produto natural; “S” Totalmente sintético, normalmente encontrado de modo randômico ou modificado a partir de um agente pré-existente; “S\*” Originado por síntese total, mas com o grupo farmacofórico de produto natural; “V” Vacina; “NM” Mínico funcional de um produto natural. Fonte: Newman & Cragg, 2007.

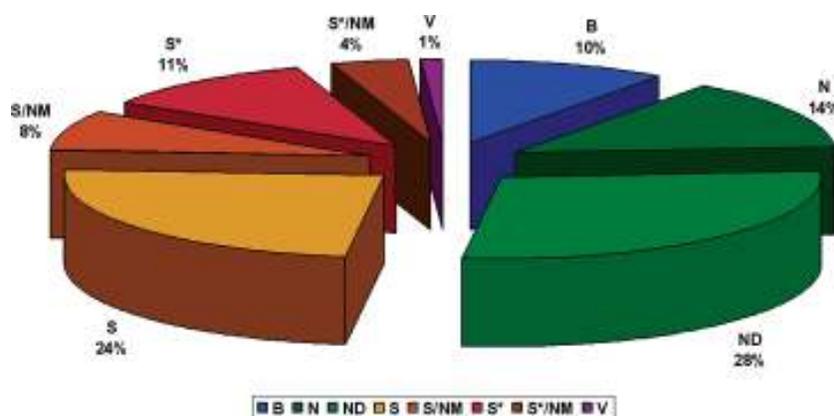
No que compete às classes medicamentosas amparadas pela pesquisa e desenvolvimento de medicamentos a partir de fontes naturais, a terapia anticâncer responde pela arrasadora maioria das entradas, seguida pelos anti-infecciosos. De fato, a superioridade dos produtos naturais com aplicação farmacológica arranja-se dentro da categoria dos metabólitos secundários, as moléculas que são produzidas por vias condicionais e ativadas em contextos ou situações particulares (Clardy & Walsh, 2004). Neste conjunto, a citotoxicidade lista entre as bioatividades de maior ocorrência entre os produtos naturais, particularmente em meio aos compostos derivados do metabolismo secundário, o que guarda uma íntima relação justamente com a aplicação na terapia anti-infecciosa e anticâncer. A tabela 1, adaptada da revisão de Harvey, 2008, elenca a categoria terapêutica em que estão incluídas as 225 NCE de origem natural em desenvolvimento em março de 2008.

**Tabela 1:** Categoria terapêutica das novas entidades derivadas de produtos naturais nos diferentes estágios do processo de desenvolvimento de medicamentos.

<b>Uso terapêutico</b>	<b>Pré-clínico</b>	<b>Fase I</b>	<b>Fase II</b>	<b>Fase III</b>	<b>Pré-registro</b>	<b>Total</b>
<b>Anticâncer</b>	34	15	26	9	2	86
<b>Anti-infeccioso</b>	25	4	7	2	2	40
<b>Neurofármaco</b>	6	3	9	4	0	22
<b>Cardiovascular/Gastrintestinal</b>	9	0	5	6	0	20
<b>Inflamação</b>	6	2	9	1	0	18
<b>Metabólico</b>	7	3	6	1	0	17
<b>Tópico</b>	7	1	2	0	0	10
<b>Hormonal</b>	3	0	2	1	0	6
<b>Imunossupressor</b>	2	2	0	2	0	6
<b>Total</b>	99	30	66	26	4	225

Fonte: Base de dados Pharmaprojects (março, 2008). Adaptação por Harvey, 2008.

No caso particular da terapêutica do câncer, o gargalo dos produtos naturais é ainda maior, abarcando mais de 60% de todos os quimioterápicos introduzidos na clínica desde 1940 até 2006 (figura 2, Newman & Cragg, 2007). Se protótipos, derivados ou o composto original em si, dos 175 fármacos considerados, 113 destes têm, em alguma instância, a sua origem natural.



**Figura 2** – Distribuição por origem de todos os agentes anticâncer identificados no período de 1940 a 06/2006. “B” Biológico, geralmente uma proteína ou um peptídeo grande (>45 resíduos) isolado de um organismo ou linhagem celular ou produzido por meios biotecnológicos; “N” Produto natural em si; “ND” Derivado semi-sintético de produto natural; “S” Totalmente sintético, normalmente encontrado de modo randômico ou modificado a partir de um agente pré-existente; “S\*” Originado por síntese total, mas com o grupo farmacofórico de produto natural; “V” Vacina; “NM” Mínico funcional de um produto natural. Fonte: Newman & Cragg, 2007.

Neste contexto, é adequado sagrar que foram os tradicionais grupos de plantas e microorganismos terrestres que forneceram quase a totalidade das moléculas que estão computadas nas estatísticas atuais. Contudo, vale destacar, pareados às clássicas fontes terrestres, o surgimento do interesse e o grande mérito dos produtos naturais de origem marinha na história recente da farmacologia.

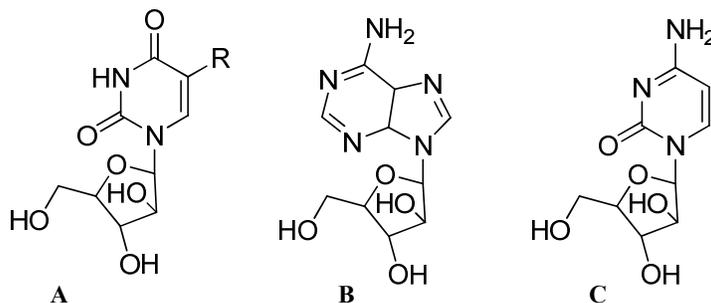
A rigor, de todas as fontes naturais de fármacos, o ambiente marinho demarca, certamente, a última grande fronteira. Mares e oceanos cobrem mais de 2/3 da superfície terrestre e abrigam representantes de quase todos os grupos de organismos vivos, sendo, inclusive, alguns filis estritamente marinhos. Há até poucas décadas, este ecossistema evadiu-se de diligência dos cientistas de produtos naturais, principalmente, devido ao difícil acesso às suas profundidades. Com o avanço das técnicas e o advento dos equipamentos seguros de mergulho, tais como o *aqualung*<sup>1</sup>, por volta da década de 50 e, mais francamente, na década de 70, os produtos marinhos deram início às suas histórias nos laboratórios de pesquisa biomédica (Fenical, 2006).

<sup>1</sup> *Aqualung* é um equipamento para mergulho autônomo tipo SCUBA (dispositivo para respiração subaquática autocontido - do inglês, *Self Contained Underwater Breathing Apparatus*) que consiste de um cilindro de ar comprimido e um regulador e supre a necessidade de gás respirável à pressão ambiente. Foi criado por Jacques Yves Cousteau e disponibilizado comercialmente em 1946.

### 1.1. A Empreitada dos Produtos Naturais Marinhos

Em agosto de 1967, sob o abrigo da Universidade de Rhode Island, EUA, foi realizado um restrito e inusitado simpósio que carregava a corajosa alcunha de “Drugs from the Sea” (da tradução para o português, diz-se *drogas*, ou melhor, *fármacos do mar*). Foi nesta pequena reunião que a promessa de um medicamento originado de fontes marinhas foi bradada pela vez primeira, e teve seus 23 trabalhos compilados no ano seguinte, nos anais editado e prefaciado por Hugo D. Freudenthal, que percebeu “um grande futuro à vista!” (Molinski *et al.*, 2009).

Os trabalhos do pesquisador Werner Bergmann (Bergmann & Feeney, 1951; 1955; Bergmann & Burke, 1956; Bergmann & Stempien Jr, 1957), da Universidade de Yale, durante os anos 50, resultaram no isolamento dos arabinonucleosídeos espongotimidina e espongouridina da esponja caribenha *Cryptotethya crypta* (Tethyidae) e deixaram a impressão de que a chegada de um fármaco marinho até a clínica não tardaria (Munro *et al.*, 1999; Schwartzmann *et al.*, 2001; Newman & Cragg, 2004). De fato, esses nucleosídeos serviram de protótipo para o desenvolvimento de uma nova classe de análogos – arabinosil adenina (Ara-A, vidarabina) e arabinosil citosina (Ara-C, citarabina; figura 3) - cujos mecanismos de ação baseiam-se na conversão do respectivo arabinonucleosídeo trifosfatado e sua subsequente incorporação ao DNA, inibindo o trabalho da DNA-polimerase (Köning & Wright, 1996; Schwartzmann *et al.*, 2001). Ara-A e Ara-C já são comercializados há mais de duas décadas e são utilizados na clínica como antiviral e anticâncer, respectivamente. Ainda que estes compostos sejam análogos sintéticos e não o produto natural em si, esses fármacos são historicamente relatados como os primeiros exemplos de produtos marinhos comercialmente disponíveis.



**Figura 3** – Espongouridina (A; R = H) e espongotimidina (A; R = Me) e os análogos sintéticos Ara-A (B) e Ara-C (C).

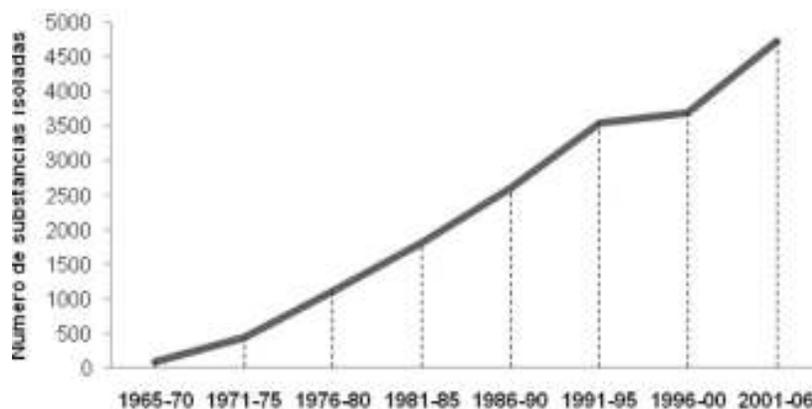
Todavia, o primeiro fármaco legitimamente marinho ainda ansiava mais algumas décadas para nascer. Contando do seu deslanche, no início dos anos 70, o estudo de produtos naturais marinhos atendeu com uma instigante revelação de moléculas peculiares, onde quase qualquer coisa que se encontrasse era tanto nova quanto alegórica. Nestes 20 anos iniciais, os pesquisadores foram apresentados a um ambiente de biossíntese totalmente distinto, de reações enzimáticas atípicas e grupos químicos jamais reconhecidos no ambiente terrestre, além de potentes atividades biológicas, consagrando, enfim, os organismos marinhos como detentores de um significativo potencial na prospecção de fármacos (Davidson, 1993; Fenical, 1997; Berlinck *et al.*, 2004; Jimeno *et al.*, 2004; Fenical, 2006; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

Para os 10 anos seguintes, a década de 90 trouxe calma. Nesta altura, as grandes indústrias farmacêuticas rumaram para a síntese e à química combinatória enquanto ferramenta para a descoberta de novas estruturas-líder para o desenvolvimento de medicamentos e, fecharam, literalmente, as portas dos produtos naturais, sobretudo dos produtos marinhos. Como argumento agravante, nenhum fármaco marinho ocupava ainda as prateleiras das farmácias, e os estudos escassearam neste campo, abundando, quase que exclusivamente, na pesquisa básica acadêmica (Fenical, 2006; Molinski *et al.*, 2009).

A entrada do século corrente, com os avanços tecnológicos em coletas de profundidade e aquicultura, trouxe à tona um grande número de novas moléculas marinhas (Schwartzman, 2000; Schwartzman *et al.*, 2001; Berlinck *et al.*, 2004). Os avanços na instrumentação para isolamento e caracterização química, os progressos nos métodos de *high-throughput screening* (ou rastreamentos de alto desempenho, pela tradução mais fiel) e a sofisticação dos bioensaios, que se mostram cada vez mais específicos e acurados, alavancaram sobremaneira o aporte de novos compostos marinhos à sua linha cronológica. E, ainda que não reavisem, diretamente, o interesse da indústria, esta, embora com certa cautela, voltou atrás dos produtos marinhos na forma de colaborações institucionais. É importante mencionar, que os anos 2000 receberam, ainda, o reforço de mais um importante grupo de profícuos produtores de moléculas atraentes: os microorganismos marinhos. Tal os microorganismos terrestres, agora são os microorganismos marinhos que estão sendo densamente explorados, contribuindo com uma larga parcela das moléculas marinhas identificadas neste período, e parecem

segurar a “carta da manga” da prospecção de fármacos no ambiente marinho (Newman & Cragg, 2007; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

A figura 4 resume o progresso no isolamento de produtos naturais marinhos durante o período de 1965 a 2006, destacando o crescimento exponencial durante as décadas iniciais, o platô tecida nos anos 90 e, com particular evidência, a progressão ainda mais íngreme a partir dos primeiros anos do século XXI.



**Figura 4** – Produtos naturais de origem marinha isolados entre 1965 e 2006. Fonte: Costa-Lotufo *et al.*, 2009 (adaptada de Blunt *et al.*, 2007; 2008; 2009).

Hoje, vem-se testemunhando o que pode configurar o renascimento do campo dos produtos naturais marinhos. As sementes plantadas há quase 50 anos começam a dar seus frutos e agora já se contam outros dois medicamentos em uso clínico, dessa vez, genuinamente marinhos - o analgésico neuropático (Prialto®), aprovado em 2004, e o anticâncer trabectedina (Yondelis®), aprovado em 2007 – e mais uma longa lista de promessas cumprindo as fases de testes clínicos, assim mostradas na tabela 2.

**Tabela 2:** Compostos derivados de fontes marinhas em fase de ensaio clínico.

<b>Composto</b>	<b>Espécie</b>	<b>Uso terapêutico</b>	<b>Status Clínico</b>
<b>Trabectedina</b> (ET-743, Yondelis®)	<i>Ecteinascidia turbinata</i> (ascíδια)	Anticâncer	Aprovado, 2007
<b>Ziconotídeo</b> (Prialt®)	<i>Conus magnus</i> (molusco)	Analgésico neuropático	Aprovado, 2004
<b>Briostatina 1</b>	<i>Bugula neritina</i> (briozoário)	Anticâncer	Fase II
<b>Aplidina</b>	<i>Aplidium albicans</i> (ascíδια)	Anticâncer	Fase II
<b>KRN7000</b>	<i>Agelas mauritanus</i> (esponja; derivado sintético das agelasfinas)	Anticâncer	Fase II
<b>Espisulosina</b> (ES-285)	<i>Spisula polynyma</i> (molusco)	Anticâncer	Fase I
<b>Discodermolido</b>	<i>Discodermia dissoluta</i> (esponja)	Anticâncer	Fase I
<b>Soblidotina</b> (TZT-1027)	<i>Dolabella auricularia</i> (molusco; derivado sintético da dolastatina 10)	Anticâncer	Fase II
<b>Sintatodina</b> (ILX-651)	<i>Dolabella auricularia</i> (molusco; derivado sintético da dolastatina 10)	Anticâncer	Fase II
<b>Cematodina</b> (LU-103793)	<i>Dolabella auricularia</i> (molusco; derivado sintético da dolastatina 10)	Anticâncer	Fase II
<b>Kahalalido F</b>	<i>Elysia rufescens</i> (molusco)	Anticâncer	Fase II
<b>Irvalec®</b>	<i>Elysia rufescens</i> (molusco; derivado sintético)	Anticâncer	Fase I
<b>Zalypsis®</b>	<i>Jorunna funebris</i> (molusco) e <i>Pseudomonas fluorescens</i> (bactéria; derivado sintético)	Anticâncer	Fase I
<b>Æ-941</b> (Neovastat®)	<i>Squalus acanthias</i> (tubarão)	Anticâncer	Fase III
<b>Esqualamina</b>	<i>Squalus acanthias</i> (tubarão)	Anticâncer	Fase II
<b>Salinosporamida A</b> (NPI-0052)	<i>Salinospora tropica</i> (actinomiceto marinho)	Anticâncer	Fase I
<b>NPI-2358</b>	<i>Aspergillus</i> sp. (fungo marinho; análogo sintético da halimida)	Anticâncer	Fase I
<b>CGX-1160</b>	<i>Conus geographus</i> (molusco)	Analgésico	Fase I
<b>ACV1</b>	<i>Conus victoriae</i> (molusco)	Analgésico	Fase I
<b>GST-21</b> (DMBX)	(nematelminto)	Mal de Alzheimer	Fase I
<b>ILP-576092</b>	<i>Petrosia contignata</i> (esponja; derivado sintético do contignasterol)	Antiasmático	Fase II

Fonte: Newman & Cragg, 2004; Fenical, 2006; Molinski *et al.*, 2009; Costa-Lotufo *et al.*, 2009.

Com relação ao tratamento do câncer os estudos encontram-se bastante adiantados. Tal ressaltado na tabela 2, as moléculas em desenvolvimento para a terapia anticâncer respondem pela maior parte da listagem. Costumeiramente, essas moléculas são descobertas a partir de *screenings* para atividade citotóxica, e, não raro, apresentam-se altamente potentes. Esta faceta reforça a hipótese da função protetora destas substâncias e pode estar associada ao fato de que estes agentes devem sobrepujar a extraordinária capacidade diluente da água do mar para alcançar seu alvo e surtir efeito (Newman & Cragg, 2004; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

Além do mais, foi para o setor dos novos alvos terapêuticos que a prospecção de produtos marinhos anticâncer trouxe a sua substancial contribuição, esclarecendo uns e inaugurando outros. Inclusive, a potente citotoxicidade das moléculas marinhas parece ter relação com a especificidade por distintos e inusitados alvos, onde se reconhece, contando apenas dentre os protótipos em fases de ensaios clínicos, quinases, metaloproteinases, receptores de membrana celular, microtúbulos, lisossomos, proteossomos, angiogênese e até modulação da resposta imune como meio de ação antitumoral (Newman & Cragg, 2004; 2006; Molisnki *et al.*, 2009).

## **1.2. Etapas Envolvidas no Desenvolvimento de uma Droga Anticâncer a Partir de Organismos Marinhos**

O câncer posa entre os problemas de maior relevância na saúde pública mundial, sendo que nos países mais desenvolvidos da Europa, nos Estados Unidos e no Japão esta já é a principal causa de mortalidade por doenças. Por mais que já se tenha um considerável arsenal de quimioterápicos e obtido sucesso em vários esquemas de tratamento, acredita-se que cerca de 50% dos pacientes ainda não respondem à quimioterapia ou se deparam com uma recidiva da doença (revisado por Wagner-Döbler *et al.*, 2002; Fenical, 2006). Assim, a busca por compostos mais seletivos, com menos efeitos colaterais, maior potência terapêutica e menor índice de resistência para o tratamento do câncer continua sendo de grande valor.

O ambiente marinho, como nova e sub-explorada fonte para a busca de novos fármacos, particularmente promissora no caso da terapia anticâncer, recebe reconhecida atenção por parte do NCI (*National Cancer Institute* – Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos), que, há cerca de 30 anos, vem apoiando e financiando o alargamento

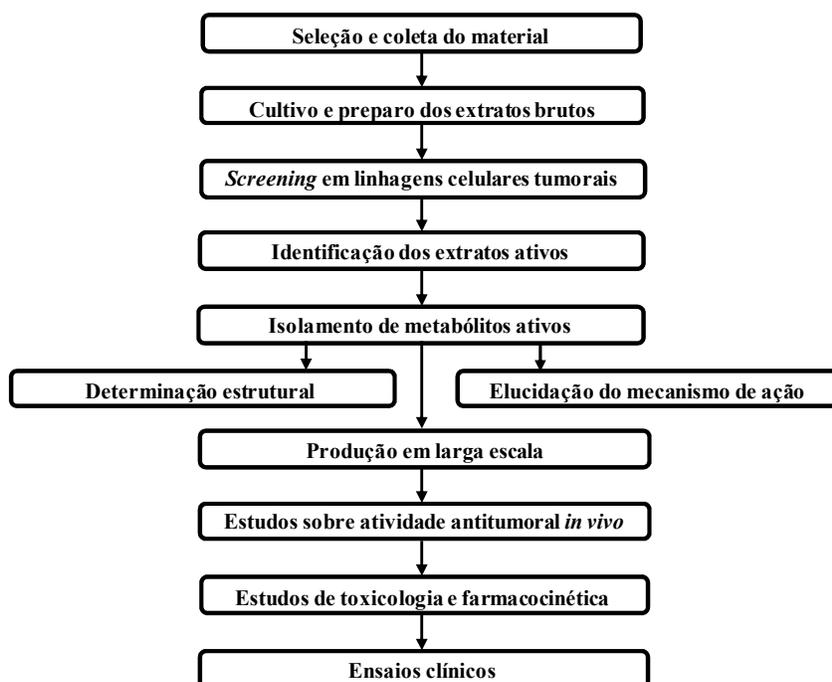
deste campo de pesquisa. As primeiras evidências de que este havia sido um bom investimento veio pelo final dos anos 80 quando, do isolamento de 500 moléculas estruturalmente diversificadas e a comprovação de que possuíam efeito antiproliferativo sobre células tumorais em concentrações sub-micromolares, constatou-se de que o ambiente marinho guardava o maior potencial para a descoberta de moléculas citotóxicas. Estas moléculas originaram, principalmente, de esponjas, ascídias, briozoários e moluscos, classes de invertebrados que, hoje, são reconhecidos como os mais promissores na prospecção de fármacos (Newman & Cragg, 2004; 2006; Fenical, 2006). Contudo, calcula-se que menos de 3% do total estimado de espécies marinhas tenham sido devidamente estudadas (Blunt *et al.*, 2008).

A história dos produtos naturais marinhos passou mais tempo sobre as bancadas de laboratório que necessariamente pela indústria farmacêutica. Não bastasse ter engrenado exatamente quando a indústria perdeu o interesse pelos produtos naturais, o desenvolvimento de medicamentos a partir de fontes marinhas ainda irrompia, e agravados, os principais entraves da prospecção de fármacos naturais de um modo geral: a questão do suprimento e a questão da toxicidade adversa. O processo de desenvolvimento de um medicamento anticâncer, além de demorado, é custoso, mas as estatísticas e os lucros são incrivelmente favoráveis (Hunt & Vincent, 2006). Nessa prerrogativa, a indústria retornou aos produtos naturais, inclusive aos marinhos, todavia com mais prudência, investindo mais em moléculas já em avançados estágios da investigação pré-clínica e menos na bioprospecção em si.

Várias etapas estão envolvidas no desenvolvimento de um novo medicamento anticâncer a partir de uma fonte marinha e a figura 5 esquematiza resumidamente esta jornada. A escolha da espécie a ser investigada é elemento chave no processo e a seleção dos alvos biológicos vai determinar o sucesso do *screening*. Os testes *in vitro*, atualmente, favorecem ensaios avaliando a capacidade antiproliferativa das amostras em diversas linhagens celulares tumorais. Os testes que avaliam mecanismos de ação são bastante acurados e analisam o efeito em alvos celulares mais específicos e pontuais – proteínas funcionais ou estruturais, ativação ou transcrição de genes, sistemas enzimáticos, metabolismo celular (Wagner-Döbler *et al.*, 2002).

A sofisticação dos métodos químicos disponíveis atualmente foi determinante para a ancoragem da pesquisa de produtos marinhos e veio a complementar muito bem a etapa biológica do processo. De um modo geral, a abundância do princípio ativo

encontrado no animal é ínfima, não sendo incomum se obter rendimentos baixíssimos nos processos de purificação. Vale enfatizar que as técnicas de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* – cromatografia líquida de alta eficiência), mandatórias nos procedimentos modernos de isolamento, só surgiram a partir da década de 70, e a quantidade de material requerida para se iniciar o esquema de purificação era deveras elevada (Newman & Cragg, 2004). Ainda que um *screening* químico inicial possa bem se aproveitar de técnicas clássicas como a cromatografia de camada delgada para a caracterização das amostras, são combinações de HPLC, ressonância nuclear magnética e espectrometria de massa que permitem a detecção de compostos minoritários e precisão na determinação estrutural.



**Figura 5** – Etapas envolvidas no desenvolvimento de uma droga anti-câncer a partir de organismos marinhos. Adaptado de Wagner-Döbler *et al.*, 2002.

Os testes *in vivo* são conduzidos com os compostos selecionados nas etapas iniciais de *screening* para avaliar seu efeito antitumoral em animais de laboratório portadores de tumor. São propostos diversos esquemas de tratamento, alguns em combinação com outras drogas, particularmente aquelas já utilizadas na clínica. Os

estudos pré-clínicos sobre toxicologia e farmacocinética do composto são essenciais para se conhecer os seus padrões metabólicos e parâmetros fisiológicos assim como a dose tolerada e os efeitos adversos. Essas medidas são fundamentais para a interpretação dos possíveis efeitos em humanos, antes de prosseguir para a etapa dos ensaios clínicos (revisado por Wagner-Döbler *et al.*, 2002; Newman & Cragg, 2004).

## 2. Ascídias: Considerações sobre Defesa Química e Importância Biomédica

As ascídias são organismos dominantes em muitas comunidades marinhas. De acordo com alguns autores, elevados níveis de vanádio e o baixo pH da túnica<sup>2</sup> constituiriam uma barreira primária contra a predação ou epibiontes, uma vez que a túnica libera ácido sulfúrico ao ser lesada e o vanádio, a não ser em concentrações residuais, é um veneno metabólico para um grande número de organismos (Stoecker, 1980). No entanto, o ácido sulfúrico é rapidamente neutralizado na água do mar e a hipótese de que o acúmulo de vanádio deteria a predação não é aplicável a todos os membros da classe: altas concentrações de vanádio são encontradas apenas nos organismos pertencentes à subordem<sup>3</sup> Phlebobranchia e em alguns Aplousobranchia; já nos Stolidobranchia o vanádio não é encontrado (Parry, 1984).

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

---

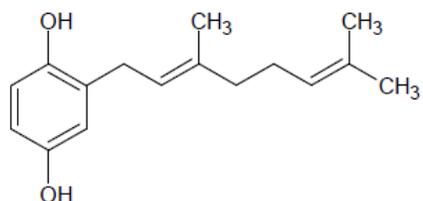
<sup>2</sup> A túnica é um tecido vivo que reveste completamente as ascídias e cujas principais funções são fixação ao substrato, sustentação e proteção. Sua matriz orgânica contém água, proteínas e polímeros de carboidratos chamados de tunicina (Rodrigues *et al.*, 1998; Rocha, 2002).

<sup>3</sup> As ascídias pertencem ao Subfilo Urochordata (ou Tunicata) que, juntamente aos Cephalochordata e Vertebrata, constituem o Filo Chordata. A Classe Ascidiacea representa o grupo mais numeroso dentre os cordados inferiores, com aproximadamente 90% do número total de espécies, que se encontram distribuídas em duas ordens, Enterogona e Pleurogona, e três subordens: Aplousobranchia, Phebobranchia e Stolidobranchia (Rodrigues *et al.*, 1998; Ruppert & Barnes, 1996; Monniot *et al.*, 1991).

antimicrobiana e antiviral, enquanto que estas atividades não foram significantes para os extratos de *E. capsulatum* (Stoecker, 1980).

Observações ecológicas deste tipo somado à ausência de defesa mecânica (com a exceção de algumas famílias que apresentam espículas calcárias) destes animais sésseis, de corpo mole e, por vezes, deveras colorido, sugerem que o sucesso evolutivo das ascídias seja também atribuído à capacidade de acumular ou sintetizar metabólitos secundários tóxicos. E, de fato, as ascídias listam entre os invertebrados marinhos mais estudados pelos grupos que trabalham com produtos naturais, sendo que compostos nitrogenados, em geral alcalóides, peptídeos e outros derivados de aminoácidos, respondem por 85% dos produtos do metabolismo secundário já isolados de ascídias; os 15% restantes são compostos provenientes da rota do acetato<sup>4</sup> e, em muito menor extensão, da rota do acetato-mevalonato<sup>5</sup> (Lindquist *et al.*, 1991; Monniot *et al.*, 1991; Davidson, 1993; Molinski, 1993; Ireland *et al.*, 1993; Watters & van den Brenk, 1993; Dietzmann, 1997).

A química de produtos naturais de ascídias teve início em meados da década de 70 quando Fenical e colaboradores isolaram, de uma espécie de *Aplidium* sp., a geranil-hidroquinona (figura 6), o primeiro composto obtido de uma ascídia. Esta substância apresentou atividade quimiopreventiva contra algumas formas tumorais em ensaios com animais (Fenical, 1974).



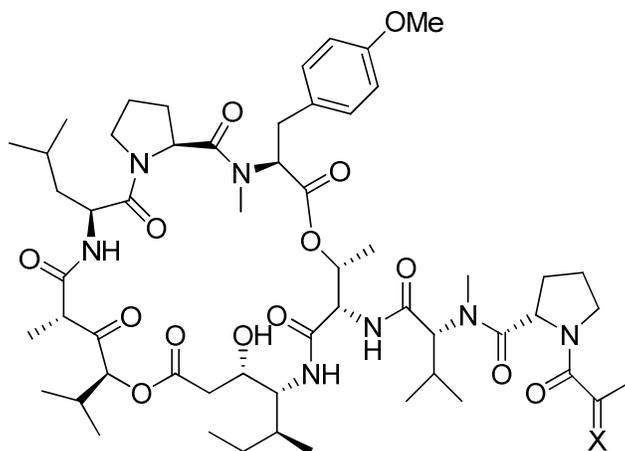
**Figura 6** – Estrutura química da geranil-hidroquinona.

<sup>4</sup> A rota do acetato é a via responsável pela formação dos policetídeos, uma ampla classe de compostos naturais reunida assim sobre bases meramente biossintéticas. Neste grupo estão incluídos os compostos provenientes da atuação de enzimas policetídeo-sintases (PKS) sobre subunidades acetil, tais como os ácidos graxos saturados e insaturados, poliacetilenos, prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, antibióticos macrolídeos e diversos compostos aromáticos resultados da ciclização das cadeias policetídeas, tais como antraquinonas e tetraciclinas (Dewick, 2002).

<sup>5</sup> A rota do mevalonato é a via biossintética responsável pela formação de terpenos, esteróides, cetonas e alguns hormônios, e por onde também são sintetizadas substâncias de importância farmacológica como estatinas e bisfosfonatos (Swanson & Hohl, 2006).

Em expedição realizada ao Caribe, em 1978, observou-se que extratos da ascidia *Trididemnum solidum* apresentaram potente atividade antineoplásica, citotóxica, imunomoduladora e antimicrobiana. A posterior investigação química desse extrato levou ao isolamento de uma série de depsipeptídeos cíclicos, denominados didemninas (Rinehart *et al.*, 1981, 1988; Li *et al.*, 1992; Sakai *et al.*, 1996), das quais a didemnina B pareceu ser a mais interessante (figura 7). Nos estudos *in vitro* e *in vivo*, a didemnina B demonstrou uma potente atividade citotóxica, surpreendendo com a IC<sub>50</sub> de 1nM, em média, e com uma substancial atividade antitumoral contra leucemias e melanomas (Rinehart *et al.*, 1981; Faulkner, 2000). O mecanismo de ação da didemnina B é complexo ainda está por ser completamente esclarecido. Sabe-se, pois, que atua inibindo a síntese protéica e seu potente efeito indutor de apoptose é dependente de tirosina quinase (Crampton *et al.*, 1984; Vera & Joullié, 2002). A didemnina B iniciou os ensaios clínicos em 1986, sendo tomada como o primeiro composto natural genuinamente marinho a entrar para testes clínicos (já que os nucleosídeos isolados de *Cryptothetia crypta* serviram unicamente como protótipos para a síntese de ara-A e ara-C). Variados esquemas de tratamento foram propostos e diversos tumores foram experimentados, mas a didemnina B mostrou ser simplesmente tóxica demais para avançar nos ensaios clínicos, que foram interrompidos na fase II, em meados da década de 90. Independentemente, a didemnina B deixou uma preciosa contribuição para a formação de químicos e farmacologistas básicos e clínicos da área de produtos naturais marinhos (Vera & Joullié, 2002).

Não tardou, a aplidina (figura 7), um depsipeptídeo cíclico análogo da didemnina B e obtida da ascídia mediterrânea *Aplidium albicans* surgiu trazendo resultados instigantes (Rinehart, 2000). Também sabida por deidrodidemnina B, a aplidina, que traz apenas poucas diferenças na sua cadeia lateral, demonstrou ser a mais ativa num estudo relacionando estrutura e atividade antiviral e citotóxica de uma série de 42 didemninas análogas naturais ou sintéticas, entre elas a didemnina B (Sakai *et al.*, 1996). Seu mecanismo de ação é bastante peculiar e envolve várias vias que levam à apoptose, com alta especificidade para células tumorais. Ainda que não seja inteiramente compreendido, sabe-se que seus efeitos implicam no bloqueio da divisão celular (devido à inibição da síntese de DNA e proteínas) e no enfraquecimento da angiogênese tumoral (pela diminuição da secreção de VEGF, da expressão do receptor VEGF-r1 e à inibição das enzimas ornitina-descarboxilase e palmitoil tioesterase; Urdiales *et al.*, 1996; Erba *et al.*, 2003; Brogini *et al.*, 2003).

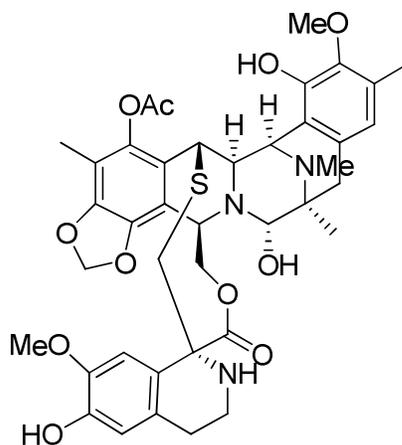


**Figura 7** – Estrutura química de didemnina B (X =  $\alpha$ -OH) e aplidina (X = O).

A aplidina, sob o registro de Aplidin®, ingressou nos testes clínicos em 1999, favorecendo-se, diretamente, dos dados gerados nos estudos com didemnina B. Convenientemente, a perda de apenas 2 átomos de hidrogênio da cadeia lateral transformou substancialmente o seu perfil toxicológico (Newman & Cragg, 2004, 2006), sendo a aplidina, de modo geral, bem tolerada. Reações tipicamente associadas à quimioterapia do câncer, como mucosite, alopecia e mielossupressão, são incomuns, e Aplidin® encontra-se em fases I e II de testes clínicos como monoterapia ou terapia combinada para uma variedade de tumores (Gomez *et al.*, 2003; [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov); [www.pharmamar.com](http://www.pharmamar.com)).

A atividade antitumoral de extratos da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinata* já é conhecida há cerca de 40 anos (Sigel *et al.*, 1969), sendo que o isolamento e a elucidação estrutural do princípio ativo provou ser extremamente difícil. ET-743, também sabida por trabectedina (figura 8), é uma da série de alcalóides isolados por Rinehart e colaboradores em 1990. Interessantemente, seu mecanismo de alquilação de DNA difere da grande maioria dos outros agentes alquilantes, pois se liga aos resíduos de guanina em seqüências específicas de bases nas fendas menores da dupla hélice, causando uma dobra nas fitas de DNA (Pomier *et al.*, 1996; Zewail-Foote & Hurley, 1999). Este dobramento tem diversas conseqüências celulares que são refletidas na desorganização do citoesqueleto, bloqueio da divisão celular e interferência no reconhecimento e ligação normal de fatores de transcrição ou proteínas ligantes ao DNA, causando ativação ou inibição de determinados genes (Erba *et al.*, 2001; Garcia-

Rocha *et al.*, 1996; Bonfanti *et al.*, 1999). A inibição da transcrição do gene MDR1 é um dos principais e mais relevantes efeitos deste composto, sendo este gene responsável pela produção de glicoproteína-P<sup>6</sup> (Jin *et al.*, 2000; Kankazi *et al.*, 2002). A via de reparo TC-NER<sup>7</sup> (*Transcription Coupled Nucleotide Excision Repair* – reparo por excisão de nucleotídeos acoplados à transcrição) também parece exercer um papel essencial na atividade antitumoral da trabectedina (Erba *et al.*, 2001). Foi demonstrado que células TC-NER deficientes são resistentes ao efeito de ET-743, e que apenas as proteínas produzidas pelas células TC-NER proficientes induzem quebras em DNA de fita simples (Zewail-Foote *et al.*, 2001; Damia *et al.*, 2001).



**Figura 8** – Estrutura química de trabectedina (ET-743).

Os primeiros ensaios clínicos com a trabectedina foram complicados devido à severa toxicidade. Conseqüentemente, vários estudos foram realizados para o entendimento das reações relacionadas à toxicidade e para o ajuste de doses, o que atrasou a progressão normal da trabectedina pelos ensaios clínicos. Entretanto, as

<sup>6</sup> Glicoproteína-P é uma proteína que realiza o bombeamento de diversos quimioterápicos para fora das células e pode estar superexpressa em células tumorais. A glicoproteína-P confere às células tumorais um perfil de resistência a múltiplas drogas (MDR; Jin *et al.*, 2000).

<sup>7</sup> A via de reparo TC-NER está envolvida no reparo de dano ao DNA induzido por raios UV, determinados carcinógenos e alguns quimioterápicos, como os agentes alquilantes e cisplatina e a deficiência desta via está implicada em duas raras desordens genéticas: *Xeroderma pigmentosum* e Síndrome de Cockayne (Takebaischi *et al.*, 2001; Aune *et al.*, 2002).

modificações adotadas melhoraram sobremaneira o perfil toxicológico desse composto, com a grande vantagem de induzir apenas uma mielotoxicidade residual nas doses terapêuticas (revisado por Puchalski *et al.*, 2002).

A trabectedina, sob o registro de Yondelis®, foi o primeiro fármaco genuinamente marinho a ser aprovado para uso clínico na quimioterapia do câncer, além de ter sido o primeiro medicamento, em 20 anos, validado para o tratamento de sarcoma de tecidos moles. Yondelis® recebeu autorização da EMEA (*European Medicine Agency* – Agência Européia de Medicamentos) para a comercialização pela União Européia em setembro de 2007 ([www.emea.europa.eu](http://www.emea.europa.eu); [www.pharmamar.com](http://www.pharmamar.com)) e, atualmente, segue cumprindo outros protocolos de ensaios clínicos ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

## **2.1. Potencial Farmacológico das Ascídias Brasileiras**

O Brasil possui a segunda maior costa contínua do mundo, com mais de 8.500 km de extensão. Desde a latitude de 4°N à 34°S, o litoral brasileiro está, em sua maior parte, inserido entre os trópicos, donde diferentes perfis biogeográficos adornam o Oceano Atlântico. O extremo sul é caracterizado por extensas praias arenosas lavadas nas águas geladas da corrente das Malvinas. O litoral leste e sudeste apresentam contorno irregular, com ilhas e baías, alterando entre praias arenosas e costões rochosos. O nordeste é assinado pelas praias arenosas de águas quentes, com salientes dunas brancas, pomposos manguezais e recifes de coral, enquanto que a foz do rio Amazonas traja o litoral peculiar do norte.

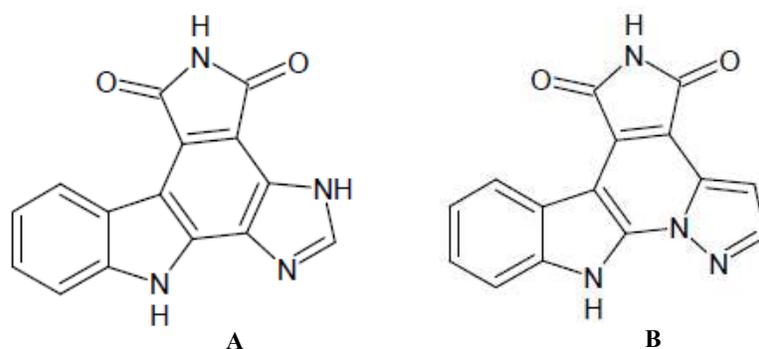
Tomando, pois, tantas feições, o Brasil abarca uma espetacular biodiversidade, com particular evidência às espécies marinhas. Entretanto, apesar da corrida pelo reconhecimento dessa heterogeneidade biológica e dos vários projetos que financiam a identificação dos recursos vivos naturais, alguns grupos, incluindo muitos táxons de invertebrados marinhos, permanecem sub-descritos.

Quanto à exploração de produtos naturais no ambiente marinho, embora com esparsos registros desde os anos 60, a colaboração entre químicos e farmacologistas só se deu, efetivamente, a partir de meados da década de 90 (Costa-Lotufo *et al.*, 2006). Não obstante o inexpressivo número de estudos diante da vasta biodiversidade brasileira, as ascídias já aparecem como uma atraente fonte de moléculas bioativas.

Um estudo de triagem publicado recentemente e realizado sob uma abordagem multidisciplinar, reuniu 349 extratos metanólicos obtidos de invertebrados marinhos coletados entre 1995 e 2002 em diversos pontos do litoral dos estados da Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo para avaliar seus potenciais antibiótico, leishmanicida e citotóxico. Das 99 amostras de ascídia analisadas, 60% apresentaram-se ativas em pelo menos um dos cinco bioensaios empregados. Em termos mais específicos, 28% dos extratos mostrou atividade antimicobacteriana, 5% deteram o crescimento de fungos ou bactérias patogênicas, 15% apresentaram-se citotóxicos a linhagens celulares tumorais e 2% inibiram a atividade enzimática de L-APRT (adenina-fosforibosiltransferase de *Leishmania tarentolae*), uma enzima chave no metabolismo das purinas do referido parasita. *Didemnum*, *Polysyncraton*, *Clavelina*, *Herdmania*, *Aplidium*, *Microcosmus*, *Eusynstyella*, *Botrylloides* e *Symplesma* abrangem os gêneros cujos extratos apresentam bioatividade significativa (Seleghim *et al.*, 2007).

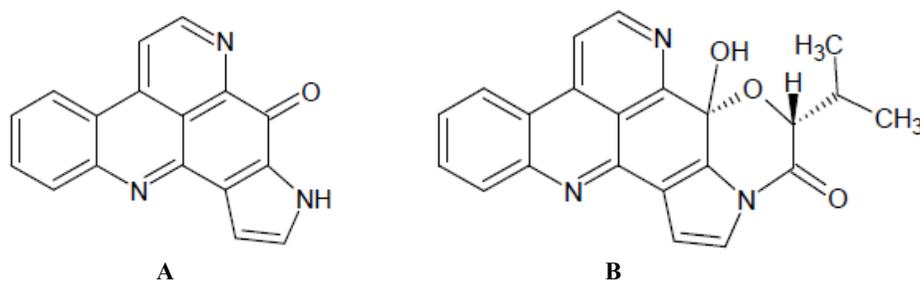
Outro *screening* com extratos de invertebrados marinhos avaliou os efeitos sobre o ciclo celular e a integridade dos microtúbulos de células T47D em cultura, donde dois extratos obtidos de ascídias apresentaram-se citotóxicos. O extrato hexânico de uma espécie de *Didemnum* sp., inibiu em 50% a proliferação celular na concentração de 30 µg/mL, entretanto, sem causar alteração estrutural dos filamentos de tubulina. O extrato metanólico de *Cystodytes dellechiajei*, em 30 µg/mL, inibiu a proliferação celular em 69%, além de causar a diminuição do índice mitótico e a desestruturação da rede de microtúbulos (Prado *et al.*, 2004).

O extrato metanólico bruto de *Didemnum granulatum*, coletada no canal de São Sebastião, litoral norte de São Paulo, apresentou atividade em um *screening* original e direcionado para a identificação de inibidores do ciclo celular no *checkpoint* em G2. O fracionamento bioguiado deste extrato resultou no isolamento de cinco moléculas candidatas ao princípio ativo, sendo três alcalóides já conhecidos - as dideminidas A, C e E - e dois alcalóides inéditos – granulatumida e isogranulatumida (figura 9). Os alcalóides inéditos, identificados como as moléculas ativas, foram os primeiros exemplares dessa nova classe de inibidores do ciclo celular específicos para a fase G2 (Berlinck *et al.*, 1998; Roberge *et al.*, 1998). Em trabalho subsequente de re-investigação do extrato bruto de *D. granulatum*, foi isolado ainda outro alcalóide derivado, a 6-bromogranulatumida (Britton *et al.*, 2001).



**Figura 9** – Compostos isolados de *Didemnum granulatum*: granulatumimida (A) e isogranulatumimida (B).

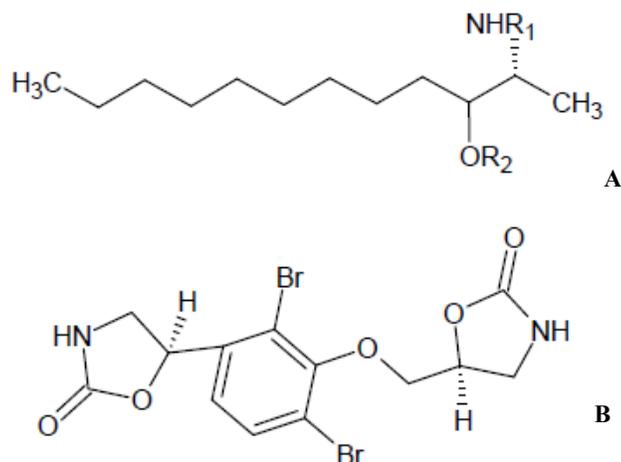
O fracionamento bioguiado do extrato metanólico de *Cystodytes dellechiajei*, também coletada no canal de São Sebastião, rendeu a Torres e colaboradores (2002) dois alcalóides citotóxicos do grupo das piridoacridinas, as sebastianinas A e B (figura 10). Esses alcalóides apresentaram-se citotóxicos contra um painel de células da linhagem HCT *knockout* ou não para a expressão de p53 ou p21. Sebastianina B mostrou-se levemente mais ativa que A para as quatro linhagens, e ambas apresentaram notória seletividade para as células p53<sup>+/+</sup> - IC<sub>50</sub> (HCT p53<sup>+/+</sup>) de 5,1 e 0,9 μM vs. IC<sub>50</sub> (HCT p53<sup>-/-</sup>) 9,7 e 2,9 μM para sebastianina A e B, respectivamente.



**Figura 10** – Compostos isolados de *Cystodytes dellechiajei*: sebastianina A (A) e sebastianina B (B).

O extrato bruto de *Clavelina oblonga*, também coletada no canal de São Sebastião, apresentou atividade antibiótica e antifúngica contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, respectivamente. O fracionamento bioguiado deste extrato levou ao isolamento de (2*S*,3*R*)-2-aminododecan-3-ol (figura 11), que inibiu o crescimento de *C.*

*albicans* com potência comparável aos antifúngicos típicos nistidina e cetoconazol (MIC 0,7µg/mL), e 3,5-dibromo-4-(2-oxo-5-oxazolidinil) metoxifenil-2-oxazolidinona, que se apresentou inativo (Kossuga *et al.*, 2004).



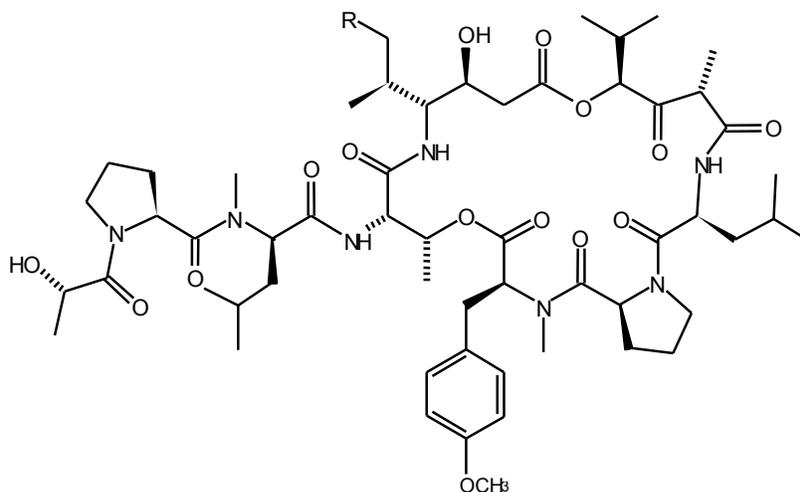
**Figura 11** – Compostos isolados de *Clavelina oblonga*: (2*S*,3*R*)-2-aminododecan-3-ol (A) e 3,5-dibromo-4-(2-oxo-5-oxazolidinil) metoxifenil-2-oxazolidinona (B).

O extrato metanólico bruto das víceras da ascídia solitária<sup>8</sup> *Phallusia nigra*, coletada no litoral norte de São Paulo, apresentou atividade hemolítica e retardou o desenvolvimento normal de ovos de ouriço do mar. A fração molecular < 500 kDa, obtida por ultrafiltração do extrato, inibiu a proliferação e a síntese de DNA de células do carcinoma mamário T47D em cultura (Costa *et al.*, 1996). Quando avaliado sobre preparação de íleo de cobaias, foi demonstrado que o extrato de *P. nigra* exercia efeito estimulante sobre a contração, sendo este efeito antagonizado por mepiranina, mas não por atropina, assim, sugerindo uma atividade direta sobre receptores histamínicos do tipo H1 (Costa *et al.*, 1997).

As tamandarinas A e B (figura 12) são novos depsipeptídeos cíclicos isolados de uma espécie brasileira de *Didemnum* sp. coletada na praia de Tamandaré, no litoral de

<sup>8</sup> As ascídias podem ser solitárias ou coloniais. Nas espécies solitárias, a túnica que as reveste externamente envolve completamente o indivíduo, donde ergue-se um sifão inalante e outro exalante, estruturas que viabilizam o hábito filtrador destes organismos. No caso das ascídias coloniais, a túnica forma uma cobertura comum e o sifão exalante é compartilhado pela colônia.

Pernambuco, e guardam grande semelhança estrutural à didemnina B. Tamandarina A mostrou-se altamente citotóxica e ligeiramente mais ativa que didemnina B, no ensaio de clonogênico de formação de colônias contra três linhagens de células tumorais humanas - BX-PC3, DU145 e UMSCC10b – com IC<sub>50</sub> de 1,79, 1,36 e 0,99ng/mL, respectivamente (Vervoort *et al.*, 2000).



**Figura 12** – Compostos isolados de *Didemnum* sp.: tamandarina A (R = CH<sub>3</sub>) e tamandarina B (R = H).

O extrato metanólico de *Didemnum psammathodes* foi selecionado para estudo a partir de um *screening* inicial com 10 espécies de ascídias do litoral do estado do Ceará, de onde foram isolados diversos compostos de seu metabolismo primário. Uma mistura de ésteres metílicos (miristato de metila + palmitato de metila + estereato de metila; figura 13) apresentou atividade antileucêmica, assim avaliada em 4 linhagens celulares – HL-60, CEM, Molt-4 e K562 – provavelmente por inibição da síntese de DNA e indução de apoptose e necrose (Takeara *et al.*, 2008). Este *screening* inicial destacou outras 5 espécies com interessantes perfis de atividade biológica, entre algumas endêmicas e, inclusive, um gênero ainda não descrito (Jimenez *et al.*, 2003).



**Figura 13** – Ésteres metílicos obtidos em mistura do extrato metanólico de *Didemnum psammathodes*.

Com relação às macromoléculas, estudos com *Phallusia (Ascidia) nigra* e, em maior extensão, *Styela plicata*, identificaram alguns glicosaminoiglicanos<sup>9</sup> (GAGs) com atividade biológica. O dermatan sulfato isolado de *Phallusia nigra* não apresentou atividade anticoagulante detectável, provavelmente devido ao atípico padrão de sulfatação de sua cadeia, e mostrou apenas uma modesta potenciação sobre o cofator II da cascata de coagulação sanguínea (Pavão *et al.*, 1995). De *Styela plicata* foram obtidos diversos GAGs sulfatados. Pavão e colaboradores (1998) isolaram um dermatan sulfato com alto grau de sulfatação e robusta atividade estimulante sobre o cofator II. Glicanos heparina-*like* com diferentes graus de sulfatação foram encontrados em diferentes tecidos da ascídia *Styela plicata*. Neste mesmo trabalho também foi demonstrado uma relação positiva entre a intensidade de sulfatação dos polissacarídeos com a atividade antitrombina *in vitro* (Gandra *et al.*, 2000). Trabalhos subsequentes do mesmo grupo avaliaram o potencial anticoagulante e antitrombótico em ratos Wistar de um polímero heparina-*like* obtido de células *test* da ascídia, um tipo de célula acessória localizada no espaço perivitelínico dos óocitos onde ficam até o completo desenvolvimento dos ovos. Apesar da baixa atividade anticoagulante, a dose de 5mg/kg inibiu em 45% a atividade antitrombótica sem induzir sangramento (Cavalcante *et al.*, 2002; Cardilo-Reis *et al.*, 2006).

## 2.2. Resultados Preliminares dos Estudos com *Eudistoma vannamei*

As ascídias são animais encontrados nos mais diversos ambientes marinhos. São particularmente abundantes em regiões costeiras de águas rasas, não raro sendo organismos dominantes em muitas dessas comunidades. No Brasil, o conhecimento acerca deste grupo é ainda rudimentar, a exceção, talvez, daquelas espécies que ocorrem na costa do estado de São Paulo. Quando se toma o litoral tropical brasileiro, onde está inserida toda a região nordeste, essa carência é ainda mais evidente, contando simplesmente com alguns registros pontuais (Millar, 1977; Rocha, 2002; Lotufo, 2002; Lotufo & Silva, 2006).

---

<sup>9</sup> Glicosaminoglicanos são polissacarídeos complexos cuja estrutura é baseada na repetição de unidades dissacarídeas de ácido herurônico (ácido  $\alpha$ -L-idurônico ou  $\beta$ -D-glicurônico) e hexosamina ( $\alpha$ -D-glicosamina ou  $\beta$ -D-glicosamina). Podem ser distinguidos como dermatan sulfato, condroitin sulfato ou heparan sulfato, ocupando a porção polissacarídea de proteoglicanos ou como polissacarídeos livres (Heinegard & Paulsson, 1984; Kjellen & Lindahl, 1991; Conrad, 1998).

Para o estado do Ceará, um dos menos amparados por informações de ocorrência faunística, Lotufo & Silva (2006) registraram 18 espécies de ascídias, calhando, estas, nos afloramentos de arenito que interrompem as grandes extensões das praias arenosas. Neste cenário, uma fauna bastante peculiar foi apresentada, incluindo várias espécies novas, o que indica um alto grau de endemismo nessa região.

Os 573 km da zona costeira cearense também permanecem praticamente desconhecidos pelos grupos que estudam produtos naturais. Todavia, um estudo pioneiro realizado por Jimenez *et al.* (2003) analisou a atividade citotóxica do extrato hidrometanólico bruto das 10 espécies de ascídias mais abundantes do litoral cearense e destacou a espécie *Eudistoma vannamei* Millar, 1977 (figura 14) pela sua pronunciada atividade nos ensaios biológicos, principalmente quanto à inibição da proliferação de diversas linhagens de células tumorais em cultura.

*E. vannamei* é reconhecida por suas colônias pedunculadas, unidas por uma base que adere ao substrato e uma túnica translúcida e firme que deixa transparecer seus zoóides<sup>10</sup> de cor amarela ou laranja. Vale ressaltar que esta é uma espécie endêmica da região nordeste do Brasil e é categoricamente a espécie de ascídia mais abundante do estado do Ceará (Lotufo & Silva, 2006).

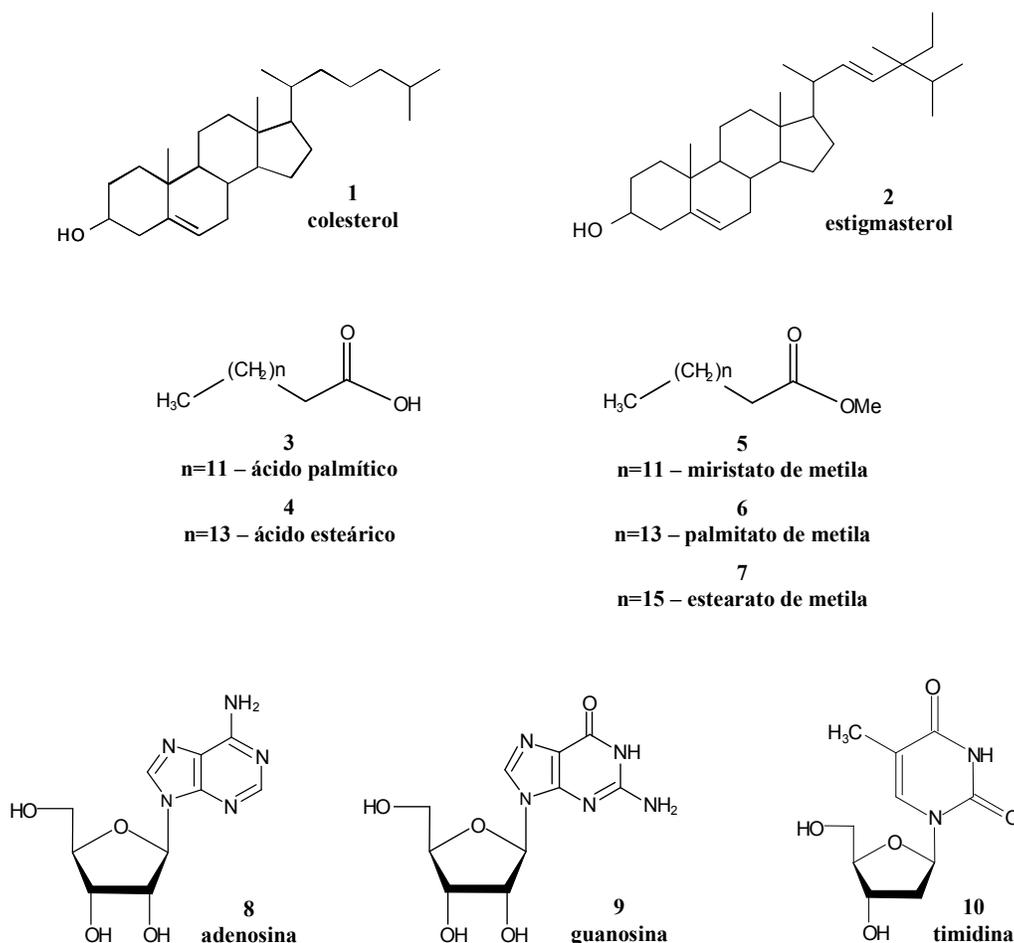


**Figura 14** – Colônia da ascidia *Eudistoma vannamei* Millar, 1977 fotografada na praia da Taíba, município de São Gonçalo do Amarante, CE. Por Diego Wilke.

---

<sup>10</sup> Zoóide é o termo usado para designar cada indivíduo de uma colônia.

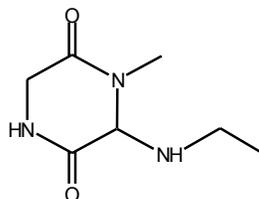
Takeara (2006) conduziu um fracionamento químico do extrato bruto de *E. vannamei* de onde foram identificadas algumas moléculas derivadas do metabolismo primário, como esteróides (**1 e 2**), ácidos graxos (**3 e 4**) e ácidos graxos metilados (**5, 6, e 7**), obtidos das fases apolares, e alguns nucleosídeos (**8, 9 e 10**), obtidos da fase aquosa (figura 15).



**Figura 15** – Compostos obtidos do extrato bruto de *Eudistoma vannamei* (Takeara, 2006).

O fracionamento bioguiado do extrato hidrometanólico desta espécie (Jimenez, 2004; Jimenez, *et al.*, 2008) sugeriu a presença de compostos com relevante citotoxicidade sobre células tumorais, enfatizada nas frações de polaridade intermediária derivadas da fase diclorometânica. A análise química das frações ativas aponta para misturas de compostos nitrogenados derivados de aminoácidos, de onde foi isolada a dicetopiperazina inédita 6-etilamino-1-metil-piperazina-2,5-diona (figura 16) como

componente majoritário. Esta substância não apresentou efeito sobre a proliferação de células tumorais em cultura o que sugere que a atividade destas frações esteja relacionada a compostos encontrados em menor quantidade (Jimenez, 2004).



11

6-etilamino-1-metil-piperazina-2,5-diona

**Figura 16** – Estrutura da dicetopiperazina isolada de *Eudistoma vannamei* (Jimenez, 2004).

Grande parte das espécies mencionadas como fontes de substâncias bioativas interessantes habitam as regiões tropicais. A vasta costa brasileira abriga um potencial latente para a descoberta de substâncias de interesse médico e farmacológico e a região nordestina compreende a maior parte do litoral tropical do Brasil, com aproximadamente 3000 km de extensão. Vale ressaltar que este estudo está inserido em um projeto mais largo, iniciado há cerca de 8 anos, que sugere o desbravamento do potencial farmacológico resguardado na costa do Ceará. Os estudos nesta área são considerados estratégicos por envolver o conhecimento da biodiversidade num sentido amplo, além de fontes renováveis de substâncias com importância biomédica. Ainda que recentes e relativamente escassos, os achados nesse campo despertam grande interesse pelos grupos que estudam produtos naturais e abrem caminhos para se seguir explorando novas fontes naturais na busca de substâncias bioativas.

## OBJETIVOS

### 1. Geral

Realizar a prospecção de substâncias com potencial anticâncer a partir da identificação e caracterização de princípios citotóxicos isolados da ascídia *Eudistoma vannamei*.

### 2. Específicos

- Isolar e identificar princípios citotóxicos no extrato bruto da ascídia *Eudistoma vannamei* coletada no litoral cearense;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos isolados em linhagens tumorais de diferentes origens;
- Determinar a atividade tempo- e concentração-dependente do efeito citotóxico dos compostos obtidos em células da linhagem HL-60;
- Avaliar o efeito citostático dos compostos sobre o ciclo celular de células HL-60;
- Avaliar o efeito citotóxico dos compostos sobre a indução de apoptose de células HL-60.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Materiais Utilizados

A especificação dos equipamentos, dos softwares de aquisição e análise dos dados, bem como o fabricante dos reagentes utilizados estão detalhadas junto à descrição das metodologias. As soluções preparadas e a descrição dos componentes dos kits utilizados estão detalhadas no Anexo I – Soluções e Kits.

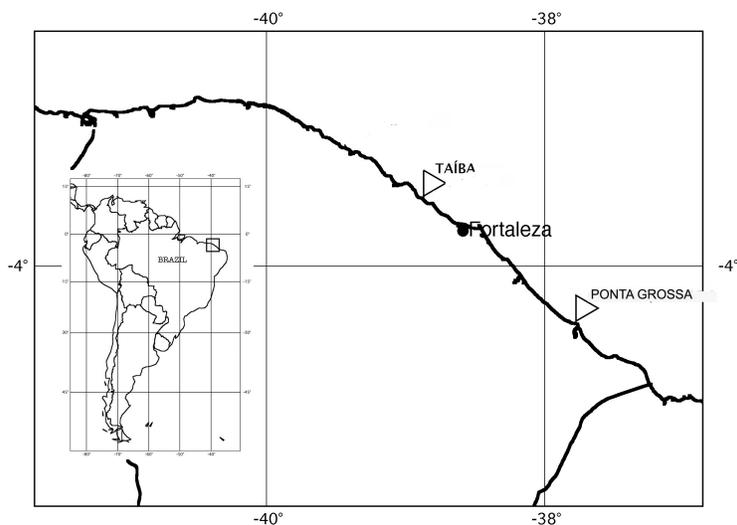
### 2. Metodologia Experimental

#### 2.1. Coleta e Identificação do Material

Os exemplares da ascídia *Eudistoma vannamei* foram coletados no litoral do estado do Ceará, nas praias de Taíba (S 03°34,125'; W 038°54,469'), pertencente ao município de São Gonçalo do Amarante, e de Ponta Grossa (S 04°37,591'; W 037°29,905'), no município de Icapuí. O material foi lavado em água do mar para redução da contaminação e, em seguida, imerso em MeOH, sendo posteriormente armazenado à -4 °C até o momento da preparação do extrato. Na figura 17 estão destacados os pontos de coleta dos espécimes.

As coletas foram realizadas entre os meses de abril e julho de 2005, em períodos de baixamar, tendo ocorrido numa frequência mensal na praia da Taíba e num único esforço na praia de Ponta Grossa, no último mês citado.

Uma amostra do material coletado em cada ponto foi separada e fixada em solução de EtOH a 70% para a identificação da espécie pelo Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará.



**Figura 17** - Mapa identificando os pontos de coleta do material a ser estudado ao longo da costa do estado do Ceará.

## 2.2. Fracionamento Químico Bioguiado

### 2.2.1. Obtenção dos extratos brutos

A homogeneização dos indivíduos de cada coleta foi realizada em MeOH, numa proporção de 1:5 (m/v) do peso úmido do animal. Esta solução foi filtrada, concentrada a vácuo em evaporador rotativo (TECNAL, modelo TE-120) e, posteriormente, liofilizada (Thermo Electron Corporation, modelo MicroModulyo Freeze Dryer 115) para a obtenção do extrato hidroalcoólico bruto.

### 2.2.2. Fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto (EHA)

O fracionamento do EHA bruto de *E. vannamei* foi realizado no Laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob supervisão do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes. Nos processos de extração, fracionamento químico e purificação foram empregados solventes orgânicos de grau comercial purificados por destilação fracionada no referido laboratório.

Inicialmente, o extrato bruto foi ressuspensionado em MeOH/H<sub>2</sub>O 7:3 (m/v), sendo primeiro ressuspensionado em MeOH para precipitação do sal, separando-se o precipitado e completando a solução com o volume proporcional de dH<sub>2</sub>O. Esta solução foi particionada 3 vezes com DCM numa proporção de 2:1 (v/v), tendo sido reunidas as partições diclorometânicas e o resíduo hidroalcoólico evaporado para a remoção do solvente. A solução aquosa resultante foi particionada 3 vezes com n-BuOH (2:1 (v/v) para cada partição), tendo sido reunidas as partições butanólicas e ambas as soluções finais obtidas secas em rotaevaporador a vácuo.

### 2.2.3. Processamento da fase DCM

#### *Cromatografia em coluna de Si*

A fração DCM foi fracionada em coluna *flash* de sílica gel 60 GF<sub>254</sub>, 70-230 *mesh* ASTM (Sigma). Uma coluna de vidro medindo 55cm de altura e 25cm de circunferência foi preenchida com 800g de sílica. A pastilha preparada com aproximadamente 15g da fração DCM utilizou 15g da mesma sílica. A coluna foi empacotada com Hex/AcOEt 8:2 (v/v), tendo sido esta a primeira mistura de solventes a eluir a coluna. A coluna prosseguiu sua eluição aumentando lentamente a proporção de AcOEt na mistura, até 100% AcOEt. Em seguida, para o incremento da polaridade da fase móvel, foi adicionado MeOH na razão AcOEt/MeOH 8:2 (v/v). E se seguiu aumentando a polaridade da mistura de solvente incrementando, lentamente, a proporção de MeOH na mistura, até AcOEt:MeOH 3:7 (v/v). Foram recolhidas 257 frações de 250mL, além da lavagem final da coluna, realizada com MeOH 100%, em amostra única. O solvente de cada fração foi evaporado em evaporador rotativo a vácuo e seco totalmente sob jato de ar comprimido.

#### *Cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC)*

As frações recolhidas da coluna de Si, após secas, foram analisadas por CCDC em placas de sílica. As placas para cromatografias comparativa em camada delgada foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel GF<sub>254</sub> (Merck) em água destilada na proporção 1:2 (m/v) sobre placas de vidro 20 x 20cm, com o auxílio de um

espalhador, de modo a se obter uma camada de 0,25mm de espessura de adsorvente sobre as placas.

As placas de sílica foram ativadas durante 30 min em estufa a 150 °C e as amostras foram aplicadas utilizando-se tubos capilares de vidro. As placas foram eluídas em diferentes combinações de solventes baseando-se na polaridade da fração (Hex, DCM, AcOEt, MeOH e dH<sub>2</sub>O). As placas foram analisadas em câmara de UV (UVGL-25) sob comprimentos de onda de 254 e 366nm e por reação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sob uma chapa aquecida.

#### *Reunião das frações*

A partir da análise do perfil de eluição de cada amostra, as frações foram reunidas, por semelhança, em 20 frações, e denominadas DCM 1 a DCM 20.

#### *Cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP)*

O processamento das frações DCM 12, DCM 13, DCM 15 e DCM 16 e das sub-frações DCM 14.3 e DCM 14.3.1 foi dado por CCDP.

Placas de vidro, 20 x 20cm, recobertas por sílica (preparadas como a descrição das placas de CCDC, sendo que com 1mm de adsorvente sobre as placas), foram ativadas durante 30 minutos em estufa a 150 °C e as amostras, previamente diluídas em DCM, foram aplicadas de modo a formar uma linha paralela à base da placa, distando, dela, cerca de 2,5cm. Foi aplicado entre 20 a 30mg de amostra em cada placa. As placas foram eluídas com uma mistura dos solventes DCM, MeOH e H<sub>2</sub>O em diferentes combinações, ajustando-se a força de arrasto à polaridade das frações. Cada placa foi eluída entre 2 e 3 vezes. As bandas separadas em cada placa foram retiradas e reunidas às suas bandas homólogas. A sílica foi lavada com MeOH ou AcOEt ou um combinação dos dois solventes, de modo a remover toda a amostra adsorvida na sílica. Cada banda de cada fração foi evaporada separadamente em evaporador rotativo a vácuo e secas totalmente sob jato de ar comprimido.

### *Cromatografia em coluna de Si da fração DCM 14*

A fração DCM 14, por ter mais massa (1,8093g) que as demais frações selecionadas, foi separada por cromatografia em coluna de sílica gel 60 GF<sub>254</sub>. Uma coluna de vidro medindo 55cm de comprimento e 8cm de diâmetro foi preenchida com 170g de sílica. A pastilha preparada com aproximadamente 1,5g da fração DCM 14 utilizou cerca de 1g da mesma sílica. A coluna foi empacotada com DCM/MeOH 9:1 (v/v), tendo sido esta a mistura de solventes usada para eluir toda a coluna. Foram recolhidas 190 amostras de 20mL, que foram secas sob jato de ar comprimido.

As amostras foram reunidas por suas semelhanças observadas por CCDC em 14 sub-frações. As placas de CCDC foram eluídas com DCM:MeOH 9:2 ou 9:3 (v/v) e analisadas em câmara de UV de raios longos e curtos e por reação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### *Determinação estrutural de DCM 14.3.1.3*

Para a determinação estrutural de DCM 14.3.1.3 foram obtidos seus espectros de infra-vermelho (IV; Perkin-Elmer, modelo FT-IR 1000), ressonância nuclear magnética (RNM; Bruker Avance, modelo DRX-500) <sup>1</sup>H (500 MHz) e <sup>13</sup>C (125 MHz) e massa de alta resolução (MS; Bruker Daltonics, modelo UltrOTOF-Q). As análises por IV, RNM e MS utilizaram solventes de grau cromatográfico.

DCM 14.3.1.3 foi determinada como uma mistura 1:1 de dois alcalóides homólogos, 2-hidroxi-7-oxoestaurosporina (**I**) e 3-hidroxi-7-oxoestaurosporina (**II**), e será referida, daqui por diante, como **I/II**.

### *Ensaio do MTT*

O ensaio do MTT foi utilizado para rastrear e monitorar a atividade biológica do extrato de *E. vannamei* quando submetido às diversas etapas do fracionamento. Este ensaio permite avaliar a atividade antiproliferativa sobre células em cultura induzido por um determinado estímulo químico. Todas as partições, frações e sub-frações foram testadas por este ensaio, seja em uma única concentração, para uma constatação qualitativa do efeito, ou em diluições seriadas, para uma avaliação quantitativa do efeito. Este ensaio é tratado com mais detalhes no item 2.3, a seguir.

## 2.3. Avaliação da Atividade Citotóxica *in vitro*

### 2.3.1. Linhagens e modelos celulares

As linhagens celulares utilizadas para avaliação da atividade antiproliferativa foram obtidas como doação pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI) e estão listadas quanto à origem e tipo histológico na tabela 3. As células mononucleadas de sangue periférico (PBMC), utilizadas como modelo para avaliação da citotoxicidade sobre células normais não-transformadas, foram obtidas de voluntários sadios.

**Tabela 3:** Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de MTT

Linhagem celular	Tipagem Histológica	Origem	Concentração de plaqueamento
<b>HL-60</b>	Leucemia promielocítica	Humana	$0,3 \times 10^6$
<b>Molt-4</b>	Leucemia linfocítica	Humana	$0,3 \times 10^6$
<b>Jurkat</b>	Leucemia de células T	Humana	$0,3 \times 10^6$
<b>K562</b>	Leucemia mielóide crônica	Humana	$0,3 \times 10^6$
<b>HCT-8</b>	Cólon	Humana	$0,7 \times 10^5$
<b>SF 295</b>	Glioblastoma	Humana	$0,1 \times 10^6$
<b>PC3</b>	Próstata	Humana	$0,1 \times 10^6$
<b>DU 145</b>	Próstata	Humana	$0,1 \times 10^6$
<b>MX 1</b>	Mama	Humana	$0,1 \times 10^6$
<b>MDA 231</b>	Mama	Humana	$0,1 \times 10^6$
<b>MDA MB 435</b>	Melanoma	Humana	$0,1 \times 10^6$
<b>B 16</b>	Melanoma	Murina	$0,5 \times 10^5$
<b>J774</b>	Macrófago	Murina	$0,3 \times 10^6$
<b>L929</b>	Fibroblasto	Murina	$0,7 \times 10^5$
<b>PBMC</b>	Linfócito	Humana	$0,3 \times 10^6$

### *Manutenção das linhagens celulares*

As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe 12, classe II) e mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (NUAIRE, modelo TS Autoflow).

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (25cm<sup>2</sup>, volume de 50mL ou 75cm<sup>2</sup>, volume de 250mL, Corning), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab) complementando com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicillina e 100 µg/mL estreptomicina). O meio RPMI 1640 foi preparado a partir da diluição do conteúdo em pó do sachê em água tridestilada numa temperatura entre 15 e 20 °C sob agitação lenta e constante e suplementado com bicarbonato de sódio (5,6%), glutamina (0,2M) e HEPES (1M). O pH foi ajustado para 7,2 e o meio foi filtrado em membrana de nitrocelulose com poro de 0,22µm de diâmetro (Millipore) para esterilização.

As culturas tiveram seu crescimento acompanhado sob microscópio óptico de inversão (Nikon, modelo Diaphot) a cada 24 h. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo, numa concentração de 0,5-1,0 x 10<sup>6</sup> células/mL. Para o desprendimento das células aderidas foi utilizado solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em PBS (Butler & Dawson, 1992).

#### *Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (PBMC)*

As células mononucleadas foram obtidas do sangue periférico de voluntários sadios coletado em tubos tipo Vacutainer contendo solução de EDTA dopotássico (Becton, Dickinson & Co.) como anticoagulante. Após a coleta, 8mL de sangue total foram vagarosamente depositados em sobre 2mL de Ficoll®-Hypaque (Sigma) e centrifugados para separação das fase 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 PBMC foram retiradas, lavadas 2 vezes com PBS e ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino fetal e antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicillina, 100 µg/mL estreptomicina). Para estimular a proliferação dos linfócitos, foi adicionado ao meio 3% do agente mitogênico fito-hemaglutinina (Cultilab).

#### 2.3.2. Ensaio do MTT

Este ensaio pode ser utilizado para determinar citotoxicidade e proliferação. É uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na

conversão do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromida (MTT; Sigma), um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias ativas das células vivas (Mosmann, 1983). No presente trabalho, este ensaio foi utilizado para o fracionamento bioguiado do extrato bruto e quantificação da atividade citotóxica de **I/II** em diferentes linhagens celulares. Estaurosporina (STP; Sigma) foi utilizada como referência nos ensaios de avaliação de atividade biológica.

Para tanto, as células em suspensão ou monocamadas foram plaqueadas em multiplacas de 96 cavidades em densidade entre  $0,7 \times 10^5$  e  $0,3 \times 10^6$  células/mL (ajustado para cada linhagem, como mostrado na tabela 3) utilizando o método automatizado oferecido pelo instrumento de *High Throughput Screening* (Beckman Coulter Inc., modelo Biomek 3000). As amostras teste foram incubadas durante 24, 48 (em células HL-60) e 72 h juntamente com a suspensão de células. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min; Eppendorf, modelo Centrifuge 5403), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 150µL da solução de MTT a 0,5 mg/mL, tendo sido reincubada por mais 3 h, em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10min), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi resuspendido em 150µL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880) utilizando o programa Multimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.) e filtro de 570nm.

#### *Análise dos dados*

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. Para as amostras ensaiadas em triplicatas de dose única, o valor da absorbância encontrado foi transformado em porcentagem, relativo ao controle. Para as amostras testadas em diluições seriadas, foi plotado o gráfico absorbância x concentração e determinadas as suas IC<sub>50</sub> (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e respectivos intervalos de confiança (CI 95%) realizado a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

### 2.3.3. Ensaio de AlamarBlue®

O ensaio do AlamarBlue® (Invitrogen) é amplamente empregado para avaliar o efeito antiproliferativo ou citotóxico em estudos de prospecção de fármacos ou avaliação de atividade biológica de produtos naturais. Como o MTT, o AlamarBlue® estima indiretamente o número de células a partir de uma associação colorimétrica. O teste baseia-se na utilização do metabolismo redox das células viáveis para reduzir o reagente azul resazurin ao composto róseo resorufin (Nociari *et al.*, 1998). Este trabalho recorreu a tal procedimento para avaliar e comparar os efeitos de **I/II** e STP sobre PBMC como um modelo de estudo de citotoxicidade sobre células normais.

As PBMC obtidas de voluntários sadios foram diluídas para a concentração de  $5 \times 10^5$  e distribuídas em multiplacas de 96 poços. Após 24 h as substâncias foram diluídas e incubadas com as células por 72 h em estufa de a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. 10µL de AlamarBlue® foi acrescentado em todos os poços e lidos 24 h depois em espectrofotômetro de placas em dois comprimentos de onda - 570 e 600nm.

#### *Análise dos dados*

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. Foi plotado o gráfico absorbância vs. concentração e determinadas as suas IC<sub>50</sub> e respectivos CI 95% realizado a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism 5.0.

## **2.4. Análise dos Efeitos sobre Células HL-60**

Para os experimentos de determinação do modo de ação de **I/II** e STP foram utilizadas as células leucêmicas da linhagem HL-60 plaqueadas na concentração de  $0,3 \times 10^6$  células/mL e avaliadas quanto a diversos efeitos celulares. Os protocolos aplicados neste estudo examinaram os efeitos concentração e tempo dependentes.

### 2.4.1. Estudos por citometria de fluxo

O citômetro de fluxo é um equipamento que permite examinar e classificar células ou outras partículas microscópicas em suspensão marcadas com sondas

fluorescentes. A técnica de citometria de fluxo aceita realizar análises multiparamétricas simultâneas em tempo real de um grande número de células por amostra. Seu princípio consiste na emissão de um feixe de luz laser (argônio, neste caso, excitando a 488nm) sobre a suspensão celular que fica sujeita à passagem sob um fluxo hidrodinâmico por dentro de um tubo capilar. Idealmente, apenas uma célula por vez passa diante do feixe de luz. Vários detectores são posicionados de modo a registrar o desvio da luz induzido por cada célula, apanhando a sua dispersão linear (FSC, *Forward Scatter*) ou lateral (SSC, *Side Scatter*) e a emissão de fluorescência, classificando as partículas de acordo com cada evento (Darzynkiewicz *et al.*, 1994; Givan, 2001).

#### *Verificação de viabilidade e morfologia celular*

Este ensaio baseia-se na intensidade de dispersão da luz incidente sobre as células e na capacidade de o iodeto de propídeo (PI) penetrar as células cuja membrana esteja rompida e ligar-se ao DNA nuclear, emitindo alta fluorescência vermelha quando excitado pelo laser. As células cuja membrana permanece íntegra emitem menor fluorescência.

As células HL-60 foram tratadas com 10, 20, 40 ou 80ng/mL **I/II** por 72h. Nos intervalos de 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h, uma alíquota da suspensão de células em cada um dos tratamentos, assim como das células não tratadas foram submetidas à avaliação. Doxorrubicina (Sigma) 50ng/mL foi utilizada como o controle positivo do experimento. Também, células HL-60 tratadas com 40, 100, 200 e 500ng/mL STP foram analisadas após 24, 48 e 72h de incubação. As células HL-60 controle e submetidas aos tratamentos foram expostas a uma solução de iodeto de propídeo (PI; Sigma) a 50 mg/mL e PBS e, em seguida, analisadas em citômetro de fluxo (Guava Technologies, modelo EasyCyte Mini-System). As células foram separadas quanto à sua dispersão linear, correlacionando ao seu volume, e dispersão lateral, correlacionando à sua granulometria. A intensidade de emissão de fluorescência correlaciona com a integridade de membrana e resolve a viabilidade celular.

#### *Análise de conteúdo e fragmentação de DNA*

Este ensaio permite avaliar o conteúdo e a integridade do DNA nuclear. Com o núcleo íntegro e com a determinação da quantidade de DNA – se 2n, 4n ou um ponto

intermediário -, pode-se supor quanto à fase do ciclo celular em que a célula se encontra – se G1, G2/M ou S, respectivamente. A condensação da cromatina e fragmentação nuclear são características marcantes de células em processo apoptótico enquanto que as células necróticas geralmente mantêm seus núcleos íntegros e picnóticos. Este teste, novamente, utilizou-se da capacidade do PI se ligar ao DNA. Inicialmente, a membrana plasmática das células é lisada para que o PI possa se ligar ao núcleo. A fluorescência emitida é proporcional ao conteúdo de DNA e seu estado de integridade e condensação. Células com mais DNA e núcleo íntegro emitem fluorescência mais alta; já núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado terão incorporado menor quantidade de PI, emitindo, assim, menor fluorescência.

As células HL-60 foram tratadas com 40 ou 80ng/mL **I/II** por 72h. Nos intervalos de 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h, uma alíquota da suspensão de células em cada um dos tratamentos, assim como das células não tratadas foram submetidas à avaliação. Também, células HL-60 tratadas com 40, 100, 200 e 500ng/mL STP foram analisadas após 24, 48 e 72h de incubação. Para avaliar a reversibilidade do efeito de **I/II** sobre o ciclo celular, células HL-60 foram tratadas durante 24h com 40ng/mL **I/II** e reincubadas em meio livre da droga por mais 24h. Para avaliar o tempo de estímulo necessário para se observar efeito sobre o ciclo celular, células HL-60 foram incubadas por 3, 6 ou 12h com 40ng/mL **I/II** e reincubadas em meio livre da droga, respectivamente, por 21, 18 e 12h, de modo a completar 24h desde o início do tratamento. Este mesmo protocolo de análise de tempo de estímulo e reversibilidade do efeito de **I/II** sobre células HL-60 também foi aplicado para verificar a contagem e a viabilidade celular.

As células HL-60 controle e tratadas foram expostas a uma solução de PI-ciclo (detalhada no Anexo I) e incubadas por 20 minutos na ausência de luz. Em seguida, as células foram levadas ao citômetro de fluxo. As células foram separadas quanto à integridade do núcleo, condensação da cromatina e conteúdo de DNA e os histogramas obtidos foram modelados e quantificados para cada evento usando o programa ModFit LT 3.2 (Verity Software House) e, para apresentação, foram modelados usando o programa Cyflogic 1.2.1 (CyFlo Ltd.)

### *Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial*

A mitocôndria é responsável pela iniciação da via intrínseca do processo de apoptose celular. O desprendimento de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2/xL da membrana externa da mitocôndria induz a abertura dos poros transitórios de permeabilidade da membrana interna e a liberação de moléculas pró-apoptóticas, como citocromo c e Smac/Diablo. A mudança na permeabilidade da membrana interna leva à saída de íons  $H^+$ , causando a despolarização do potencial no espaço transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), inchaço da matriz e conseqüente ruptura da membrana externa. Bcl-2, citocromo c e Smac/Diablo livres no citoplasma são sinais para o acionamento da apoptose. A rodamina 123, um corante fluorescente lipossolúvel e nucleofílico, é seqüestrada pelas mitocôndrias com  $\Delta\Psi_m$  inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à ligação de rodamina 123 às cargas positivas internas, enquanto que as mitocôndrias despolarizadas terão menor afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência (Gorman *et al.*, 1997).

Células da linhagem HL-60 foram incubadas por 24, 48 ou 72 h com 40 ou 80ng/mL **I/II**. Doxorrubicina 50ng/mL foi utilizada como o controle positivo do experimento. Uma alíquota de 100 $\mu$ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foi adicionado a 200 $\mu$ L de rodamina 123 (Sigma) diluída em PBS para 1 $\mu$ g/mL. Após 15 minutos de incubação a 37 °C no escuro, as amostras foram lavadas com PBS, reincubadas por mais 30 minutos e analisadas por citometria de fluxo no filtro verde. Foram utilizados três marcadores para distinção da percentagem de células com  $\Delta\Psi_m$  alterado (intensidade baixa de fluorescência: 0 a ~ 40), normal (intensidade de ~40 a ~500) e hiperpolarizado (~500 a 10.000).

### *Detecção da externalização de fosfatidilserina na membrana celular*

A translocação da fosfatidilserina (PS), um fosfolípídeo normalmente localizado na face interna da membrana plasmática, para a face externa da célula é um evento associado aos primeiros estágios do processo de apoptose. Este ensaio permite diferenciar células viáveis, apoptóticas e necróticas pela coloração diferencial por fluorescência. Anexina-V é uma proteína com alta afinidade por PS e que, conjugada à ficoetrina (PE), emite fluorescência verde quando ligada, distinguindo, assim, as células em apoptose. O corante 7-AAD penetra as membranas celulares desintegradas e se liga

ao núcleo, emitindo fluorescência vermelha. A estratégia da coloração dupla fornecida pelo reagente Guava® Nexin permite a identificação de 4 populações distintas: células sem marcação são consideradas normais (ou viáveis); células com coloração verde são tidas como em apoptose inicial; células vermelhas são necróticas; e células reconhecidas pelos dois corantes são entendida como em apoptose tardia, pois, nos estágios finais, as membranas das células apoptóticas perdem a integridade.

Células da linhagem HL-60 foram incubadas por 24, 48 ou 72 h com 40 ou 80ng/mL **I/II** ou 100 ou 200ng/mL STP. Doxorrubicina 50ng/mL foi utilizada como o controle positivo do experimento. Uma alíquota de 50µL da suspensão de células tratadas ou não foi adicionada a 50µL da solução do kit Guava® Nexin (Guava Technologies). Após 20 minutos de incubação no escuro, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo com os filtros vermelho e verde.

#### *Análise dos dados*

Os dados foram adquiridos no programa Guava® Express Plus (Guava Technologies) e analisados a partir da média e do erro padrão da média de pelo menos 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) unimodal seguida por teste de Dunnett, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), usando o programa Graph Pad Prism 5.0.

#### 2.4.2. Análise morfológica – coloração diferencial por H/E

A técnica de coloração por hematoxilina e eosina (H/E) permite diferenciar o citoplasma do núcleo, possibilitando, assim, a análise de algumas estruturas celulares. A análise morfológica das células tratadas permite identificar alterações que possam estar ocorrendo e fornecer subsídios para sugerir o mecanismo de ação da droga. A hematoxilina é um corante basofílico que tem afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo numa cor lilás. A eosina, ao contrário, liga-se ao citoplasma conferindo-lhe uma coloração rósea.

As células HL-60 foram tratadas com 40 ou 80ng/mL **I/II** por 72h. Nos intervalos de 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h, uma alíquota da suspensão de células submetidas a

cada um dos tratamentos, assim como das células não tratadas, foi centrifugada (Shandon Southern Products Ltd., modelo Shandon Southern Cytospin) em lâmina de vidro e deixadas para secar por aproximadamente 2h. As células foram fixadas em MeOH 100%, lavadas com dH<sub>2</sub>O e coradas com hematoxilina 0,1% (Newproo) e, em seguida, por eosina 0,5% (Vetec, preparada como descrito no Anexo I).

#### *Análise dos dados*

As lâminas controle e tratadas foram levadas ao microscópico (Olympus, modelo BX41) para a avaliação de suas características morfológicas e fotografadas (câmara Olympus, modelo C-7070) para apresentação. As células foram julgadas, principalmente, quanto ao tamanho, relação núcleo/citoplasma, contorno das membranas celulares, presença de vacúolos, condensação, fragmentação e localização da cromatina nuclear e presença de figuras mitóticas.

#### 2.4.3. Teste do cometa

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 motitoramento de efeitos induzidos por radiação ou substâncias químicas (Hartmann *et al.*, 2003).

Existem dois protocolos principais para a execução deste teste (Ostling & Johanson, 1984; Singh *et al.*, 1988; Olive, 1989). 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 natureza, como quebras de fita simples e duplas, sítios álcali-lábeis, sítios de reparo por excisão incompletos 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.

O presente estudo utilizou-se do teste do cometa neutro para avaliar a indução de danos em DNA de dupla-fita de células HL-60 expostas a 40 ou 80ng/mL de I/II por 24, 48 ou 72h.

### *Preparo das lâminas*

As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (Gibco) diluída a 0,5% em solução de PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  à temperatura de 60°C e mantidas em temperatura ambiente até completa solidificação. As células HL-60 controle ou tratadas com 40 ou 80ng/mL **I/II** por 24, 48 ou 72h 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 (como descrito no Anexo I) 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 (descrito no Anexo I) a 4°C. As lâminas repousaram por 60 minutos para permitir o relaxamento do DNA. 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 20µg/mL. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência e classificadas de acordo com os escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (figura 18). Foram contados 100 cometas por lâmina e atribuídos, por análise visual, a uma das cinco categorias - sem dano, baixo nível de dano, médio nível de dano, alto nível de dano e dano máximo - que relacionam a

percentagem de DNA na cauda do cometa ao grau da lesão sofrida pela célula (Lovell *et al.*, 1999).



**Figura 18** - Tipos de cometa e classificação por categoria de dano: 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 percentagem 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) unimodal seguida por teste de Dunnett, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), usando o programa Graph Pad Prism 5.0.

#### 2.4.4. Western blot

Western blot ou, alternativamente, imunoblot, é uma técnica amplamente empregada para detectar uma determinada proteína numa dada amostra, por exemplo, de homogenato celular total. Neste estudo, esta metodologia foi utilizada para verificar a expressão aumentada ou diminuída de proteínas-chave associadas ao ciclo celular e a vias de sinalização celular relacionadas ao dano e reparo de DNA e à apoptose.

O protocolo de Western blot é realizado em diversas etapas onde constam: a extração e posterior quantificação de proteínas totais das células submetidas a cada tratamento, a separação das proteínas desnaturadas de acordo com o peso molecular em eletroforese vertical de poliacrilamida, a eletrotransferência das proteínas na disposição em que separaram no gel para uma membrana com capacidade de ligar proteínas e a detecção da proteína específica através de sondas do anticorpo respectivo, que será posteriormente revelado, nesse caso, de modo colorimétrico, baseado na reação da enzima fosfatase alcalina sobre o substrato NBT/BCIP produzindo um precipitado púrpura que marca a membrana (adaptado do método original de Towbin *et al.*, 1979).

Os experimentos de western blot empregaram os seguintes anticorpos primários: Cdc2p34 (Cdk 1), Cdk 2, ciclina A e ciclina B1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); p-Cdc25C (Ser216), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser296), p-Histona H2A.X (Ser139), pro-caspase-3, caspase-3 clivada (Asp175), pro-caspase-7, caspase-7 clivada (Asp198), pro-caspase-9, caspase-9 clivada (Asp330), PARP e PARP clivado (Asp214) (Cell Signalling). A marcação com  $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) foi usada como referência experimental. Os anticorpos secundários anti-mouse IGg (Cell Signalling) e anti-rabbit IGg (Cell Signalling) ligados à enzima fosfatase alcalina foram utilizados na etapa de detecção.

#### *Extração de proteínas*

Células HL-60 tratadas com I/II 40 ou 80ng/mL foram incubadas por 24, 48 ou 72h antes da extração de proteínas totais. Inicialmente, as células foram centrifugadas e o *pellet* foi lavado 2 vezes com PBS. O sobrenadante foi descartado e, às células, foi adicionado o tampão RIPA *Lysis Buffer* (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 1X acrescido de um coquetel de inibidores de proteases (1:100 v/v), ortovanadato de sódio (1:100 v/v) e PMSF (1:100 v/v), e deixadas em gelo por 1h30, sonicando as amostras a cada 30 minutos. Foi utilizada a proporção aproximada de 1mL de tampão RIPA completo para cada  $10^7$  células. Ao final da incubação, as amostras foram centrifugadas (Hettich, modelo Rotina 380) a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, aliquotado e armazenado a -20°C.

### *Quantificação de proteínas*

A quantificação do extrato total de proteínas foi realizada por método colorimétrico similar à dosagem proposto por Lowry *et al.*, 1951, valendo-se do kit DC *Protein Assay* (BioRad Laboratories) e executado como descrito pelo fabricante em microplacas de 96 cavidades. Uma curva padrão com BSA (1 – 10µg; Sigma) diluído em tampão RIPA completo foi preparada para a calibração do método. O tampão RIPA completo foi utilizado para marcar o branco experimental. Em seguida, 5µL de cada amostra foi plaqueado em duplicatas e adicionado 25µL do reagente A' (preparado a partir da adição de 20µL do reagente S a cada 1mL do reagente A) seguido por 200µL do reagente B. As amostras foram incubadas por 10 minutos, sob agitação leve e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620nm.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada frente à curva gerada pelo BSA, tendo sido plotado o gráfico absorbância vs. quantidade de proteínas. A curva foi gerada a partir de regressão linear no programa GraphPad Prism 5.0 e os valores de absorbância obtidos para cada amostra foram substituídas na equação da curva para determinar as respectivas concentrações de proteína.

### *Eletroforese em gel de poliacrilamida*

Para a separação das proteínas do extrato total baseado no peso molecular, as amostras foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida descontínuo (Laemmli, 1970, com modificações). Após a montagem do sistema vertical (Amershan Biosciences, modelo miniVE completo) o gel de resolução foi confeccionado para uma concentração final de 12,5% ou 7,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8. O gel de concentração foi montado sobre este, com 5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8. O detalhamento das soluções utilizadas e o preparo dos géis estão apresentados no Anexo I.

De cada amostra, 15µg de proteína total carregada com o tampão *Blue Juice 5X* (5:1 v/v; Invitrogen) foi aplicado nos poços do gel de concentração. O marcador de peso molecular *Full-Range Rainbow Marker* (12 – 225 kDa; GE Healthcare) foi usado sempre no primeiro poço à esquerda para monitorar a separação das proteínas. A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100 V e 30 mA (para duas placas; fonte elétrica Amershan Biosciences, modelo ES301) à temperatura ambiente,

utilizando o tampão de corrida para eletroforese (detalhado no Anexo I). O tempo de corrida variou entre 2h e 2h30.

#### *Eletrotransferência*

As proteínas separadas foram transferidas para membrana de PVDF Hybond-P (GE Healthcare). Para tanto, o gel foi colocado em contato com a membrana previamente lavada em MeOH entre esponjas e papéis de filtro banhados na solução de transferência (detalhado no Anexo I). A eletrotransferência foi realizada pelo modo de imersão (Amershan Bioscience, blot module para miniVE) à voltagem constante de 100 V e 300 mA por 1h20 a 4 °C (fonte elétrica Amershan Biosciences, modelo ES301).

#### *Imunodeteção*

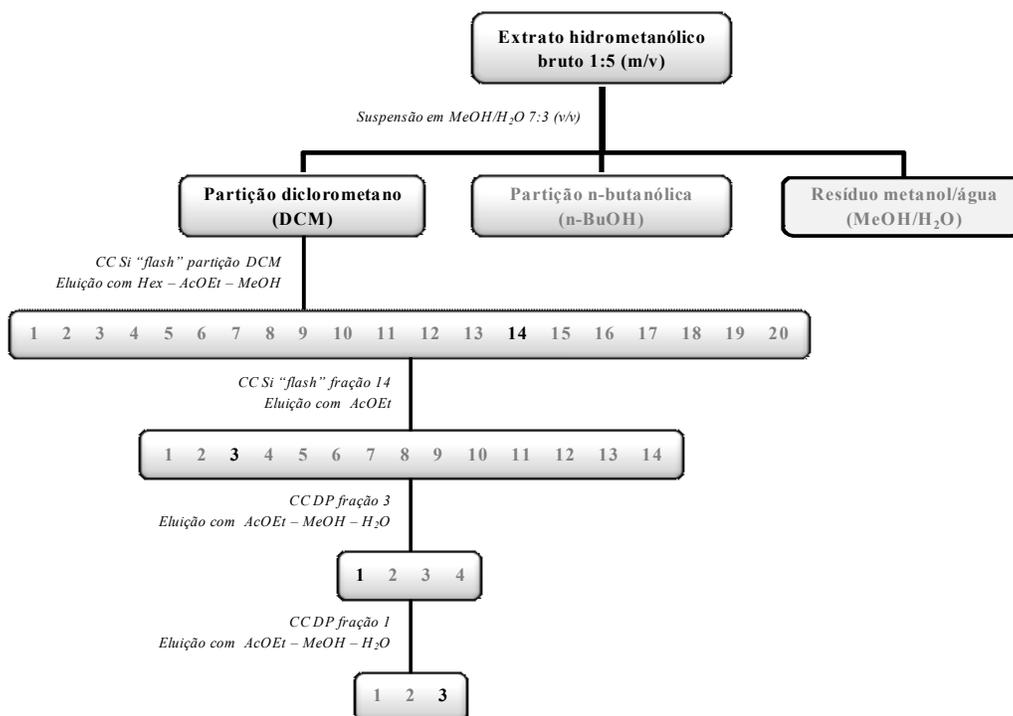
Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 1h em solução de BSA 3% em TBS. Em seguida, foram lavadas (3 vezes, 10 minutos cada lavagem) com TBS-Tween 0,05% (TBS-T) e incubadas sob agitação *overnight* a 4 °C com o anticorpo primário diluído em solução de BSA 5% em TBS-T. Após lavagem com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

#### *Análise dos dados*

A documentação das membranas reveladas foi realizada em captador de imagens (GE Healthcare, modelo ImageQuant® 300) utilizando, para aquisição e edição, o programa ImageQuant® 300 (GE Healthcare).

### 1. Fracionamento Bioguiado

O fracionamento do extrato hidrometanólico bruto de *Eudistoma vannamei* foi guiado pela atividade citotóxica das amostras obtidas e resolvido como esquematizado na figura 19, abaixo. Um detalhamento pormenorizado da massa de cada uma das partições e frações obtidas, assim como o solvente de eluição e reunião das amostras está apresentado no Anexo II – Fracionamento Químico.



**Figura 19** – Esquema do fracionamento bioguiado resolvido pelo extrato bruto de *Eudistoma vannamei*.

A partir de 8,81 kg de material úmido obteve-se 351,8 g de extrato bruto (EHA) que foi submetido ao ensaio do MTT para avaliação da sua atividade antiproliferativa sobre células tumorais em cultura, assim mostrado na tabela 4.

**Tabela 4:** Atividade citotóxica *in vitro* do extrato hidroalcoólico bruto de *Eudistoma vannamei* em 3 linhagens tumorais avaliadas pelo ensaio do MTT, 72 h. IC<sub>50</sub> e CI 95% (µg/mL) obtidas a partir da média e respectivos E.P.M. de 2 experimentos independentes em duplicata determinadas por regressão não-linear gerado no programa GraphPad Prism 5.0.

Amostra	HL-60	HCT-8	MDA MB-435
<b>EHA Bruto <i>E. vannamei</i></b>	<b>3.86</b> 2.69 - 5.54	<b>4.14</b> 3.18 - 5.40	<b>7.82</b> 5.39 - 11.34

Do processamento inicial do extrato bruto decorreram três partições distintas: diclorometano (**DCM**), n-butanol (**n-BuOH**) e o resíduo hidroalcoólico (**MeOH/H<sub>2</sub>O**). O resultado da atividade antiproliferativa das três partições está apresentado da tabela 5, mostrando que a atividade da partição **DCM**, em destaque, foi cerca de 10 vezes mais potente que aquela da partição **n-BuOH**, enquanto que o resíduo **MeOH/H<sub>2</sub>O** não apresentou citotoxicidade significativa na concentração máxima testada (50µg/mL).

**Tabela 5:** Atividade citotóxica *in vitro* das partições do extrato hidroalcoólico bruto de *Eudistoma vannamei* em 3 linhagens tumorais avaliadas pelo ensaio do MTT, 72 h. IC<sub>50</sub> e CI 95% (µg/mL) obtidas a partir da média e respectivos E.P.M. de 2 experimentos independentes em duplicata determinadas por regressão não-linear gerado no programa GraphPad Prism 5.0.

Amostra	HL-60	HCT-8	MDA MB-435
<b>Partição DCM</b>	<b>2.92</b> 0.68 - 12.48	<b>3.07</b> 2.78 - 3.38	<b>2.34</b> 2.23 - 2.47
<b>Partição n-BuOH</b>	25.78 14.81 - 44.89	29.77 18.62 - 47.58	23.20 16.10 - 33.45
<b>Resíduo MeOH/H<sub>2</sub>O</b>	> 50,00	> 50,00	> 50,00

A fase DCM, determinada como a mais ativa pelo ensaio do MTT, foi fracionada em coluna de sílica eluída com os solventes Hex, AcOEt e MeOH em mistura de polaridade crescente (vide Anexo II). As 257 frações obtidas foram comparadas por CCDC e reunidas em 20 frações nomeadas **DCM 1** à **DCM 20** (vide

Anexo II) e submetidas ao ensaio do MTT em uma única concentração, 10 µg/mL. O resultado está mostrado a seguir, na tabela 6.

**Tabela 6:** Atividade citotóxica *in vitro* do tratamento com 10µg/mL de cada fração obtida da partição DCM em 3 linhagens tumorais avaliadas pelo ensaio do MTT, 72 h. Inibição média da proliferação celular (%) e respectivos E.P.M. obtidas a partir da média de 2 experimentos independentes em duplicata calculadas no programa GraphPad Prism 5.0.

Amostra	HL-60		HCT-8		MDA MB-435	
	Inibição média (%)	EPM	Inibição média (%)	EPM	Inibição média (%)	EPM
DCM 1	-30.87	3.34	-0,40	1.91	11,57	3.74
DCM 2	-15.28	11.10	2,95	3.71	9,94	2.53
DCM 3	66.90	12.48	59,07	11.48	15,71	5.69
DCM 4	-17.39	5.54	42,56	3.48	2,616	4.05
DCM 5	-28.93	7.24	8,56	1.59	12,76	1.52
DCM 6	-12.77	6.38	5,53	3.69	26,54	2.73
DCM 7	24.95	16.26	76,99	17.09	63,78	18.77
DCM 8	40.58	10.57	69,28	1.31	39,55	3.342
DCM 9	81.01	12.54	89,16	3.02	69,97	8.041
DCM 10	78.30	10.51	86,71	3.90	66,48	9.59
DCM 11	<b>100.64</b>	<b>0.93</b>	<b>100,79</b>	<b>0.68</b>	<b>88,32</b>	<b>1.20</b>
DCM 12	<b>98.62</b>	<b>0.76</b>	<b>99,44</b>	<b>1.01</b>	<b>94,97</b>	<b>1.03</b>
DCM 13	<b>100.11</b>	<b>0.49</b>	<b>101,21</b>	<b>0.27</b>	<b>96,38</b>	<b>2.51</b>
DCM 14	<b>99.69</b>	<b>0.97</b>	<b>101,26</b>	<b>0.44</b>	<b>97,15</b>	<b>1.35</b>
DCM 15	<b>99.70</b>	<b>0.09</b>	<b>99,13</b>	<b>0.72</b>	<b>98,11</b>	<b>0.68</b>
DCM 16	<b>97.79</b>	<b>0.17</b>	<b>97,01</b>	<b>1.99</b>	<b>96,09</b>	<b>0.88</b>
DCM 17	<b>96.76</b>	<b>1.19</b>	<b>81,39</b>	<b>1.54</b>	<b>54,63</b>	<b>2.31</b>
DCM 18	<b>94.61</b>	<b>1.60</b>	<b>86,77</b>	<b>2.64</b>	<b>49,07</b>	<b>3.67</b>
DCM 19	74.75	4.46	82,87	5.57	47,50	4.77
DCM 20	N.T.	-	N.T.	-	N.T.	-

As frações em destaque na tabela 6 – **DCM 11** à **DCM 18** - tiveram um efeito inibitório sobre o crescimento das células superior a 80% e, assim, foram submetidas novamente ao ensaio do MTT, dessa vez utilizando diluições em série a fim de se obter as suas  $IC_{50}$ , como mostrado na tabela 7.

**Tabela 7:** Atividade citotóxica *in vitro* das frações 11 a 18 obtidas da partição DCM em 3 linhagens tumorais avaliadas pelo ensaio do MTT, 72 h.  $IC_{50}$  e CI 95% ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtidas a partir da média e respectivos E.P.M. de 2 experimentos independentes em duplicata determinadas por regressão não-linear gerada no programa GraphPad Prism 5.0.

Amostra	HL-60	HCT-8	MDA MB-435
<b>DCM 11</b>	N.D.	1.72 0.99 - 2.98	0.78 0.62 – 1.00
<b>DCM 12</b>	<b>0.36</b> 0.29 - 0.44	<b>0.60</b> 0.45 - 0.79	<b>0.23</b> 0.19 – 0.28
<b>DCM 13</b>	<b>0.50</b> 0.30 – 0.81	<b>1.19</b> 0.82 - 1.71	<b>0.55</b> 0.42 - 0.73
<b>DCM 14</b>	<b>0.65</b> 0.17 - 2.51	<b>0.68</b> 0.62 - 0.74	<b>0.37</b> 0.33 – 0.41
<b>DCM 15</b>	<b>0.15</b> 0.13 – 0.17	<b>0.24</b> 0.23 - 0.25	<b>0.15</b> 0.13 – 0.18
<b>DCM 16</b>	<b>0.15</b> 0.07 - 0.31	<b>0.55</b> 0.51 - 0.59	<b>0.43</b> 0.33 – 0.58
<b>DCM 17</b>	1.36 0.51 - 3.65	3.96 2.51 - 6.24	2.85 1.94 – 4.19
<b>DCM 18</b>	4.22 3.60 - 4.95	2.80 1.45 - 5.38	1.37 0.87 - 2.20

As frações em destaque na tabela 7 – **DCM 12** à **DCM 16** – apresentaram as mais baixas  $IC_{50}$ , cerca de 10 vezes menor quando comparada às outras frações e, portanto, atividade biológica mais atraente. Essas frações foram submetidas a processos sequenciais de separação, sempre guiado pela atividade biológica das sub-frações resultantes.

A fração **DCM 12**, por CCDP, separou 9 bandas (sub-frações) e mais a origem, assim denominadas: DCM 12.1 a DCM 12.9 e o que ficou na origem foi chamado de DCM 12.0. A fração **DCM 13** separou 7 bandas, DCM 13.1 à DCM 13.7 e mais a banda DCM 13.0, retida na origem. A fração **DCM 15** foi alíquotada e processada duas vezes,

separando, igualmente, 9 bandas, DCM 15.1 à DCM 15.9, e mais a banda DCM 15.0. A fração **DCM 16** separou 8 bandas, DCM 16.1 à DCM 16.8, e mais DCM 16.0. A fração **DCM 14** foi submetida a uma coluna cromatográfica para a sua separação, originando, ao final, 14 sub-frações nomeadas DCM 14.1 à DCM 14.14. A massa de cada uma das 61 sub-frações obtidas está descrita no Anexo II.

Todas as sub-frações obtidas do processamento das frações DCM 12 à DCM 16 foram avaliadas pelo ensaio do MTT em duas concentrações, 1µg/mL e 0,1µg/mL. As sub-frações **DCM 12.7**, **DCM 13.5**, **DCM 14.3**, **DCM 15.6**, **DCM 15.7** e **DCM 16.6** apresentaram inibição da proliferação celular superior a 80% na maior concentração testada (1µg/mL). Entretanto, apenas a fração **DCM 14.3** apresentou inibição superior a 50% na menor concentração testada (0,1µg/mL). Para essa fração, a IC<sub>50</sub> foi calculada, obtendo-se valores na ordem de ng/mL, e estão apresentadas na tabela 8, a seguir.

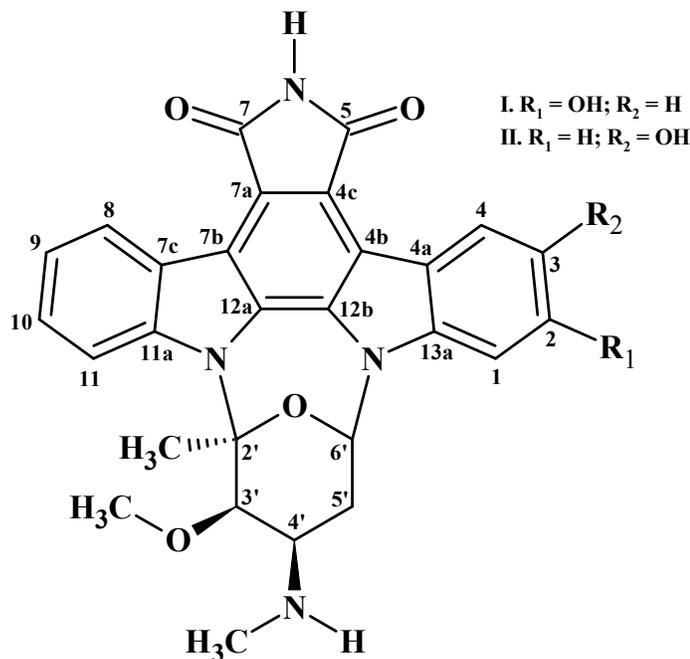
**Tabela 8:** Atividade citotóxica *in vitro* da sub-fração DCM 14.3 em 4 linhagens tumorais avaliadas pelo ensaio do MTT, 72 h. IC<sub>50</sub> e CI 95% (ng/mL) obtidas a partir da média e respectivos E.P.M. de pelo menos 2 experimentos independentes em duplicata determinadas por regressão não-linear gerada no programa GraphPad Prism 5.0.

Amostra	HL-60	HCT-8	MDA MB-435	SF 295
<b>DCM 14.3</b>	25.59 23.56 - 27.79	34.90 29.21 - 41.70	27.53 24.11 - 31.44	37.39 33.26 - 42.03

A sub-fração **DCM 14.3** foi submetida a duas CCDP bioguiadas, originando a sub-fração **DCM 14.3.1.3**, rendendo 5mg de massa. Esta amostra foi submetida novamente ao ensaio de MTT para a obtenção da IC<sub>50</sub> em diversas linhagens celulares (resultados mostrados na tabela 9, p. 52).

## 2. Determinação Estrutural

Os espectros obtidos das análises de IV, RNM e MS pareados aos dados previamente publicados na literatura especializada indicaram que a sub-fração **DCM 14.3.1.3** é uma mistura 1:1 de dois alcalóides homólogos (figura 20). As duas moléculas, que atendem por 2-hidroxi-7-oxoestaurosporina (**I**) e 3-hidroxi-7-oxoestaurosporina (**II**), são integrantes inéditos do grupo das estaurosporinas, sendo a mistura doravante referida por **I/II**. A elucidação das estruturas das moléculas em mistura está apoiada na interpretação dos dados gerados oferecida pelos Doutores Norberto Peporine Lopes, professor titular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, e Edilberto Rocha Silveira, professor titular do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. Os passos seguidos para a determinação estrutural, juntamente com os espectros relevantes e literatura de base, estão incluídos no Anexo III – Elucidação Estrutural.



**Figura 20** – Estruturas sugeridas para as duas moléculas em mistura da sub-fração DCM 14.3.1.3, 2-hidroxi-7-oxoestaurosporina (**I**, R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = H) e 3-hidroxi-7-oxoestaurosporina (**II**, R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH). A sugestão foi baseada em análises de ESIMS ( $M^+ + 1 = 487$ ) e RNM 2D, particularmente por HSQC e HMBC (500/125 MHz, Pyr- $d_5$ ), e por comparação com dados da literatura.

### 3. Avaliação da Atividade Biológica

#### 3.1. Estudo da Citotoxicidade *in vitro*

A IC<sub>50</sub> de **I/II** foi determinada para diversas linhagens celulares e comparadas à STP. **I/II** apresentou-se bastante ativa, com IC<sub>50</sub> na grandeza de ng/mL, podendo ser até 10 vezes mais potente que STP, variando com a linhagem testada. Vale destacar o efeito sobre PBMC, o modelo de células normais adotado, em que **I/II** e STP mostraram IC<sub>50</sub> comparáveis, respectivamente de 341,6 e 366,0 ng/mL (tabela 9).

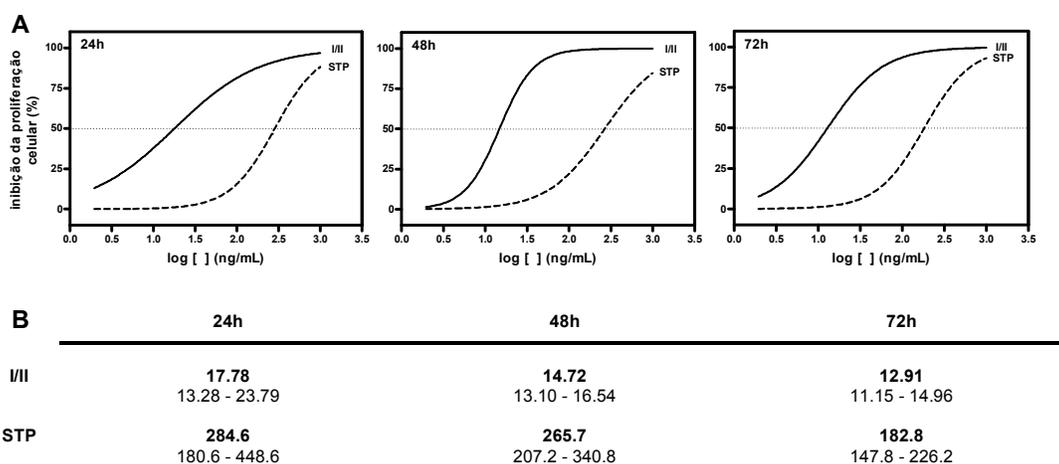
**Tabela 9:** Atividade citotóxica de **I/II** e STP em diversas linhagens celulares e em PBMC avaliada por MTT ou AlamarBlue, 72h. IC<sub>50</sub> e CI 95% (ng/mL) obtidas a partir da média e respectivos E.P.M. de 2 experimentos em duplicata determinadas por regressão não-linear no programa GraphPad Prism 5.0.

Linhagem celular	I/II	STP
	IC <sub>50</sub> CI 95% (ng/mL)	IC <sub>50</sub> CI 95% (ng/mL)
<b>HL-60</b>	<b>12.91</b> 11.15 - 14.96	<b>182.80</b> 147.80 - 226.20
<b>Molt-4</b>	<b>9.27</b> 7.94 - 10.81	<b>72.08</b> 59.77 - 86.93
<b>Jurkat</b>	<b>5.14</b> 3.54 - 7.46	<b>39.17</b> 23.97 - 64.03
<b>K562</b>	<b>71.83</b> 51.65 - 99.90	<b>914.80</b> N.C.
<b>HCT-8</b>	<b>28.96</b> 25.34 - 33.10	<b>39.11</b> 30.99 - 49.36
<b>SF 295</b>	<b>28.79</b> 23.42 - 35.38	<b>265.70</b> 207.20 - 340.70
<b>PC3</b>	59.37 46.86 - 75.21	-
<b>DU 145</b>	145.2 90.21 to 233.60	-
<b>MX 1</b>	14.11 10.69 - 18.62	-
<b>MDA 231</b>	3.35 2.63 - 4.27	-
<b>MDA MB 435</b>	<b>14.26</b> 12.75 - 15.94	<b>100.50</b> 71.68 - 140.80
<b>B 16</b>	37.20 29.15 - 47.47	-
<b>J774</b>	17.61 12.55 - 24.71	-
<b>L929</b>	129.10 100.10 - 166.60	-
<b>PBMC</b>	<b>341.60</b> 225.00 - 518.80	<b>366.00</b> 264.50 - 506.60

### 3.2. Efeitos sobre Células HL-60

#### 3.2.1. Curva concentração-efeito

Inicialmente, foi determinada a  $IC_{50}$  de **I/II** e STP para células HL-60 em cultura após 24, 48 e 72h. **I/II** apresentou-se entre 14 e 18 vezes mais potente que STP, variando quanto ao tempo de incubação. Na figura 21, abaixo, estão comparadas as curvas concentração-efeito e respectivas  $IC_{50}$  e CI 95% para **I/II** e STP nos diferentes tempos de tratamento, assim determinado pelo ensaio do MTT.



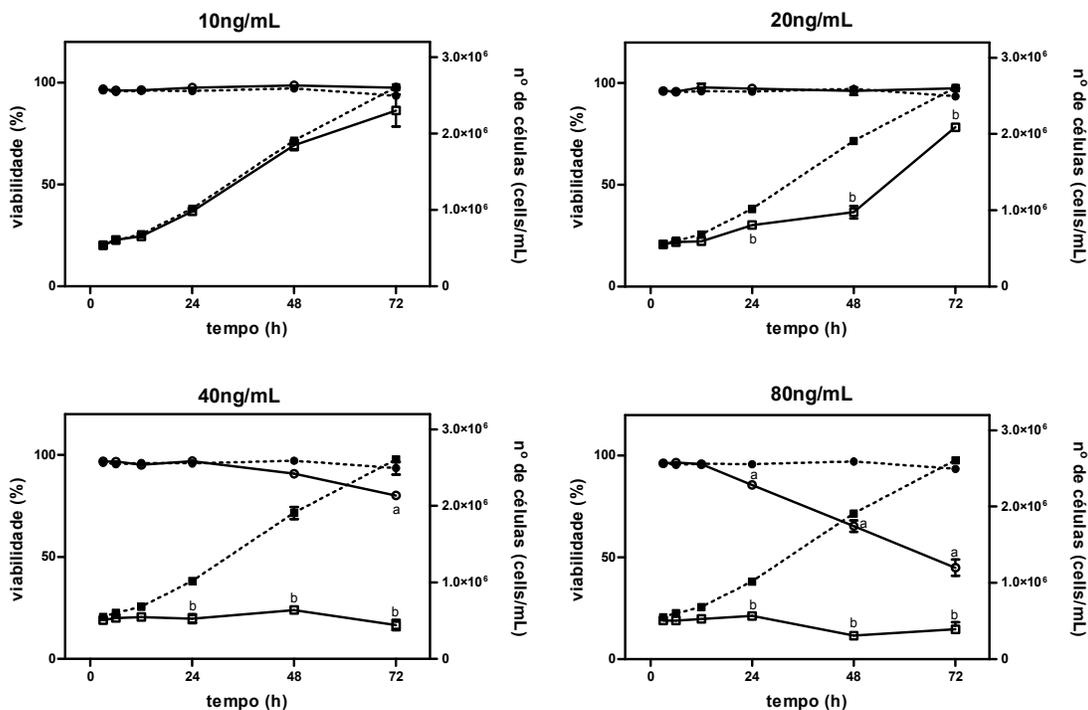
**Figura 21** – Curvas concentração-efeito de **I/II** (linha cheia) ou STP (linha descontinua) sobre células HL-60, avaliadas pelo ensaio do MTT em 24, 48 ou 72h (A).  $IC_{50}$  e CI 95% (ng/mL) de **I/II** ou STP sobre células HL-60, avaliadas pelo ensaio do MTT em 24, 48 ou 72h (B). Curvas,  $IC_{50}$  e CI 95% obtidas a partir da média e respectivos E.P.M. de 2 experimentos em duplicata determinadas por regressão não-linear no programa GraphPad Prism 5.0.

#### 3.2.2. Estudos por citometria de fluxo

##### *Viabilidade e número de células*

A cinética de crescimento das células HL-60 tratadas ou não com **I/II** foi determinada por um período de 72h. As culturas foram avaliadas quanto ao número e viabilidade das células, assim determinada pela integridade das suas membranas (figura 22). Os tratamentos com 10ng/mL e 20ng/mL tiveram pouco ou nenhum efeito sobre a curva de crescimento das células em relação ao controle. A 40ng/mL, **I/II** inibiu

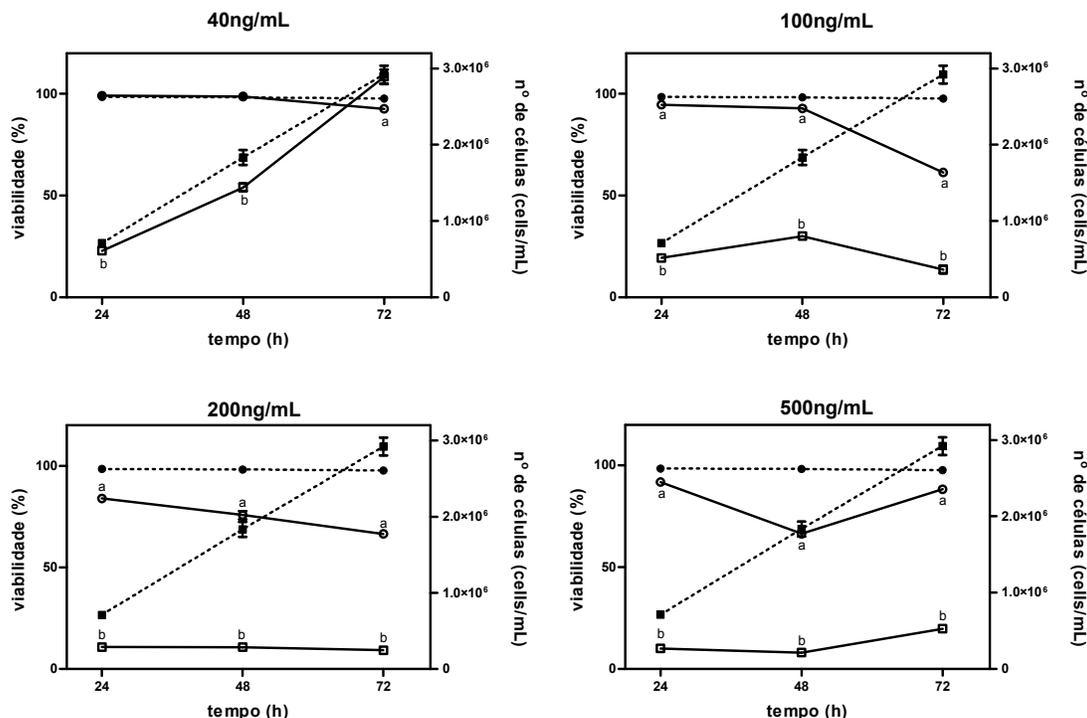
completamente a proliferação das células, sem, contudo, alterar significativamente a sua viabilidade antes da medição de 72h. A 80ng/mL, as células apresentaram diminuição significativa da viabilidade a partir de 24h, enquanto que a partir de 48h já se pode perceber um efeito tóxico sobre as células. Desse modo, as concentrações de 40ng/mL e 80ng/mL foram eleitas para seguir estudando, respectivamente, o efeito citostático e citotóxico de **I/II** sobre as células HL-60.



**Figura 22** – Curva de crescimento das células HL-60 tratadas com 10, 20, 40 e 80ng/mL **I/II**. Viabilidade e número de células determinada por citometria de fluxo. Os valores apresentados correspondem às médias (E.P.M.) de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata. Os histogramas foram adquiridos e quantificados no programa Guava Express Plus e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (● viabilidade de células controle; ■ número de células controle; ○ viabilidade de células tratadas com **I/II**; □ número de células tratadas com **I/II**).  $p > 0,05$  (a - significativo em relação ao controle para viabilidade; b - significativo em relação ao controle para número de células).

STP foi avaliada sob as mesmas condições em células HL-60 em cultura, como mostrado na figura 23. A 40ng/mL, STP mostrou um leve efeito sobre a proliferação das células. As outras concentrações testadas, 100, 200 e 500ng/mL mostram-se citotóxicas, reduzindo significativamente a viabilidade das células, em todos os casos, a partir de

24h de tratamento, sendo que com cinética de ação diferente. O número de células viáveis quantificadas, entretanto, variou pouco desde o plaqueamento inicial até o final do tempo de incubação (72h).



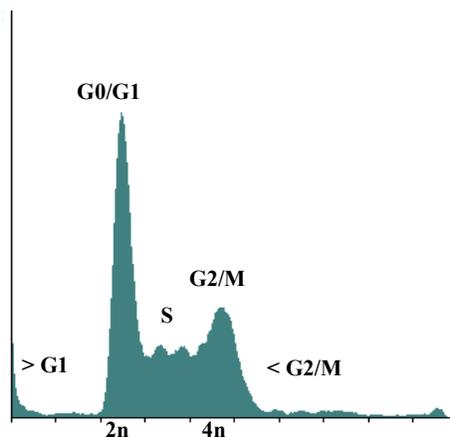
**Figura 23** – Curva de crescimento das células HL-60 tratadas com 40, 100, 200 e 500ng/mL STP. Viabilidade e número de células determinada por citometria de fluxo. Os valores apresentados correspondem às médias (E.P.M.) de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata. Os histogramas foram adquiridos e quantificados no programa Guava Express Plus e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. (● viabilidade de células controle; ■ número de células controle; ○ viabilidade de células tratadas com STP; □ número de células tratadas com STP).  $p > 0,05$  (a - significativo em relação ao controle para viabilidade; b - significativo em relação ao controle para número de células).

#### *Conteúdo de DNA nuclear: ciclo celular e fragmentação internucleossomal*

Para crescer e se multiplicar, a célula deve seguir numa sucessão de eventos orquestrados, até resultar em duas células-filhas idênticas e perfeitas, caracterizando o ciclo celular. O ciclo celular é dividido em 4 fases - G1, S, G2 e M -, além da fase G0, onde estacionam as células quiescentes, fora do processo de divisão. Durante a fase S ocorre a síntese de DNA e de algumas organelas celulares e na fase M ocorre a divisão do material duplicado para as duas novas células. As fases que antecedem a mitose (M), G1, S e G2, caracterizam o período da interfase. As fases M e S são intercaladas pelas

fases G1 e G2 (*Gap 1* e *Gap 2*, do inglês, intervalo), onde o sistema interno de controle da proliferação celular verifica se o ambiente encontra-se favorável à progressão do ciclo, se a célula tem um tamanho compatível à divisão em duas células e, em G2, se o DNA está replicado corretamente e intacto. No caso de ter-se detectado alguma circunstância desfavorável, o ciclo pode ser paralisado em algum dos pontos de checagem, que se encontram do limiar entre G1 e S e entre G2 e M, admitindo uma reavaliação das condições extra e intracelulares, o reparo de erros de replicação ou danos ao DNA e a decisão por prosseguir no ciclo ou eliminar a célula desfavorável.

A avaliação da distribuição das células em cada fase do ciclo celular num dado instante é oferecida pela determinação do conteúdo de DNA aferido por citometria de fluxo, onde a quantidade de fluorescência emitida por cada célula é diretamente proporcional à quantidade de DNA nuclear, sendo diplóide ( $2n$ ) em células em G1/G0, tetraplóide ( $4n$ ) em células G2 ou M e a fase S é caracterizada por conter algo entre  $2n$  e  $4n$  de DNA nuclear, como ilustrado na figura 24.



**Figura 24** – Distribuição das fases do ciclo celular como observado na análise por citometria de fluxo, destacando-se os picos de G0/G1 e G2/M, o platô em S e as células quantificadas em sub-G1 ( $> G1$ ) e super-G2/M ( $> G2/M$ ).

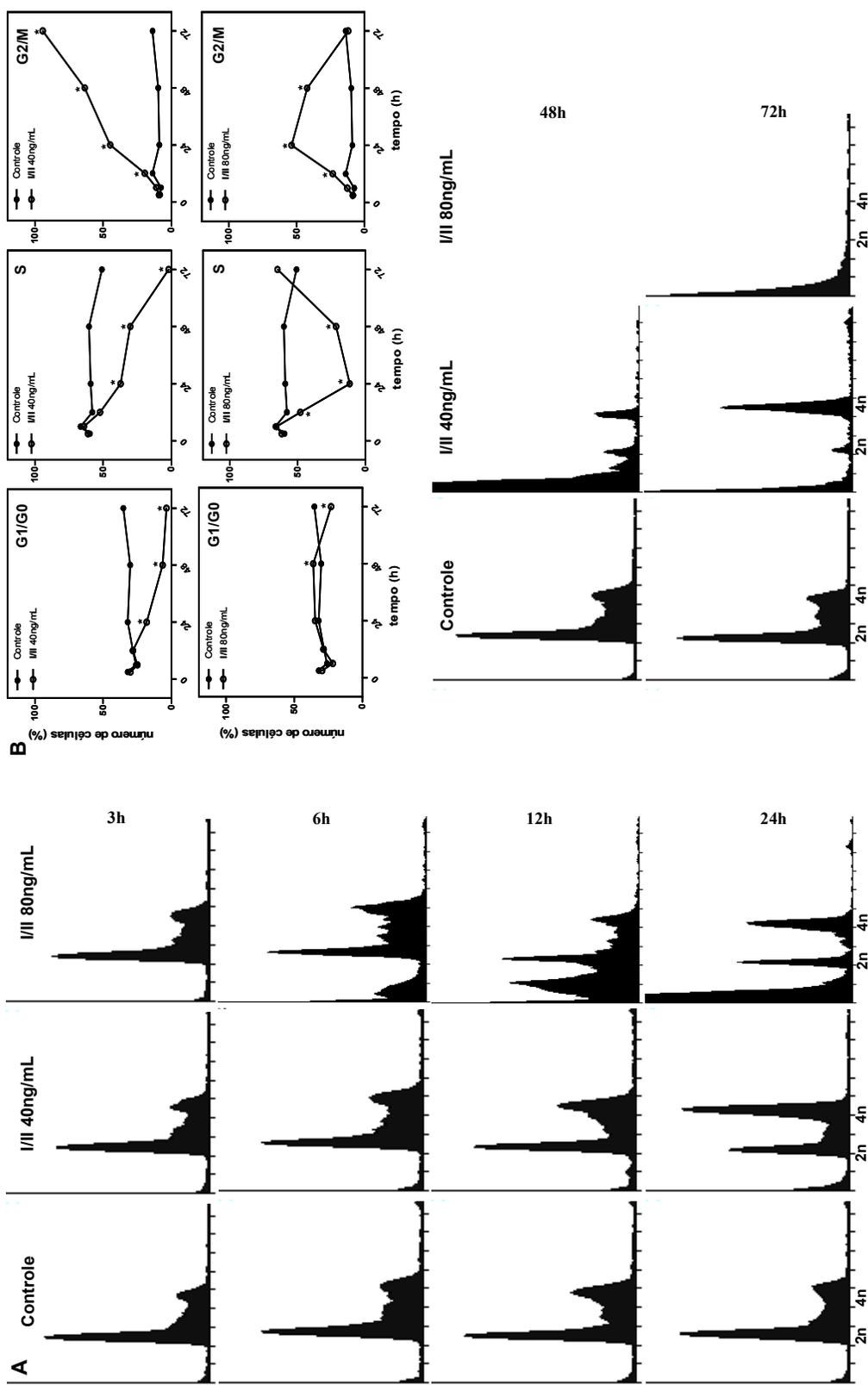
A atividade sobre o ciclo celular das células HL-60 foi avaliada para o tratamento de 40 e 80ng/mL com **I/II**, observando a distribuição das fases do ciclo ao longo de 72h horas de incubação (tabela 10). A concentração de 40ng/mL induziu um incremento cumulativo das células em G2/M (mostrado como o aumento do pico  $4n$ , figura 25 A) a partir de 24h, chegando a deter quase que a totalidade das células viáveis

(94,29%) ao final das 72h de tratamento. Ao passo que se verifica o aumento das células em G2/M, pode-se observar o decréscimo das células em G1/G0 e S (figura 25 B).

O tratamento com 80ng/mL induz pouca variação quanto à porcentagem de células viáveis em G1/G0 (tabela 10). Na fase S, um rápido decréscimo ocorre entre os períodos de 12 à 24h; a partir de então a porcentagem de células começa a aumentar até 72h, chegando a equalizar, praticamente, ao controle. A cinética da fase G2/M ocorre, de certo modo, inversa àquela observada para S, quando houve um rápido aumento das células em G2/M até 24h de tratamento, e uma rápida diminuição após este tempo, até 72h, onde a porcentagem das células viáveis em G2/M nivela-se ao valor do controle.

**Tabela 10:** Efeito de I/II (40 e 80ng/mL) sobre a distribuição das fases do ciclo celular em células HL-60 tratadas por 3, 6, 12, 24, 48 e 72h medido por citometria de fluxo. Os valores apresentados correspondem às médias (E.P.M.) de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata. Os histogramas obtidos no programa Guava Express Plus foram quantificados pelo programa ModFit LT 3.2 e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \*p < 0,05.

Tempo de tratamento	Concentração (ng/mL)	Distribuição das fases do ciclo celular (EPM) (%)		
		G1/G0	S	G2/M
3h	0	32.09 (0.58)	59.77 (0.12)	8.14 (0.70)
	40	29.93 (0.18)	61.04 (0.84)	9.02 (0.66)
	80	29.61 (0.58)	61.77 (0.07)	8.62 (0.51)
6h	0	25.92 (0.82)	66.57 (0.39)	7.50 (0.42)
	40	25.03 (0.94)	64.02 (0.29)	10.94 (1.23)
	80	21.74 (0.18)	65.73 (2.00)	12.52 (2.19)
12h	0	28.27 (1.06)	57.97 (1.45)	13.75 (0.39)
	40	28.26 (0.82)	52.30 (0.86)	<b>19.43*</b> (0.03)
	80	28.54 (2.50)	<b>48.05*</b> (2.24)	<b>23.40*</b> (4.74)
24h	0	32.01 (0.21)	59.17 (0.09)	8.81 (0.31)
	40	<b>18.10*</b> (1.42)	<b>37.13*</b> (2.13)	<b>44.75*</b> (0.71)
	80	34.63 (1.43)	<b>11.61*</b> (0.48)	<b>53.75*</b> (1.92)
48h	0	30.15 (0.45)	60.23 (0.76)	9.61 (0.31)
	40	<b>6.52*</b> (1.62)	<b>30.04*</b> (1.95)	<b>63.43*</b> (3.58)
	80	<b>36.13*</b> (9.66)	<b>21.64*</b> (1.21)	<b>42.22*</b> (8.44)
72h	0	35.23 (0.26)	50.98 (3.23)	13.78 (2.979)
	40	<b>3.61*</b> (1.40)	<b>2.10*</b> (1.74)	<b>94.29*</b> (0.34)
	80	<b>23.09*</b> (0.76)	64.94 (8.85)	11.97 (8.09)

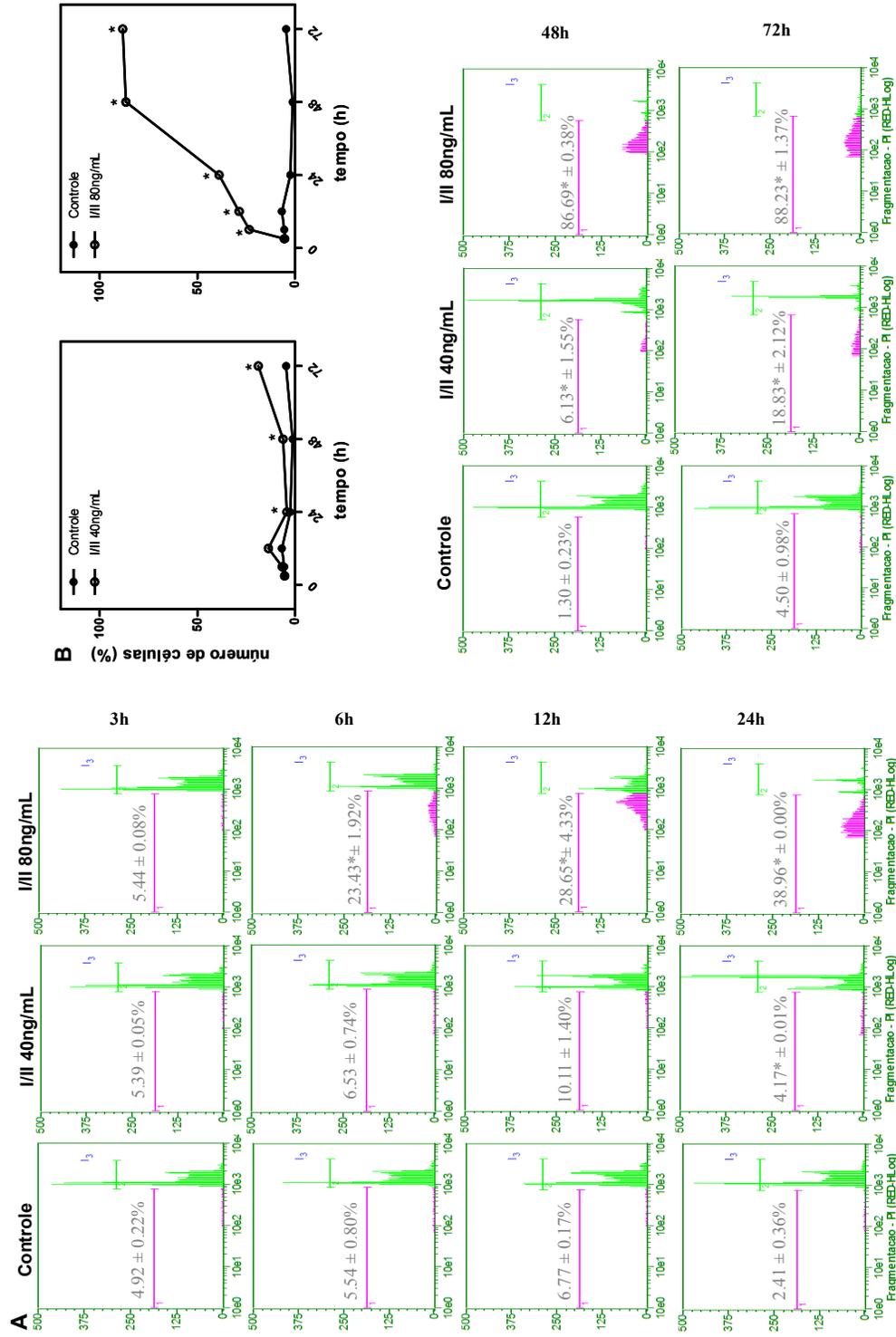


**Figura 25** – Efeito de I/II (40 e 80ng/mL) sobre a distribuição das fases do ciclo celular em células HL-60 tratadas por 3, 6, 12, 24, 48 e 72h medido por citometria de fluxo. Os histogramas obtidos no programa Guava Express Plus foram modelados pelo programa Cyflogic 1.2.1. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento (A). Efeito tempo-dependente de I/III (40 e 80ng/mL) sobre as fases do ciclo celular em HL-60. Os histogramas foram quantificados pelo programa ModFit LT 3.2 e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \*p > 0,05.

A região sub-G1 exemplificada no histograma da figura 24 ( $> G1$ ) refere-se à população de células que apresentam fragmentação de DNA internucleossomal. Essas células sub-diplóides, além de frequentemente apresentarem hipercondensação da cromatina, apresentam, ainda, menor quantidade de DNA devido à quebra e perda de material nuclear e, conseqüentemente, menor emissão de fluorescência, sendo assinaladas à esquerda do pico de G0/G1.

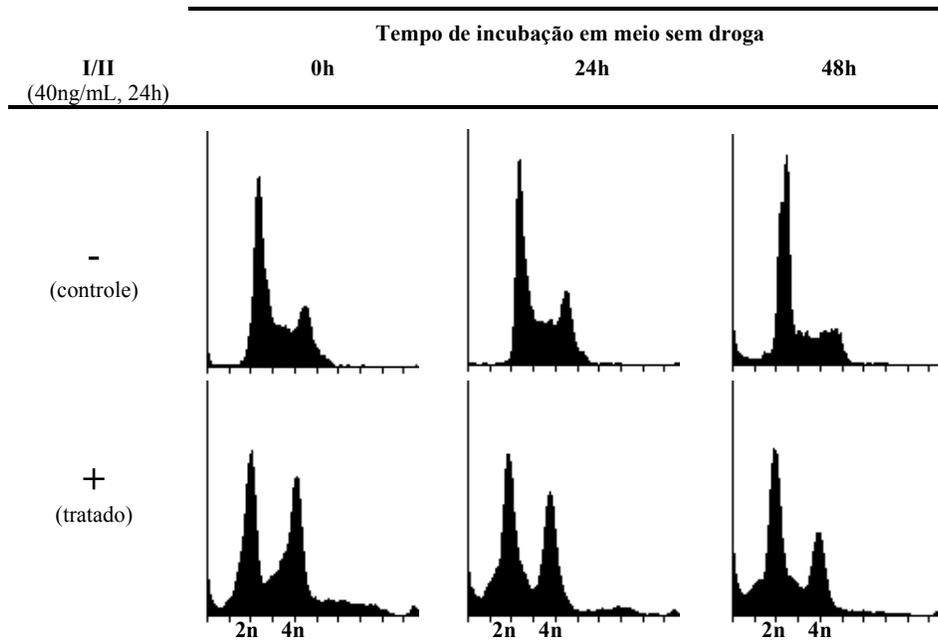
O marcador róseo dos histogramas da figura 26 A denota as células que apresentaram fragmentação internucleossomal, enquanto que o marcador verde revela as células com núcleo diplóide e tetraplóide. Na concentração de 80ng/mL, **I/II** induz fragmentação de DNA desde a análise de 6h, o que também pode ser observado com o incremento do pico sub-G1 nos histogramas de distribuição das fases do ciclo celular. Na figura 26 B, a potenciação tempo-dependente do efeito de 80ng/mL de **I/II** sobre a fragmentação de DNA é bastante evidente – assim como o aumento do pico sub-diplóide nos histogramas da figura 26 A -, chegando à quase 90% com 72h de tratamento.

A concentração de 40ng/mL induz pouca alteração na fragmentação de DNA em relação ao controle, podendo-se observar um efeito crescente, leve, porém significativo, nos tratamentos de 24 e 48h, sendo mais notório em 72h, com 18,83% de fragmentação (figura 26 A e B).



**Figura 26** – Efeito de I/II (40 e 80ng/mL) sobre a fragmentação internucleossomal de DNA em células HL-60 tratadas por 3, 6, 12, 24, 48 e 72h determinada por citometria de fluxo. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento (A). Efeito tempo-dependente de I/II (40 e 80ng/mL) sobre a fragmentação internucleossomal de DNA (B). Os valores apresentados correspondem às médias ± E.P.M. de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata no programa Guava Express Plus e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \*p > 0,05.

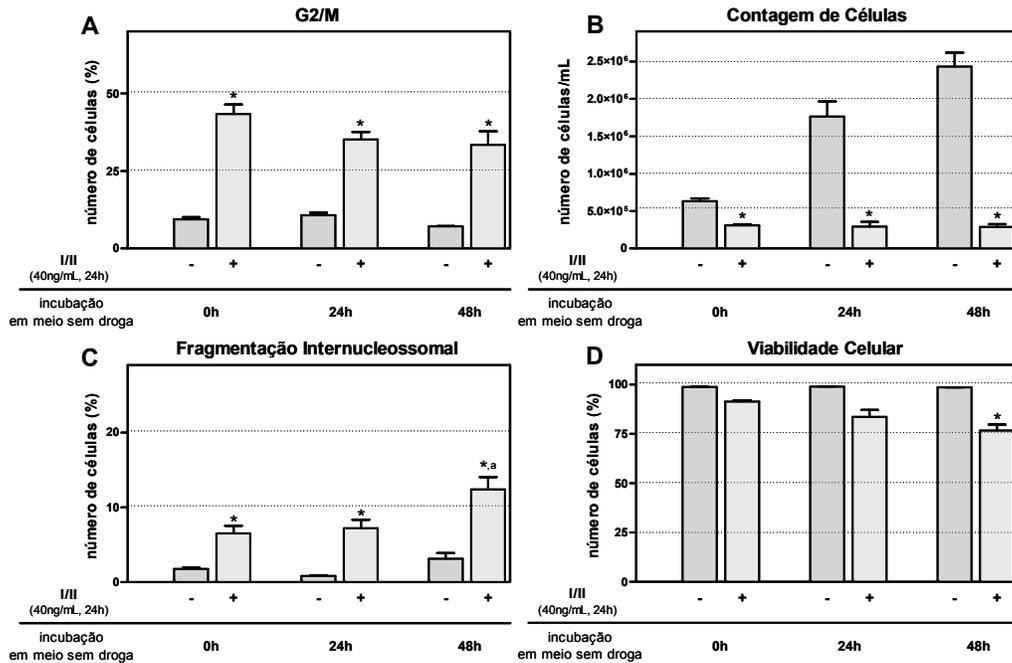
A reversibilidade do efeito citostático e sobre a parada em G2/M induzida por I/II em células HL-60 foi avaliado após tratamento com 40ng/mL durante 24h e reincubação das células por mais 24 ou 48h em meio livre da droga. Como mostrado na figura 27, o acúmulo de células no pico de G2/M pode ser observado até o final do período de análise, e assim se mantém constante, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos, mesmo após a remoção do estímulo (figura 28 A).



**Figura 27** – Avaliação do efeito de I/II (40ng/mL) sobre a distribuição das fases do ciclo celular em células HL-60 tratadas por 24h e reincubadas em meio livre da droga por mais 24 ou 48h e medido por citometria de fluxo. Os histogramas obtidos no programa Guava Express Plus foram modelados pelo programa Cyflogic 1.2.1. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento.

O número de células viáveis também permaneceu constante e muito próximo ao número de células plaqueadas inicialmente ( $0,3 \times 10^6$  células/mL), mesmo com a remoção do estímulo, variando significativamente apenas quando comparadas ao respectivo grupo controle, que manteve seu crescimento exponencial ao longo das 72h (figura 28 B). A viabilidade das células mostrou redução significativa apenas quando tratadas por 24h e reincubadas por 48h em meio livre de drogas (figura 28 C). Finalmente, quando avaliadas quanto à fragmentação internucleossomal, todos os tratamentos apresentaram-se significativos com relação aos respectivos controles,

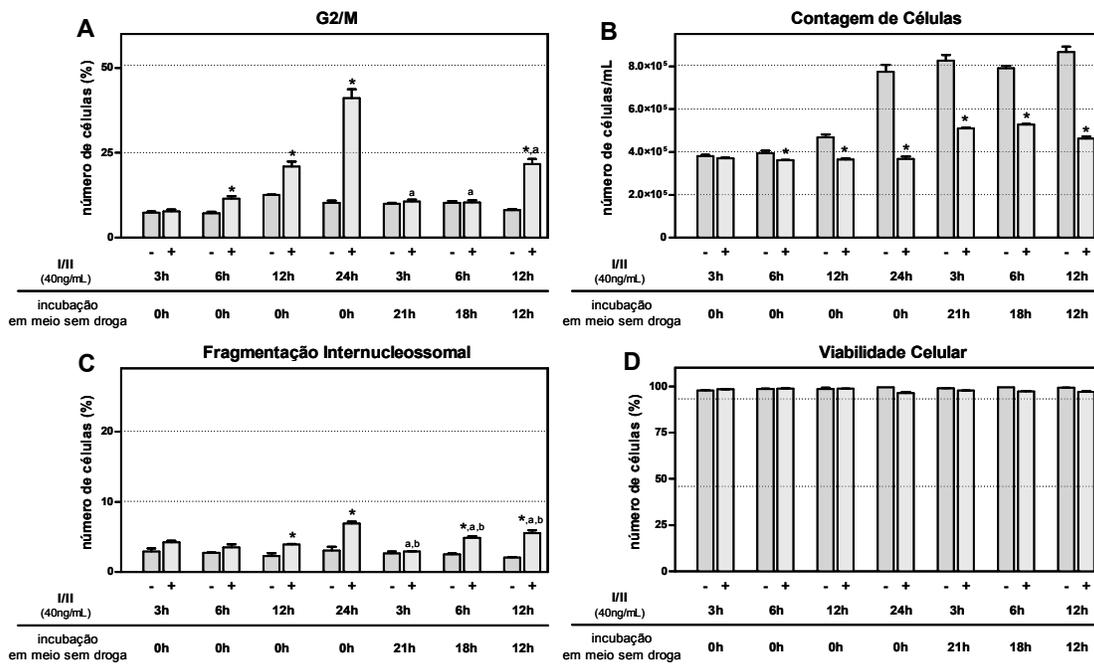
aumentando levemente a porcentagem de células com DNA fragmentado. Entretanto, apenas as células tratadas por 24h e reincubadas por 48h em meio livre de drogas apresentaram um grau de fragmentação nuclear significativo quando comparado aos outros tratamentos (figura 28 D).



**Figura 28** – Avaliação do efeito de I/II (40ng/mL) em células HL-60 tratadas por 24h e reincubadas em meio livre da droga por mais 24 ou 48h e medido por citometria de fluxo. Os histogramas obtidos no programa Guava Express Plus foram quantificados pelo programa ModFit LT 3.2 e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 para a determinação das células na fase G2/M (A) e mostrando fragmentação internucleossomal (C). A contagem de células viáveis (B) e a determinação da viabilidade celular (D) foram obtidas no programa Guava Express Plus e analisadas por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. (\*: significância em relação ao respectivo controle; <sup>a</sup>: significância em relação ao tratamento contínuo por 24h;  $p > 0,05$ ).

Considerando a irreversibilidade do efeito do tratamento de 24h com 40ng/mL de I/II em células HL-60, foram avaliadas as consequências sobre os mesmos parâmetros de tratamentos por tempos mais curtos, durante 3, 6 e 12h e reincubados em meio livre da droga por, respectivamente, 21, 18 e 12h, de modo a completar 24h desde a exposição inicial das células a 40ng/mL de I/II. Enquanto que a viabilidade das células não foi alterada em nenhum dos tratamentos (figura 29 D), o número de células tratadas se mantém constante em todas as contagens, seja para os tratamentos contínuos,

ou com a remoção do estímulo (figura 29 B), variando, significativamente, com relação aos respectivos controles a partir do tratamento por 6h. Com relação ao acúmulo de células na fase G2/M, pode ser observado um efeito leve, mas significativo, com 6h de tratamento contínuo, sendo mais evidente nos tratamentos de 12 e, principalmente, 24h. A remoção do estímulo não induziu posterior acúmulo de células em G2/M, ao passo que todos os pré-tratamentos com I/II e reincubação das células em meio livre da droga foram significativamente diferentes daquele acúmulo observado para o tratamento contínuo por 24h. Todavia, a remoção da droga não alterou a porcentagem de células em G2/M relativa ao respectivo pré-tratamento, seja por 3, 6 ou 12h (figura 29 A). À remoção do estímulo, entretanto, observou-se aumento da fragmentação nuclear quando comparados aos respectivos pré-tratamentos, sendo, porquanto, significativamente diferentes da fragmentação induzida por tratamento contínuo de 24h (figura 29 C).

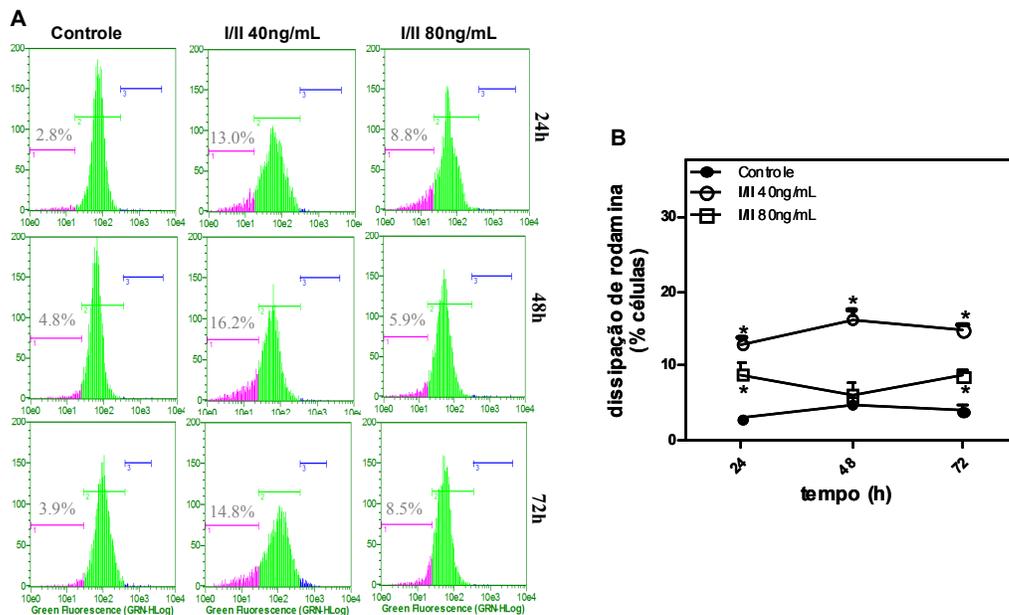


**Figura 29** - Avaliação do efeito de I/II (40ng/mL) em células HL-60 tratadas continuamente por 24h ou por 3, 6 ou 12h e reincubadas em meio livre da droga por, respectivamente, 21, 18 ou 12h e medido por citometria de fluxo. Os histogramas obtidos no programa Guava Express Plus foram quantificados pelo programa ModFit LT 3.2 e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 para a determinação das células na fase G2/M (A) e mostrando fragmentação internucleossomal (C). A contagem de células viáveis (B) e a determinação da viabilidade celular (D) foram obtidas no programa Guava Express Plus e analisadas por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. (\*: significância em relação ao respectivo controle; a: significância em relação ao tratamento contínuo por 24h; b: significância em relação ao respectivo tempo de tratamento, anterior à incubação em meio livre da droga; p > 0,05).

### Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

O efeito de **I/II** sobre o  $\Delta\Psi_m$  está ressaltado na figura 30. O marcador róseo dos histogramas demarca as células que incorporaram maior quantidade de Rodamina 123 e, portanto, apresentam seu  $\Delta\Psi_m$  inalterado. O marcador verde indica as células que emitiram menor fluorescência e, portanto, apresentam seu  $\Delta\Psi_m$  alterado.

O tratamento com **I/II** a 80ng/mL induziu pouca alteração quanto à dissipação do fluorocromo rodamina 123, se comparado ao controle. Por outro lado, a 40ng/mL, **I/II** induziu uma leve, porém significativa despolarização  $\Delta\Psi_m$ , tempo-dependente.



**Figura 30** - Efeito de **I/II** (40 e 80ng/mL) sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células HL-60 tratadas por 24, 48 e 72h, determinada por citometria de fluxo. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento (**A**). Efeito tempo-dependente de **I/II** (40 e 80ng/mL) sobre o potencial transmembrânico mitocondrial (**B**). Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  E.P.M. de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata no programa Guava Express Plus e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \* $p > 0,05$ .

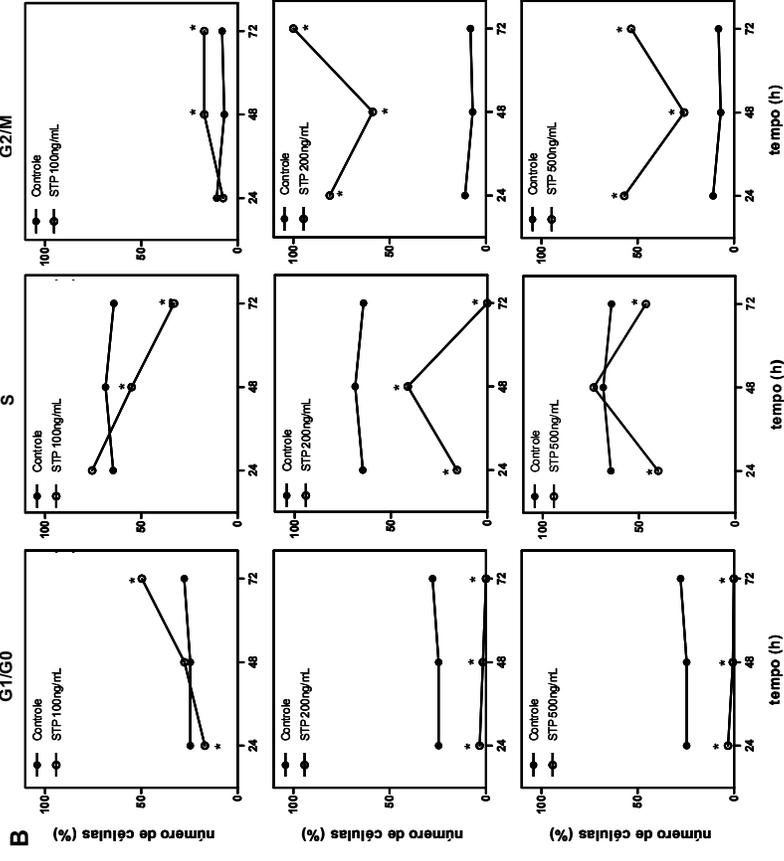
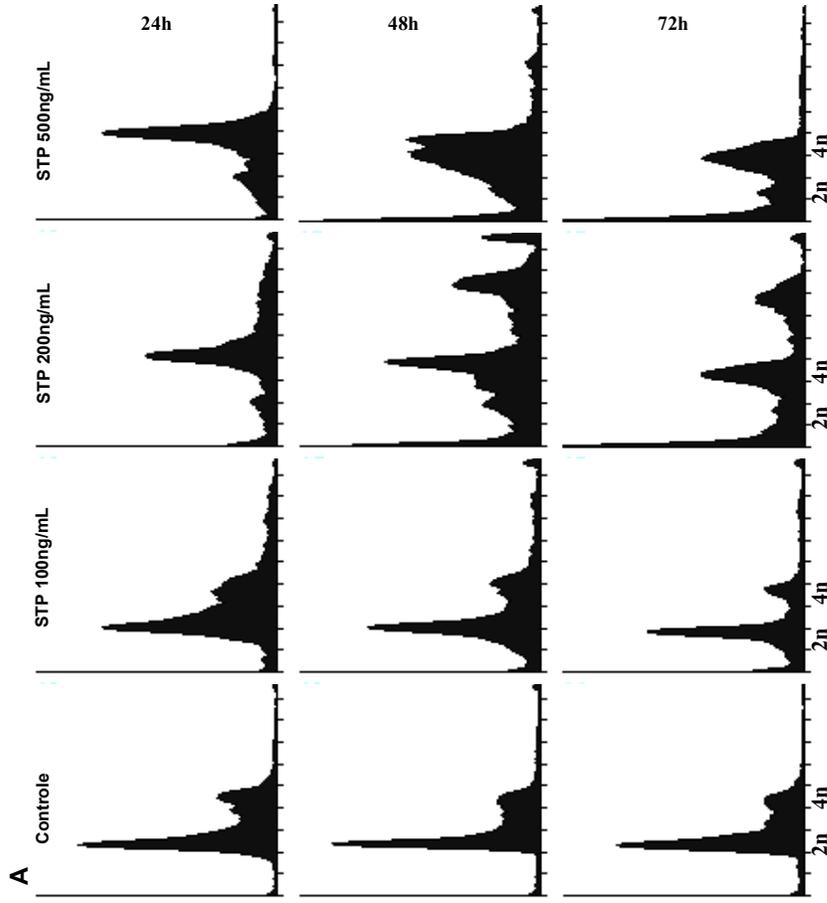
Os efeitos do tratamento de células HL-60 com STP estão apresentados na tabela 11 e na figura 31 A e B. O tratamento com 40ng/mL não induziu alterações significativas sobre a distribuição das fases do ciclo celular em relação ao controle, enquanto 100ng/mL induziu apenas alterações leves, sendo que a mais expressiva é o acúmulo de células em G0/G1 com 72h de tratamento. A 200ng/mL, especialmente, e

também a 500ng/mL, STP induziu um substancial acúmulo de células em G2/M com 24h de tratamento. Com 48h, a porcentagem de células em G2/M diminuiu e novamente voltou a aumentar na análise de 72h. O efeito sobre a fase S seguiu exatamente a cinética inversa, ao passo que a porcentagem de células em G0/G1 diminuiu drasticamente na análise de 24h até chegar praticamente a zero com 72h de tratamento.

STP induziu o surgimento de células poliplóides (> G2/M) ao tratamento com 100 e 200ng/mL, sendo que, no primeiro, a porcentagem de células em > G2/M manteve-se constante e em torno de 6%, uma vez que, no segundo, a porcentagem de células poliplóides aumentou com o tempo de tratamento, alcançando 26,64% com 72h.

**Tabela 11:** Efeito de STP (40, 100, 200 e 500ng/mL) sobre a distribuição das fases do ciclo celular em células HL-60 tratadas por 24, 48 e 72h medido por citometria de fluxo. Os valores apresentados correspondem às medias (E.P.M.) de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata. Os histogramas obtidos no programa Guava Express Plus foram quantificados pelo programa ModFit LT 3.2 e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \*p < 0,05.

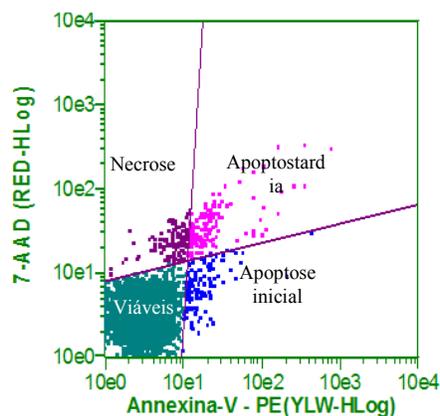
Tempo de incubação	Concentração (ng/mL)	Distribuição das fases do ciclo celular (EPM) (%)			
		G1/G0	S	G2/M	> G2/M
24h	0	24.54 (0.10)	64.61 (0.43)	10.84 (0.32)	1.35 (0.12)
	40	23.09 (0.69)	67.57 (1.32)	9.34 (0.65)	2.34 (0.35)
	100	<b>16.97*</b> (1.39)	75.43 (1.46)	7.61 (0.07)	<b>6.29*</b> (0.01)
	200	<b>3.38*</b> (0.11)	<b>15.63*</b> (2.22)	<b>80.99*</b> (2.11)	<b>12.86*</b> (0.76)
	500	<b>3.15*</b> (0.83)	<b>39.95*</b> (4.45)	<b>56.91*</b> (3.61)	1.26 (0.32)
48h	0	24.54 (0.87)	68.50 (0.72)	6.95 (0.18)	2.10 (0.34)
	40	20.76 (2.14)	73.34 (0.52)	7.57 (0.04)	2.36 (0.11)
	100	27.64 (3.73)	<b>55.09*</b> (0.61)	<b>17.28*</b> (4.34)	<b>5.68*</b> (0.70)
	200	<b>1.61*</b> (1.61)	<b>41.20*</b> (5.24)	<b>58.68*</b> (2.13)	<b>15.58*</b> (1.52)
	500	<b>0.63*</b> (0.63)	73.44 (3.35)	<b>25.94*</b> (2.76)	2.34 (0.58)
72h	0	27.74 (0.84)	64.19 (0.51)	8.06 (0.89)	1.23 (0.11)
	40	32.86 (2.07)	57.73 (2.32)	9.41 (0.30)	1.76 (0.15)
	100	<b>49.77*</b> (0.25)	<b>32.98*</b> (1.61)	<b>17.32*</b> (1.61)	<b>6.61*</b> (0.17)
	200	<b>0.00*</b> (0.00)	<b>0.00*</b> (0.00)	<b>100.00*</b> (0.00)	<b>26.64*</b> (3.28)
	500	<b>0.10*</b> (0.10)	<b>46.47*</b> (5.63)	<b>53.43*</b> (5.53)	2.79 (1.19)



**Figura 31** – Efeito de STP (100, 200 e 500ng/mL) sobre a distribuição das fases do ciclo celular em células HL-60 tratadas por 24, 48 e 72h medido por citometria de fluxo. Os histogramas obtidos no programa Guava® Express Plus foram modelados pelo programa Cyflogic 1.2.1. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento (A). Efeito tempo-dependente de STP (100, 200 e 500ng/mL) sobre as fases do ciclo celular em HL-60. Os histogramas foram quantificados pelo programa ModFit LT 3.2 e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \*p > 0,05.

*Externalização da PS de membrana*

A coloração dupla com anexina-V e 7-AAD permite a assimilação das células em 4 populações distintas, como representadas na figura 32. As células do quadrante inferior esquerdo do diagrama não possuem marcação por nenhum dos dois corantes e são tidas como normais (ou viáveis). As células inferiores à direita possuem marcação forte apenas por anexina e são consideradas como em apoptose inicial. Já as células do quadrante superior à direita possuem marcação intensa pelos dois corantes, e são tidas também como apoptóticas, mas em estágios finais, devido à desintegração da membrana plasmática reconhecidas pela penetração de 7-AAD. As células superiores à esquerda possuem marcação apenas por 7-AAD, e são reconhecidas como necróticas.



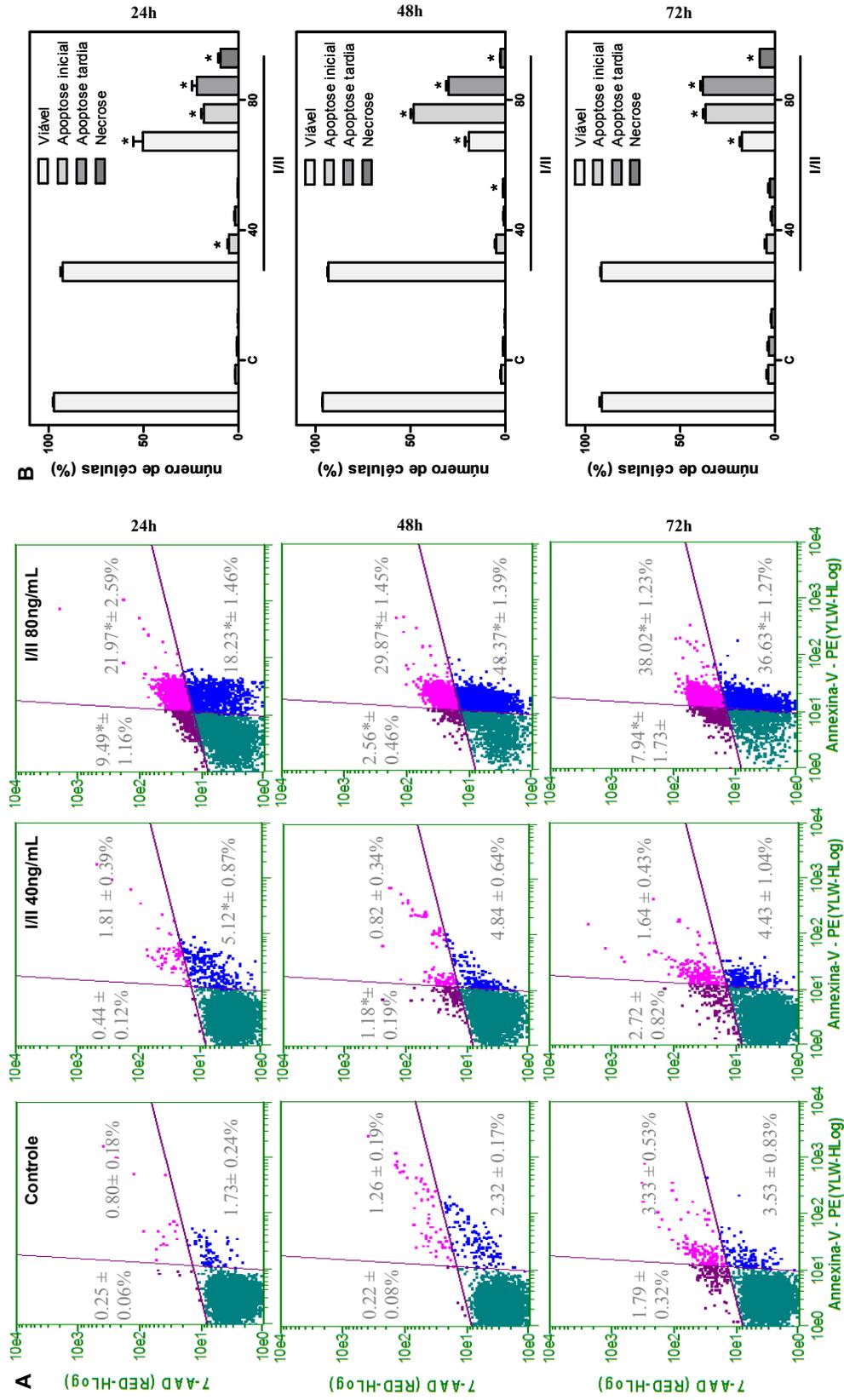
**Figura 32** – Diagrama de análise da distribuição das células quanto à marcação com os fluorocromos anexina-V e 7-AAD oferecido pelo programa Guava® Express Plus.

O tratamento com 40ng/mL de **I/II** induziu apenas sutis diferenças quanto à marcação das células HL-60 por anexina-V/7-AAD em relação às células controle, assim mostrado na figura 33 A e B, confirmando que esta concentração não repercutiu em efeitos citotóxicos substanciais.

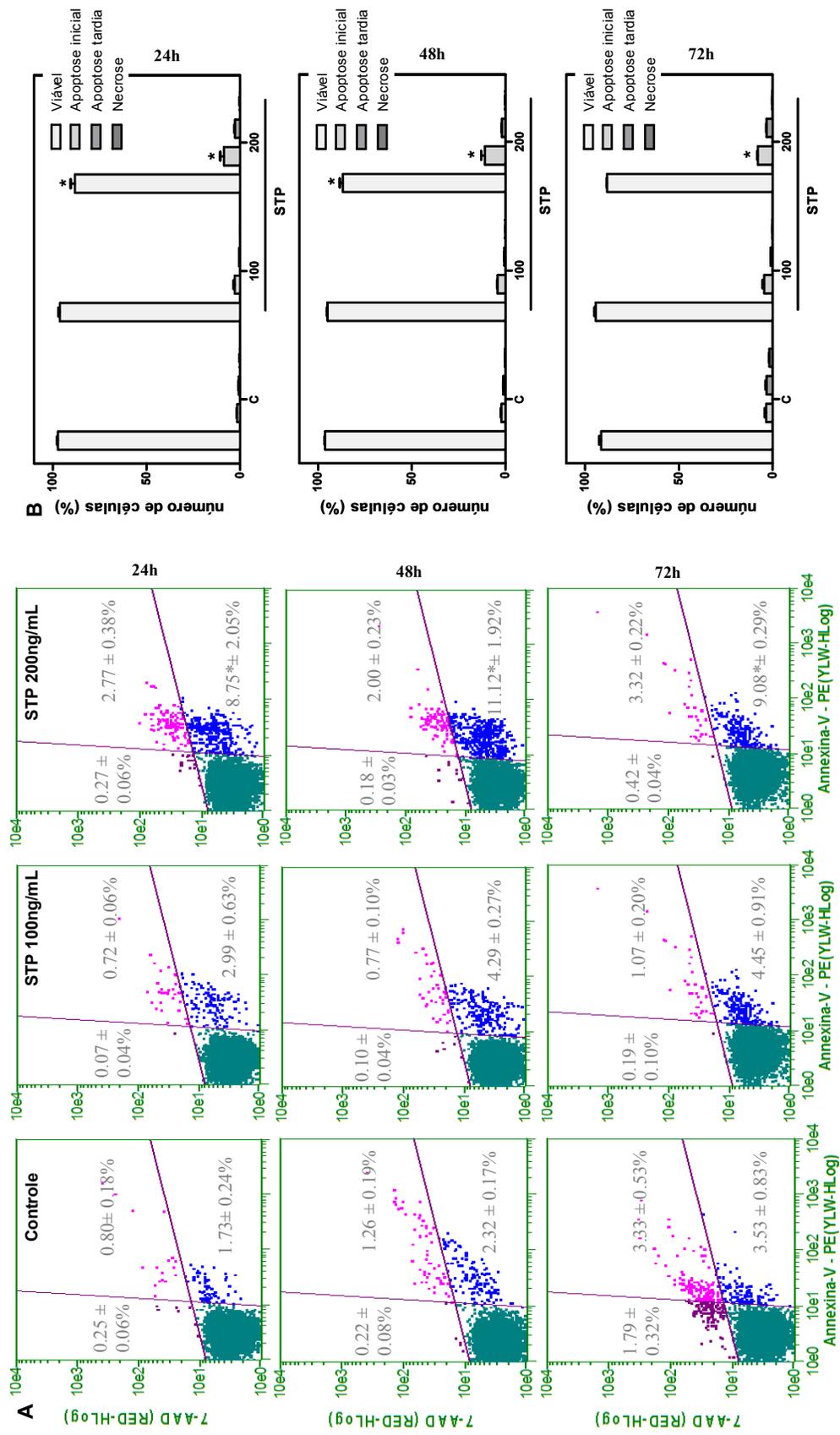
O tratamento com 80ng/mL, entretanto, levou a expressivas diferenças na marcação das células com anexina. A diminuição das células viáveis foi significativa desde a primeira análise, com 24h de tratamento, e segue decrescendo até 72h. Quanto às células em apoptose, seja inicial ou tardia, o efeito observado é exatamente o contrário, aumentando significativamente com o tempo de incubação. A contagem de

células em necrose tratadas com 80ng/mL de **I/II** é estatisticamente significativa quando comparada às células controle em todos os tempos de tratamento, todavia aparecem como uma pequena fração da amostra, que, por sua vez, não sugere um padrão tempo-dependente de aumento ou diminuição de células necróticas (figura 33 A e B).

STP a 100 ou 200ng/mL, induziu alterações menos pronunciadas, sendo um leve aumento significativo das células em apoptose inicial com o tratamento de 200ng/mL o único efeito observado. Este efeito não apresentou um padrão de variação tempo-dependente, enquanto que a porcentagem de células marcadas apenas com anexina manteve-se praticamente constante para as análises de 24, 48 e 72h (figura 34 A e B).



**Figura 33** – Efeito de I/II (40 e 80ng/mL) sobre a externalização da fosfatidilserina na membrana de células HL-60 tratadas por 24, 48 e 72h determinado por citometria de fluxo. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento (A). Porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia e em necrose para os tratamentos controle ou I/II (40 e 80ng/mL) por 24, 48 e 72h (B). Os valores apresentados correspondem às médias ± E.P.M. de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata no programa Guava Express Plus e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \*p < 0,05.



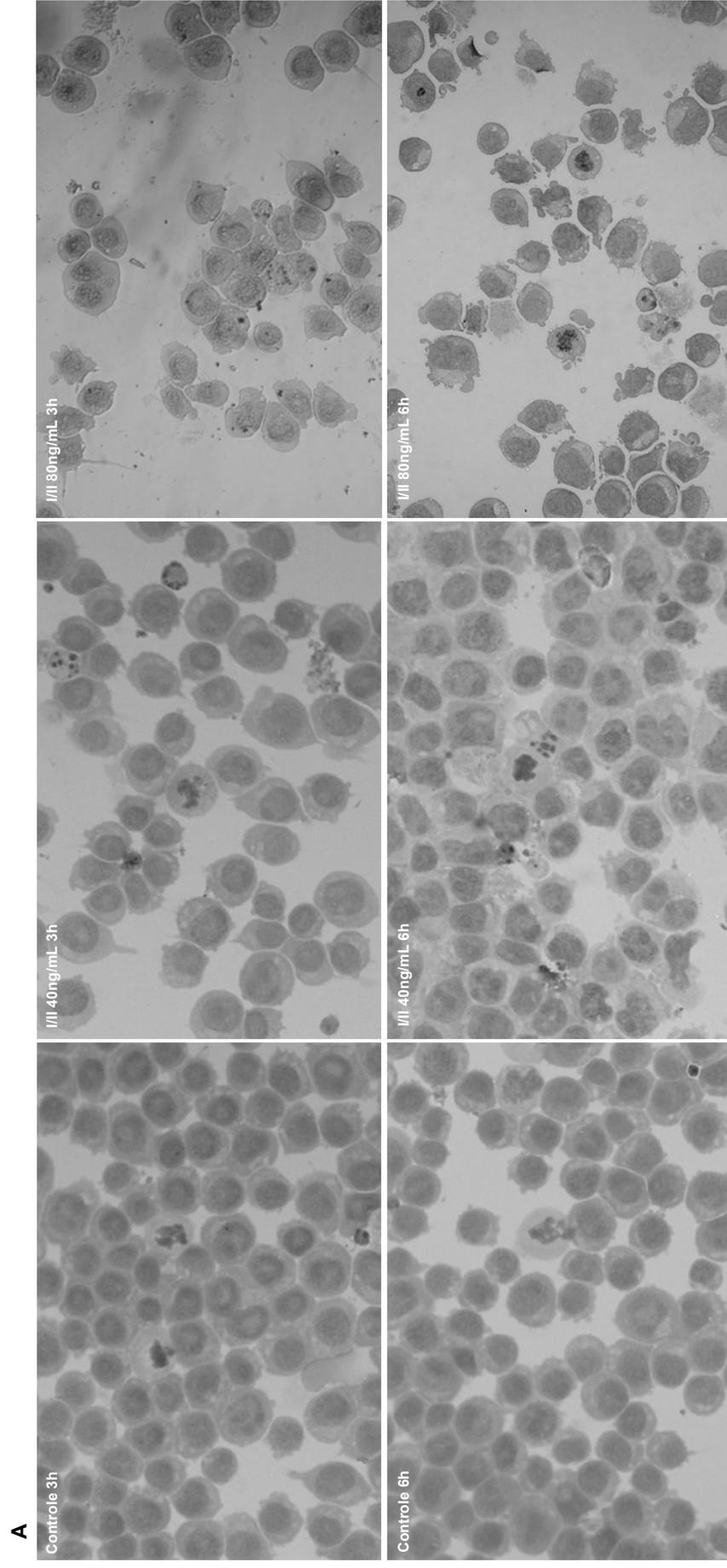
**Figura 34** – Efeito de STP (100 e 200ng/mL) sobre a externalização da fosfatidilserina na membrana de células HL-60 tratadas por 24, 48 e 72h determinado por citometria de fluxo. Ilustração de uma replicata representativa de cada tratamento (A). Porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia e em necrose para os tratamentos controle ou STP (100 e 200ng/mL) por 24, 48 e 72h (B). Os valores apresentados correspondem às médias ± E.P.M. de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas, com 5000 eventos adquiridos por replicata no programa Guava Expres Plus e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \*p < 0,05.

### 3.2.3. Análise morfológica

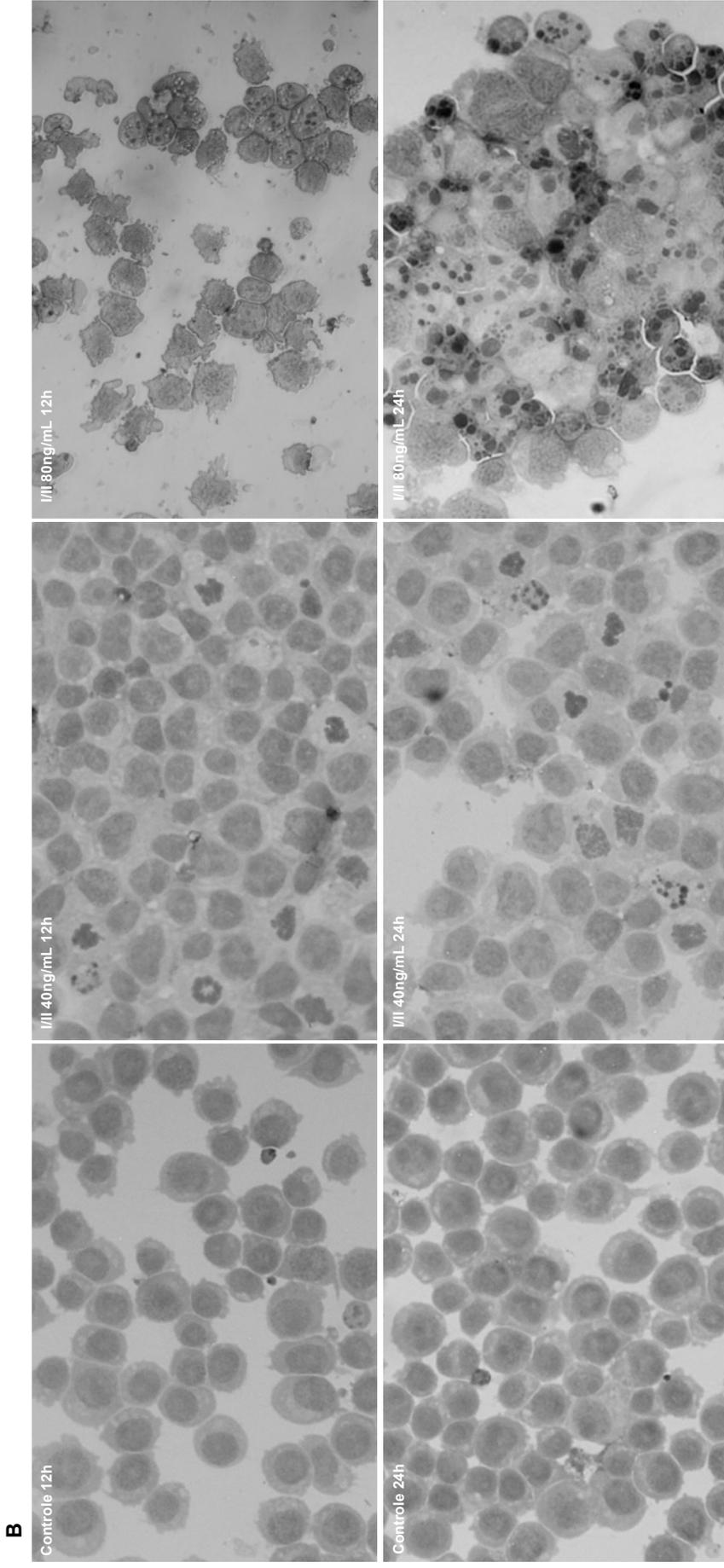
Alterações morfológicas na organização celular induzidas pelo tratamento com **I/II** foram visualizadas valendo-se da coloração diferencial para núcleo e citoplasma fornecida, respectivamente, pelos corantes hematoxilina e eosina. Vale ressaltar, assim como mostrado na figura 35 (A, B e C), que as células HL-60 não-tratadas apresentavam-se com a morfologia que lhe é considerada normal, com núcleos volumosos, citoplasma homogêneo, membrana celular contínua e ocasionais figuras mitóticas entre a maioria de células com núcleos interfásicos.

O tratamento com 40ng/mL de **I/II** induziu apenas discretas variações na morfologia das células, sendo o aumento de tamanho do núcleo e do volume celular as mudanças mais expressivas nas avaliações realizadas a partir de 12h de incubação. Contudo, na análise de 72h, pode-se reparar a diminuição do tamanho de algumas células, a redução do volume citoplasmático, a intensificação da fragmentação nuclear e, especialmente, o surgimento de *blebs* (do inglês, bolhas) na membrana plasmática, conformando alterações típicas de células em apoptose.

Na concentração de 80ng/mL, **I/II** induziu substanciais alterações morfológicas nas células, e os efeitos apresentaram-se potenciados com o tempo de tratamento. Na primeira análise, com 3h de tratamento, as células já mostraram alterações na membrana plasmática. A partir de 6h, os *blebs* de membrana são mais expressivos e a condensação e fragmentação nuclear já se fazem notórias e incrementadas na análise com 12h de tratamento. Com 24h de incubação, uma larga parte das células apresentou uma diminuição do seu tamanho com a perda do conteúdo citoplasmático e a condensação e fragmentação do material nuclear são bastante evidentes. Nas análises com 48 e 72h de tratamento, as células seguem numa exacerbação tempo-dependente destes efeitos, intensificando as características sugestivas de apoptose celular.

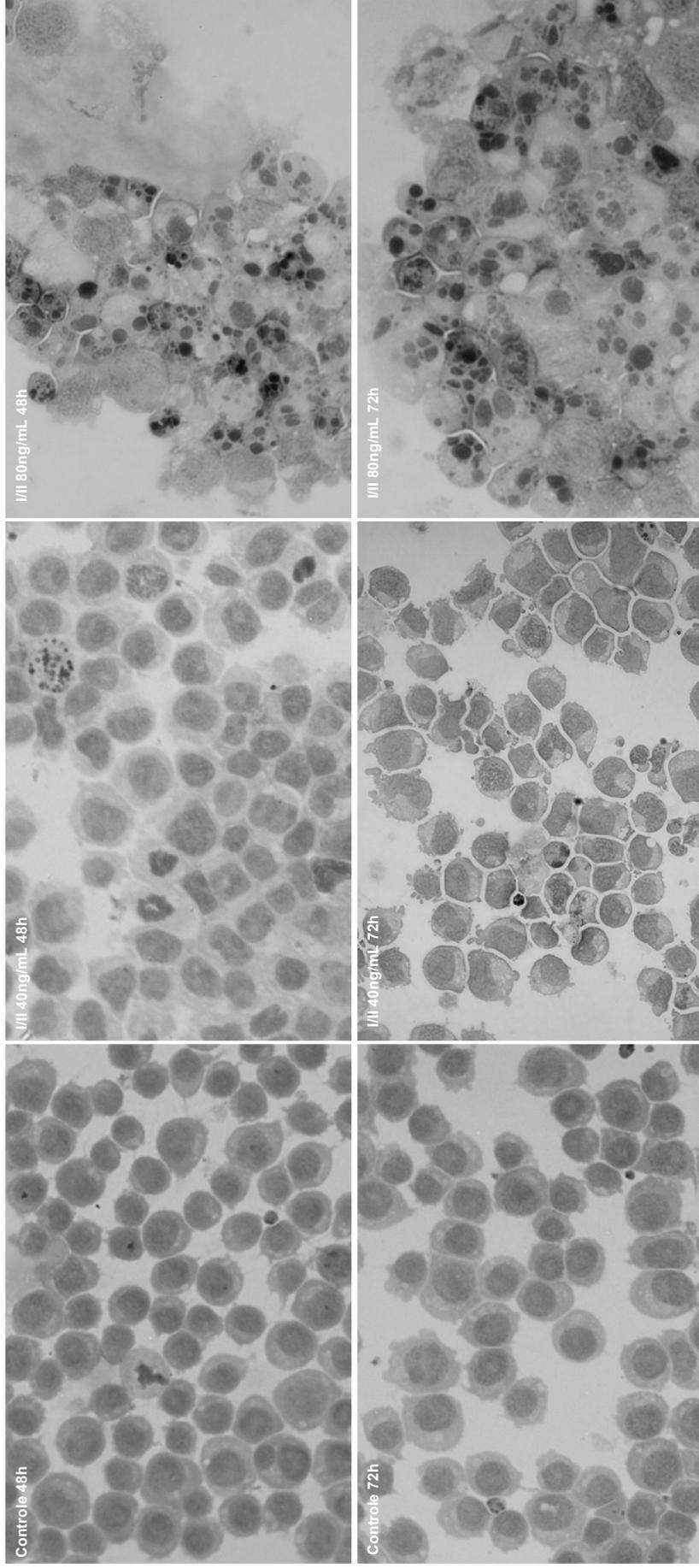


**Figura 35** – Microfotografias de células HL-60 controle ou tratadas com I/II (40 ou 80ng/mL) durante 3 e 6h e coradas com hematoxilina e eosina. As células foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico sob aumento de 400X. Ilustração de um campo representativo de cada tratamento (A).



**Figura 35** – Microfotografias de células HL-60 controle ou tratadas com I/II (40 ou 80ng/mL) durante 12 e 24h e coradas com hematoxilina e eosina. As células foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico sob aumento de 400X. Ilustração de um campo representativo de cada tratamento (**B**).

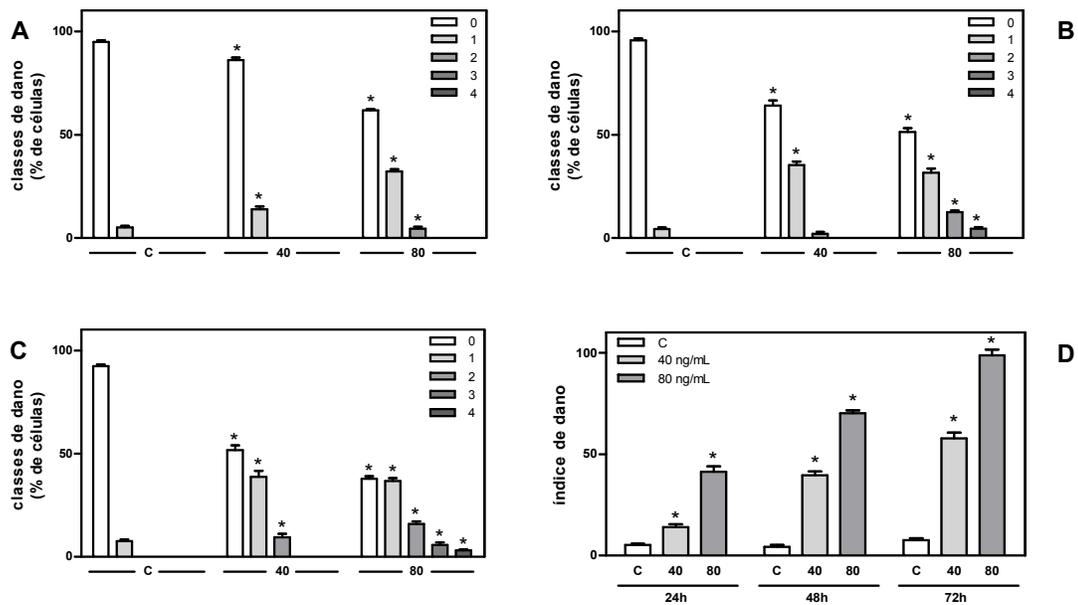
C



**Figura 35** – Microfotografias de células HL-60 controle ou tratadas com I/II (40 ou 80ng/mL) durante 48 e 72h e coradas com hematoxilina e eosina. As células foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico sob aumento de 400X. Ilustração de um campo representativo de cada tratamento (C).

## 3.2.4. Teste do cometa

A indução de lesões à fita-dupla de DNA foi avaliada em células HL-60 controle ou tratadas com **I/II** a 40 ou 80ng/mL por 24, 48 ou 72h, assim mostrado na figura 36. A 40ng/mL, **I/II** provocou apenas danos de nível baixo (escore 1) após 24 e 48h de tratamento, sendo que danos de nível médio (escore 2) foram detectados em pequena quantidade após 72h de incubação. O tratamento com 80ng/mL, por sua vez, induziu danos mais expressivos, de modo que a porcentagem de células padecidas de danos de nível baixo, médio e alto (escore 3) foram incrementadas com o tempo. Com 72h de exposição, danos significativos de nível máximo (escore 4) foram registrados para tratamento a 80ng/mL com **I/II**. O índice de dano mostrou-se significativo para os dois tratamentos com **I/II**, sendo que 80ng/mL mostrou-se substancialmente mais potente na indução de danos de fita dupla ao DNA.



**Figura 36 - Efeito de I/II (40 e 80ng/mL) sobre a indução de quebras de DNA de fita-dupla em células HL-60 tratadas por 24 (A), 48 (B) ou 72h (C), avaliado pelo teste do cometa neutro. Determinação do índice de dano em DNA de fita-dupla induzido por I/II (40 e 80ng/mL; D).** 100 eventos foram analisados em cada amostra ao quais se atribuiu escores de acordo com o nível de dano observado. Os valores apresentados correspondem às médias  $\pm$  E.P.M. de 2 experimentos realizados em triplicatas e comparados por ANOVA seguido por teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. \* $p < 0,05$ .

### 3.2.5. Análises por western blot

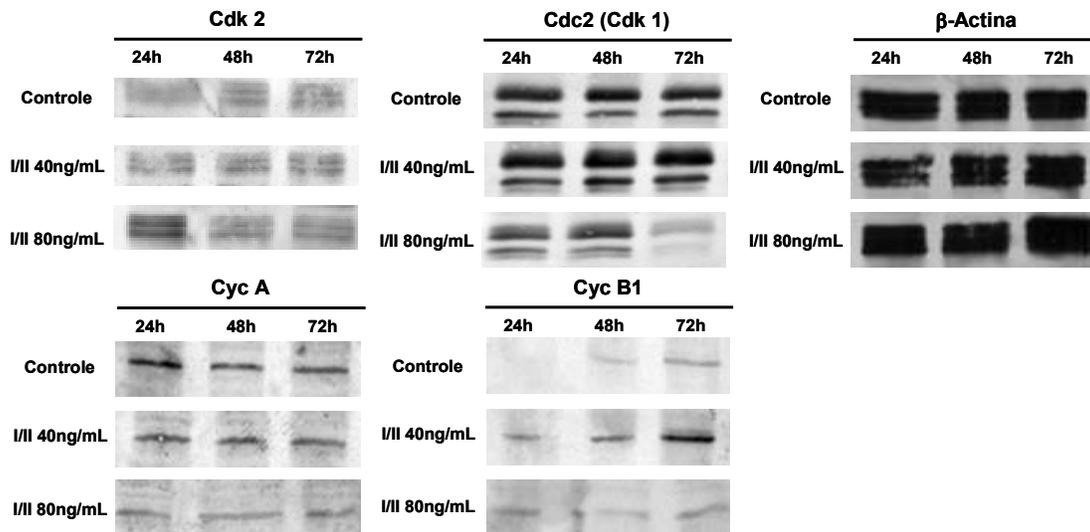
Inicialmente, as análises por western blot avaliaram a expressão de ciclinas (Cyc) e Cdks responsáveis pela regulação das fases G2 e M do ciclo celular. O controle do ciclo celular fica subordinado especialmente às ciclinas, uma família de proteínas indutivas que regulam a função das CDKs (do inglês, *Cyclin Dependent Kinases* – quinases dependentes de ciclina), por sua vez, quinases constitutivas da célula. Para assegurar que o ciclo celular funcione de modo unidirecional, as ciclinas são sintetizadas e degradadas ao passo que são, respectivamente, requeridas e desnecessárias para o cumprimento de cada fase. A regulação da função das Cdks, sendo enzimas constitutivas, é dada parcialmente pelo acoplamento das ciclinas, as proteínas ativadoras, pela ligação de proteínas inibidoras, e pela fosforilação/desfosforilação da subunidade quinase, sendo, geralmente, a fosforilação um mecanismo inibitório e a desfosforilação, ativador.

A produção de Cyc A é iniciada na fronteira de G1 e S e sua ligação à Cdk 2 é essencial ao cumprimento da fase S, sendo o limite entre S e G2 aonde sua expressão atinge o pico. A Cyc A segue regulando a fase G2 ativando Cdk 1 (Cdc2). A Cyc B começa a ser produzida durante o final da fase S e atinge o seu pico precisamente no limiar entre G2 e M, que, complexada à Cdk 1, regula a entrada em M, aonde a célula irá, finalmente, se dividir em duas. O complexo Cyc B/Cdk 1 permanece fosforilado, pois que inativo, durante a maior parte do tempo, coordenando o início da fase M com a ativação deste complexo.

A figura 37 apresenta o balanço da expressão das proteínas Cyc A e B1 e Cdk 1 e 2 das células HL-60 controle e tratadas com 40 ou 80ng/mL **I/II** durante 24, 48 ou 72h. A expressão de Cyc A variou com a concentração testada, mas não com o tempo de tratamento. O mesmo pode ser ponderado para Cdk 2, excetuando-se o notório aumento da sua expressão com 24h de tratamento com 80ng/mL **I/II**.

A detecção de Cyc B1 para tratamento com 80ng/mL **I/II** não apresentou muita variação tempo-dependente, contudo, para as outras amostras, Cyc B1 variou tanto com a concentração como com o tempo de tratamento. O aumento da sua expressão para tratamento de 40ng/mL **I/II** é evidente em relação ao controle, e segue crescente, assim como o controle, com o tempo de incubação.

A banda superior, de migração mais lenta, corresponde à forma fosforilada, portanto inativa, de Cdk 1, ao passo que a banda inferior, à forma ativa. Enquanto que o tratamento com 80ng/mL I/II diminuiu a expressão das duas formas de Cdk 1, especialmente na análise de 72h, o aumento de ambas as formas, sobretudo da forma inativa, foi mais expressiva com o tratamento de 40ng/mL I/II.



**Figura 37** – Expressão de Cdc2 (Cdk 1), Cdk 2, ciclina A (Cyc A) e ciclina B1 (Cyc B1) em células HL-60 controle e tratadas com 40 ou 80ng/mL I/II durante 24, 48 ou 72h avaliada por western blot.

A expressão e ativação de proteínas relacionadas ao bloqueio do ciclo celular em G2/M e ao reparo de dano em DNA foram investigadas em células HL-60 controle e tratadas com I/II por 24, 48 ou 72h.

A proteína p53 é um supressor tumoral que responde a dano em DNA ou outras incoerências genômicas que coloquem em risco a saúde e a integridade da célula. À ativação, p53 pode levar ao bloqueio do ciclo celular para reparo do dano ou indução de apoptose. Frequentemente, esta proteína aparece alterada em células tumorais, seja mutada, super- ou sub-expressa ou até nula. As células HL-60 são p53-nulas, assim como mostrado nas análises da figura 38.

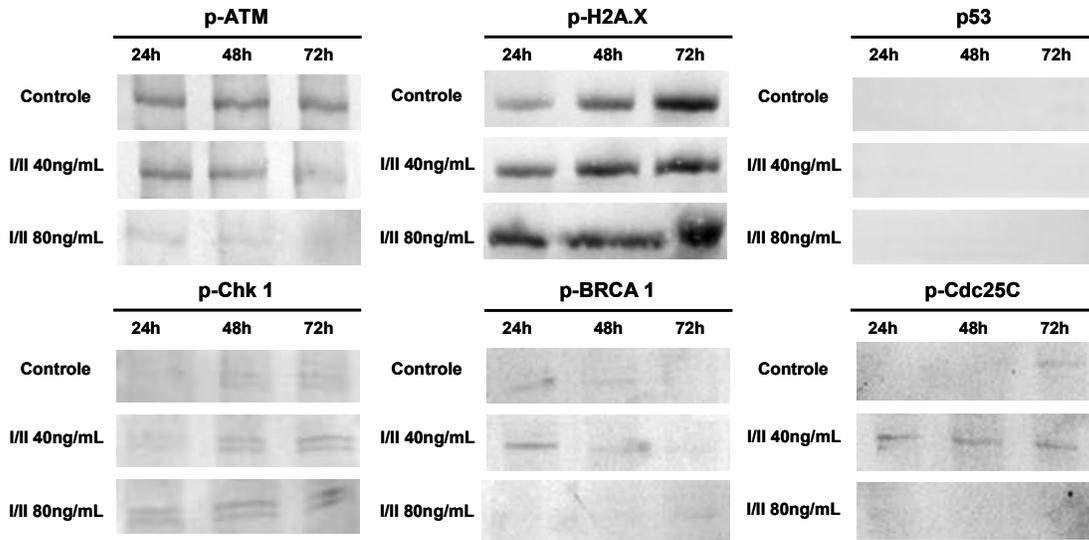
As quinases da família inositol-3 fosfato (PI3), ATM e ATR, são empregadas em todas as vias de resposta a dano em DNA das células eucarióticas, fosforilando resíduos de serina (Ser) ou treonina (Thr) de alvos que regulam as diversas providências celulares relativas aos diferentes tipos de dano. A ativação de ATM (ataxia-

telangiectasia mutada) se dá em revida a danos de DNA de dupla-fita. ATM é ativada por autofosforilação em Ser1981 e, por sua vez, regula uma série de proteínas envolvidas nos pontos de checagem do ciclo celular, na indução ou inibição de apoptose e no reparo de DNA. A expressão de p-ATM se manteve constante nas células controle, enquanto que, ao tratamento com 40ng/mL **I/II**, ocorreu uma diminuição tempo-dependente de sua expressão. O tratamento com 80ng/mL induziu uma expressão meramente residual de p-ATM.

Chk 1 é uma quinase chave no acionamento do ponto de checagem em resposta a dano em DNA. Sua ativação é resolvida através da fosforilação por ATM/ATR e opera na regulação do ciclo celular, principalmente, por modular as fosfatases do tipo Cdc25. Cdc25C atua no controle do complexo Cyc B/Cdk 1, removendo os grupos fosfato inibitórios em Thr14 e Tyr15. À inativação por Chk 1, ocorre fosforilação em Ser216 e bloqueio da sua translocação ao núcleo, desabilitando, pois, a ativação de Cyc B/Cdk 1 e, conseqüentemente, a entrada da célula em M. A expressão de p-Chk 1 foi incrementada com o tempo de tratamento com 40ng/mL **I/II**, sendo que, a 80ng/mL a expressão de p-Chk 1 apareceu praticamente constante com o aumento do tempo de incubação. A indução de p-Cdc25C foi detectada apenas em resposta ao tratamento com 40ng/mL **I/II**.

H2A é uma das 4 histonas centrais do complexo DNA-proteína que forma o nucleossomo em que se arruma a estrutura da cromatina nas células eucarióticas. Em resposta a dano de fita-dupla ao DNA, a proteína H2A.X, um dos membros da família H2A, é rapidamente fosforilado no sítio da Ser139 por ATM. A ativação de H2A.X mostrou ser tempo dependente em todos os tratamentos, inclusive nas células controle, sendo que a concentração de 80ng/mL **I/II** induziu maior expressão de p-H2A.X que 40ng/mL.

BRCA1 é um supressor tumoral que exerce papéis importantes em várias via de sinalização celular, inclusive na progressão do ciclo celular e no reparo de dano em dupla-fita de DNA. BRCA1 é ativada por ATM em resposta a dano de dupla-fita e colocaliza com p-H2A.X (Ser139) no loci do dano, recrutando outras proteínas essenciais ao reparo de dano em DNA. A indução de p-BRCA1 (Ser1524) mostrou-se expressiva apenas no tratamento com 40ng/mL **I/II** por 24h, tendendo a diminuir com o tempo de incubação. Nas demais análises, a expressão de p-BCRA1 foi baixa ou indetectável.

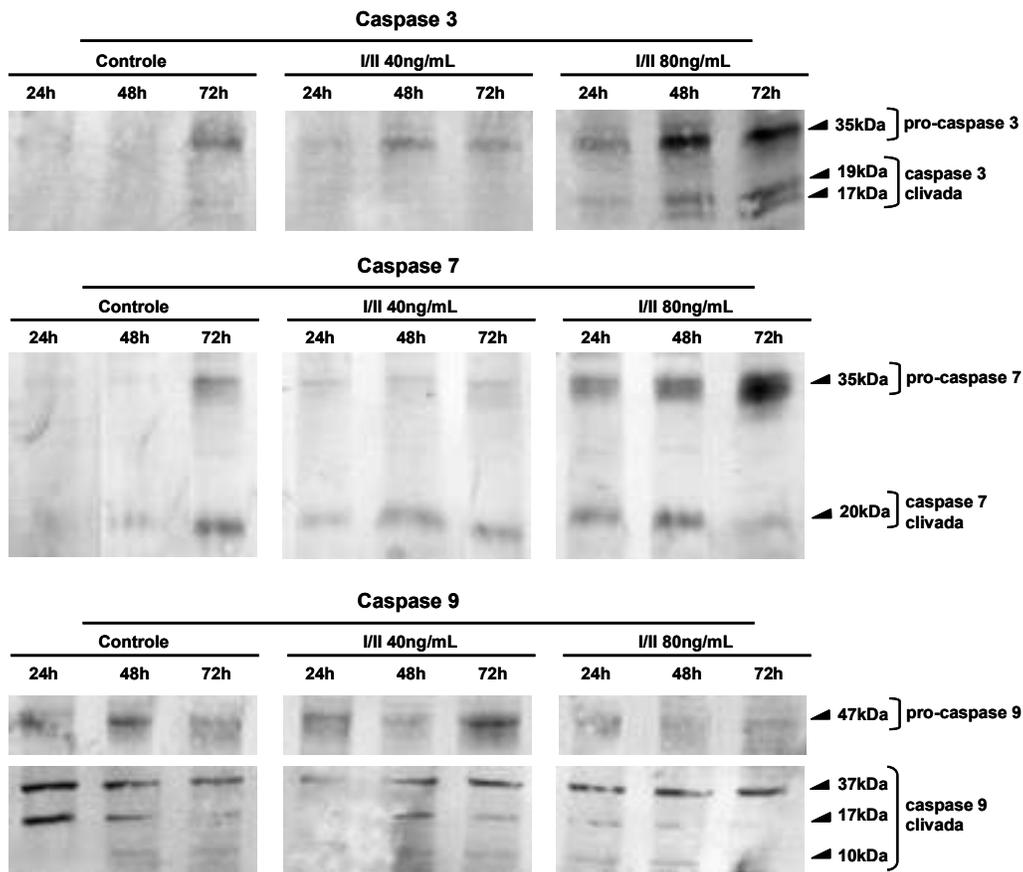


**Figura 38** – Expressão de p-ATM (Ser1981), p-Chk 1 (Ser296), p-H2A.X (Ser139), p-BRCA1 (Ser1524), p53 e p-Cdc25c (Ser216) em células HL-60 controle e tratadas com 40 ou 80ng/mL I/II durante 24, 48 ou 72h avaliada por western blot.

As caspases são uma família de proteases que suportam um papel central do processo de apoptose celular, e são distinguidas em dois grupos: as iniciadoras e as efetoras. As caspases iniciadoras (2, 8, 9, 10 e 12) são expressas em um nível basal constitutivamente nas células e respondem a estímulos que incrementam a sua abundância, munindo a célula de uma iniciação imediata do processo de apoptose, se for o caso. Entretanto, as caspases são expressas na forma de proenzimas, que devem ser clivadas para a sua ativação. As caspases iniciadoras são autocatalíticas, de modo que conseguem auto-ativar em resposta a estímulos apoptóticos e desencadear o processo. As caspases efetoras (3, 6 e 7), por sua vez, são clivadas e, portanto, ativadas pelas caspases iniciadoras, e irão seguir a cascata clivando outros substratos, desmontando a estrutura celular e conferindo-lhe as características que são particulares da apoptose.

O tratamento com I/II induziu, de um modo geral, a expressão concentração- e tempo-dependente das procaspases e dos respectivos produtos de clivagem em células HL-60. A 40ng/mL, a expressão das pro-caspases 3 e 9 aumentou com o tempo de tratamento, entretanto, as suas formas clivadas não seguiram expressas, para caspase 3, ou apresentaram um padrão de expressão semelhante ao das células controle. A caspase 7, por sua vez, marcou apenas a sua forma ativada.

A 80ng/mL **I/II**, a indução das pro-caspases, assim como sua respectiva ativação, deu-se de forma mais óbvia que com 40ng/mL. A expressão das caspases efetoras 3 e 7 tiveram as suas formas ativas e inativas incrementadas com o tempo de tratamento, à exceção da expressão do produto da clivagem da caspase 7, que foi diminuída com 72h de incubação, porém registrou um aumento substancial da sua forma não-clivada. Todavia, a expressão da pro-caspase 9 foi menor para o tratamento com 80ng/mL **I/II** que com 40ng/mL, sendo que os produtos da clivagem, em ambas as condições, foram expressos em níveis similares ao controle (figura 39).

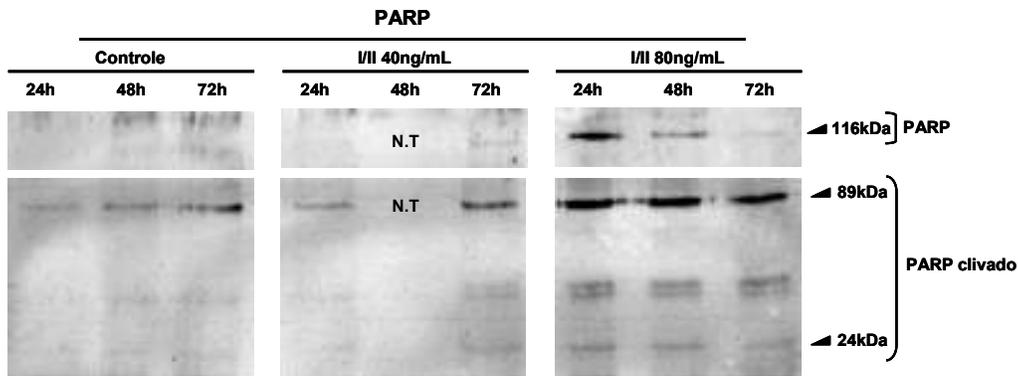


**Figura 39** – Expressão das pro-caspases e caspases 3 (Asp175), 7 (Asp198) e 9 (Asp330) em células HL-60 controle e tratadas com 40 ou 80ng/mL **I/II** durante 24, 48 ou 72h avaliada por western blot.

PARP (poli-ADP-ribose polimerase) é uma enzima nuclear envolvida nos processos de reparo de DNA e apoptose celular. Sob circunstâncias fisiológicas normais, PARP é constitutivamente expressa em baixos níveis e assume a manutenção de pequenos danos de fita-simples ao DNA, recrutando enzimas de reparo ao sítio do

dano. A clivagem de PARP facilita o desmonte da estrutura celular e está intimamente relacionada à indução de morte por apoptose, sendo um dos principais substratos de atuação das caspases 3 e 7.

A expressão de PARP em HL-60 foi significativa apenas na análise das células tratadas com 80ng/mL I/II, sendo que este efeito apresentou-se decrescente com o aumento do tempo de incubação. A clivagem de PARP, por sua vez, mostrou-se tempo- e concentração dependentes para o controle e o tratamento com 40ng/mL I/II. A 80ng/mL, a clivagem de PARP é, pois, mais expressiva, entretanto não sofreu alterações com o tempo de tratamento (figura 40).



**Figura 40** – Expressão e clivagem de PARP (Asp214) em células HL-60 controle e tratadas com 40 ou 80ng/mL I/II durante 24, 48 ou 72h e avaliadas por western blot. (N.T.: não testado).

## DISCUSSÃO

Após 40 anos de trabalho intenso, aplainando os dias de penúria com os de abundância e as histórias de fracasso com as de sucesso, o estudo de produtos naturais marinhos parece ter, decididamente, alcançado a sua maturidade. Afrontado pelos primeiros passos arrastados, sobretudo, pelos motes circunstanciais, o desenvolvimento de uma rotina de pesquisa racional, criativa e paciente, presenteou este século com a solução de diversos entraves amontoados pelo tempo e, por decorrência, com uma extraordinária expansão deste campo.

É certo, pois, que a valorização da farmacologia dos produtos marinhos está intimamente conectada à sua aplicação na terapia do câncer. De fato, a atividade citotóxica aparece, com alta frequência, entre os compostos de origem marinha (Faulkner, 2000) e a avaliação da citotoxicidade *in vitro*, apoiada em modelos celulares ou sistemas enzimáticos, tem se mostrado bastante eficaz na descoberta de novos agentes quimioterápicos e na determinação da respectiva seletividade e modos de ação (Cragg & Newman, 2000; Cragg *et al.*, 2003).

O primeiro registro de atividade citotóxica sobre células tumorais em extratos obtidos de invertebrados marinhos do litoral cearense constou da avaliação da bioatividade de 10 espécies de ascídias de ocorrência local e revelou 6 extratos ativos em pelo menos um dos quatro modelos empregados. A espécie *Eudistoma vannamei* apresentou-se ativa em três dos ensaios utilizados, com especial destaque à inibição da proliferação de células tumorais ( $IC_{50}$  entre 2 e 14  $\mu\text{g/mL}$ ; Jimenez *et al.*, 2003). Ao prosseguimento deste estudo, por meio do fracionamento bio guiado do extrato bruto de *E. vannamei*, 4 frações adjacentes, obtidas das eluições derradeiras da fase diclorometano em coluna de sílica, com robusta citotoxicidade contra células de linhagens tumorais ( $IC_{50}$  entre 0,1 e 0,7  $\mu\text{g/mL}$ ) foram identificadas. A análise química dessas frações apontou para a presença de compostos aromáticos, derivados de aminoácidos, capazes de bloquear a proliferação celular e induzir apoptose (Jimenez *et al.*, 2008).

As substâncias com atividade biológica isoladas de ascídias foram, em sua maioria, cedidas pelos membros das famílias Didemnidae e Polycitoridae, onde são classificadas, nesta última, as espécies do gênero *Eudistoma* (Waters & van den Brenk, 1993). Não obstante, um extenso rol de moléculas bioativas consta sob o gênero *Eudistoma*, sendo que os alcalóides, especialmente aqueles derivados de aminoácidos, estão entre os grupos químicos de maior ocorrência.

Eudistominas e eudistomidinas são dois grupos representativos de alcalóides derivados de aminoácidos, estrutural e farmacologicamente relacionados, isolados, originalmente, de ascídias do gênero *Eudistoma*. Da espécie *E. olivaceum* foram isoladas as eudistominas A – T, que apresentaram atividades antibióticas, antivirais, antileucêmicas e indutoras da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo endoplasmático. As eudistomidinas A – F, obtidas de *E. glaucus*, demonstraram atividades relacionadas à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  e ao antagonismo da calmodulina (Rinehart *et al.*, 1984; 1987; Kinzer & Cardellina, 1987; Kobaiashi *et al.*, 1990; Murata *et al.*, 1991). O alcalóide bromado eudistalbina A, resgatado do extrato etanólico de *E. album*, é um derivado biossintético do triptofano e da leucina que demonstrou uma potente atividade citotóxica *in vitro* contra células de carcinoma epidermóide oral humano KB ( $\text{IC}_{50}$  5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Adesanya *et al.*, 1992). Os macrolídeos iejimalidas A – D isolados de *E. cf. rigida* são outro grupo de relevante citotoxicidade, especialmente entre as moléculas sulfatadas, iejimalidas C e D, que apresentaram potente atividade *in vitro* frente a células KB ( $\text{IC}_{50}$  de 4,2 e 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente) e de linfoma murino L1210 ( $\text{IC}_{50}$  de 1,0 e 0,58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente; Kobayashi *et al.*, 1988; Kikuchi *et al.*, 1991).

O fracionamento guiado pela atividade citotóxica em células tumorais do extrato de *E. vannamei* realizada no presente trabalho identificou, igualmente, a fase diclorometânica como a mais ativa, assim como concentrou a citotoxicidade entre as suas frações de polaridade intermediária (DCM 12 a DCM 16), eluídas da coluna de sílica com 100% de AcOEt ou a 10 ou 20% de MeOH. Vale ressaltar que, nos fracionamentos biomonitorados de extratos hidroalcoólicos obtidos de invertebrados marinhos realizados previamente pelo nosso grupo ou em colaborações externas, frações de polaridade intermediária são, comumente, as mais relevantes quanto à atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais (Wilke, 2005; Takeara, 2006; Ferreira, 2008; Nascimento, 2008).

O tratamento químico bioguiado da fração DCM 14 conduziu à separação de dois derivados homólogos e inéditos do grupo das estaurosporinas, obtidos em mistura equacionada e identificados como 2-hidroxi-7-oxoestaurosporina (**I**) e 3-hidroxi-7-oxoestaurosporina (**II**). Essas moléculas são montadas sobre o mesmo esqueleto indol-carbazol da estaurosporina e guardam-lhe grande semelhança estrutural, sendo que a carbonila ligada ao C7 e as hidroxilas ligadas aos C2 (**I**) ou C3 (**II**) respondem pelas diferenças.

As estaurosporinas formam um grupo de alcalóides indol-carbazol cuja molécula inaugural foi isolada em 1977 a partir do caldo de fermentação do actinomiceto *Streptomyces staurosporeus* (Omura *et al.*, 1977). A estaurosporina (STP) original foi rastreada dentro de um programa de *screening* direcionado à detecção de inibidores de proteína quinase C (PKC) a partir de actinomicetos isolados de amostras de sedimento coletados no Japão. Desde então, por sua alta afinidade com o receptor ATP-ligante do domínio catalítico, STP passou a ser o protótipo de inibidor de PKC - potente, embora pouco seletiva – amplamente empregada como ferramenta de pesquisa. Hoje, as estaurosporinas já formam um grupo de mais de 50 alcalóides estruturalmente relacionados, dentre produtos de ocorrência natural ou seus derivados sintéticos.

11-hidroxiestaurosporina e 3,11- dihidroxiestaurosporina foram isoladas da ascídia *Eudistoma* sp. coletada na costa da Itália. Ambos os compostos apresentam-se altamente citotóxicos sobre células tumorais em cultura, sendo que o último é também um inibidor de PKC, sendo ainda mais potente que a própria estaurosporina (Kinnel & Scheuer, 1992). Estaurosporina aglicona (K252-c) foi isolada de outra ascídia do gênero *Eudistoma* sp. coletada na costa oeste da África. K252-c apresentou forte inibição de 7 isoformas de PKC e atividade antiproliferativa em células leucêmicas (Horton *et al.*, 1994).

Em 1999 e 2002, Schupp e colaboradores publicaram o isolamento de 5 derivados inéditos de estaurosporina (3-hidroxi-4'-*N*-metilestaurosporina, 3-hidroxi-4'-*N*-demetilestaurosporina, 3'-demetoxi-3'-hidroxi-4'-*N*-demetilestaurosporina, 3-hidroxi-3'-demetoxi-3'-hidroxiestaurosporina e 11-hidroxi-4'-*N*-demetilestaurosporina) e outros 7 já descritos isolados da ascídia *Eudistoma toetalensis* e da planária do gênero *Pseudoceros* sp., reportado como o único animal co-habitando as colônias da ascídia dessa área, na Micronésia. Em 2001, um estudo abordando a atividade citotóxica de

alguns desses derivados que mostraram efeitos potentes, na ordem de nM (Schupp *et al.*, 2001).

Mais recentemente, Reyes e colaboradores (2008) descreveram o isolamento de outros 2 derivados inéditos de estaurosporina (7-oxo-3,8,9-trihidroxiestaurosporina e 7-oxo-8,9-dihidroxi-4'-*N*-demetilestaurosporina) a partir de extratos da ascídia *Cystodytes solidum*, coletada na Tanzânia. Os dois compostos apresentaram intensa citotoxicidade contra células tumorais, também na ordem de nM.

A mistura 2-hidroxi-7-oxoestaurosporina/3-hidroxi-7-oxoestaurosporina (**I/II**) mostrou sua expressiva citotoxicidade contra um largo painel de linhagens celulares, com IC<sub>50</sub> determinada na ordem de ng/mL. O presente estudo valeu-se, ainda, de STP, comercialmente disponível, para ladear-se à potente citotoxicidade observada para **I/II**, que foi ensaiada em 7 das 14 linhagens utilizadas neste estudo. **I/II** apresentou-se substancialmente mais ativa que STP em todas as linhagens comparadas, vindo a ser entre 1,5 e 14 vezes mais potente – mais freqüentemente, a razão IC<sub>50</sub> STP/IC<sub>50</sub> **I/II** foi calculada em torno de 7.

Todavia, no modelo de célula normal adotado, foi constatado que **I/II** e STP apresentaram efeito comparável sobre PBMC, com respectivas IC<sub>50</sub> de 341,6 e 366,0ng/mL. Vale ressaltar que a IC<sub>50</sub> obtida para PBMC, em relação a IC<sub>50</sub> calculada para as outras linhagens celulares tratadas com **I/II**, foi pelo menos 10 vezes maior, sendo que, em metade das linhagens comparadas, a razão calculada foi superior a 25. Aparentemente, **I/II** oferece alguma seletividade quanto ao seu efeito, se não favorecendo, necessariamente, a susceptibilidade das células tumorais, mas, pelo menos, condenando as células cuja taxa de proliferação seja mais elevada – ora, enquanto as PBMC controle, ainda que estimuladas pelo mitógeno, simplesmente duplicaram em número ao final das 72h, as células HL-60, por exemplo, praticamente quadruplicam.

Realmente, a robusta citotoxicidade, geralmente na ordem de nM, é característica comum às estaurosporinas e pode ser facilmente atribuída ao seu efeito inibitório sobre PKC. Ao mesmo tempo, as estaurosporinas são sabidas por afetar a distribuição das fases do ciclo celular de modo concentração-dependente, freqüentemente acarretando o acúmulo de células em G1 ou G2, sendo seguro generalizar que o bloqueio da divisão celular é um efeito típico e partilhado entre as moléculas desse grupo. Entretanto, foi postulado por Budworth & Gescher (1995) que, ainda que estejam as PKC engajadas na regulação de diversas vias de sinalização

celular, tais como proliferação e morte (Gescher, 1998; 2000), uma relação direta entre a inibição apenas de PKC e o truncamento do ciclo celular não pode ser estabelecida, ao menos para os análogos da estaurosporina.

E, de fato, as estaurosporinas, assim como moléculas estruturalmente próximas, interferem com o funcionamento das quinases de um modo geral. Calcula-se, pois, que sejam mais de 500 as proteínas quinases totais do genoma humano (Manning *et al.*, 2002) e que estas enzimas estejam envolvidas na regulação de praticamente qualquer via de sinalização celular, como proliferação, diferenciação, reparo de DNA, expressão gênica, metabolismo e apoptose. Em particular, as quinases regulatórias do processo de divisão celular, as Cdks, aparecem, freqüentemente, sujeitas à influência desses compostos (Sausville *et al.*, 2000).

À concentração de 40ng/mL, **I/II** mostrou um inconfundível e sustentado efeito citostático sobre a proliferação das células HL-60 ao longo de 72h de análise, mantendo praticamente constante o número de células do início ao final do tratamento sem, contudo, afetar demasiadamente a viabilidade da cultura. Este efeito citostático deve estar relacionado ao acúmulo ascendente de células em G2/M observado, substancialmente, a partir da análise de 24h. Este efeito foi consistente com o decréscimo da porcentagem de células em G0/G1 e S, até que, ao final das 72h, quase que a totalidade das células encontrava-se bloqueada em G2/M. Enquanto isso, apenas uma pequena parcela do DNA internucleossomal encontrava-se inserido na população sub-diplóide, sendo este efeito mais expressivo (18,83% de fragmentação) na análise de 72h. A redução significativa da viabilidade celular observada apenas com 72h de tratamento pode estar associada, em algum grau, à fragmentação nuclear detectada também neste ponto.

O efeito de STP sobre a progressão do ciclo celular de HL-60 mostrou uma cinética menos coerente e deveras diferenciada daquela induzida por **I/II**. Um bloqueio em G2/M quase completo (~ 81%) foi determinado após exposição das células a STP (200ng/mL) durante 24h, entretanto, uma crescente porcentagem de células poliplóides foi verificada, majoritariamente, com o aumento do tempo de tratamento. Não obstante, uma concentração de efeito citostático equiparável não foi determinada para STP e **I/II**, ao passo que o número e a viabilidade das células tratadas com STP assim como o bloqueio em G2/M e, conseqüentemente, a distribuição temporal das células das outras fases do ciclo celular foi inconstante e pouco coesa.

Alguns estudos direcionados à relação de estrutura e atividade sugerem que apenas poucas diferenças na estrutura de estaurosporinas e derivados podem alterar drasticamente o perfil de atividade e, principalmente, a seletividade quanto ao alvo de ação. UCN-01 (7-hidroxiestaurosporina) é um derivado sintético da estaurosporina cuja única diferença estrutural é resguardada pela hidroxila ligada ao C7. Essa modificação resultou numa menor citotoxicidade aliada a uma maior seletividade quanto à inibição de PKC quando comparado à STP (Takahashi *et al.*, 1987; 1989). CGP 41251 (N-benzoilestaurosporina), outro derivado sintético, além de mostrar-se pouco sensível aos efeitos da glicoproteína-P, responsável por modular a resistência da célula tumoral a quimioterápicos, possui maior afinidade a esta proteína e reverte o perfil MDR (*multidrug resistance*, do inglês, resistência a múltiplas drogas) com maior eficácia que STP ou UCN-01 (Budworth *et al.*, 1996).

Análises considerando estrutura e atividade, com resultados mais descritivos, inclusive, também foram realizadas com rebecamicina (REB) e derivados sintéticos. Rebecamicinas formam um grupo de compostos estruturalmente relacionados à STP e tiveram sua molécula original obtida a partir do caldo de fermentação do actinomiceto *Saccharothrix aerocolonigenes* isolado de amostras de sedimento coletadas no Panamá (Bush *et al.*, 1987). Ao esqueleto indol-carbazol, REB traz uma carbonila também no C7, duas halogenações (Cl em C1 e C11) e a ligação a apenas um N indólico do grupamento glicosil. Um estudo envolvendo análogos de REB e STP apontaram as diferenças estruturais que poderiam justificar tamanha diferença de funcionalidade dessas moléculas. REB e seus derivados apresentaram-se expressivamente menos ativos quanto à citotoxicidade em células tumorais, com  $IC_{50}$  na ordem de  $\mu M$ . Além disso, REB e outros derivados demonstraram pouca ou nenhuma inibição detectável sobre a função de  $PKC\alpha$  ao passo que STP apresentou um potente efeito, com  $IC_{50}$  2,8nM. Essa larga diferença foi atribuída à maior flexibilidade do anel hidropirazina de STP, que contém 7 em vez de 6 carbonos. Por outro lado, um derivado de REB declorado e cuja glicosila vinha ligada aos dois N indólicos, apresentou a maior capacidade de ligação ao DNA e partilhou com REB uma intensa inibição de topoisomerase I. A primeira verificação foi atribuída à eliminação dos átomos de Cl da estrutura, ao passo que a presença da carbonila em C7 foi relacionada tanto à ligação ao DNA como à inibição de topoisomerase I (Anizon *et al.*, 1998). Nem STP nem UCN-01 apresentaram atividade inibitória sobre topoisomerase I (Davies *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2000), o que

corroborar a hipótese da relevância da carbonila em C7 para a atividade anti-topoisomerase I. Assim, as propriedades biológicas das moléculas com esqueleto indol-carbazol podem ser atribuídas à função ligada ao heterociclo superior e à ligação do açúcar em um ou em ambos os N indólicos.

Ao tratamento com **I/II** (40ng/mL) por 24h seguido por remoção do estímulo e reincubação das células HL-60 por mais 24 ou 48h, foi verificada a manutenção irreversível do bloqueio em G2/M, tal como observado com 24h de tratamento. Interessantemente, ainda que apenas ~40% das células estivessem bloqueadas quando da remoção do estímulo, o número total de células manteve-se inalterado nas 24 ou 48h seguintes, enquanto o controle, como esperado, continuou proliferando. A exposição a **I/II** por períodos mais curtos (3, 6 ou 12h) indicou que o acúmulo de células em G2/M é proporcional ao tempo de incubação e que, após a remoção do estímulo, a porcentagem de células bloqueadas permanece estável. Vale destacar, pois, que o número de células nos grupos tratados manteve-se o mesmo em todas as análises, se com 3h de tratamento ou 24h. Mais adiante, mesmo com a retirada do estímulo e posterior reincubação de modo a concluir, sempre, 24h após o início do tratamento, a contagem de células não foi alterada em nenhuma das condições. Ora, se a porcentagem de células bloqueadas varia com o tempo do estímulo e o número total de células mantém-se inalterado independentemente do tempo do estímulo, pode-se sugerir, então, que o acúmulo em G2/M seja mais uma implicação do tratamento de células HL-60 com **I/II**, não sendo este o mote fundamental do efeito citostático, fase inespecífico e também irreversível, aqui observado. Enfim, a constatação da viabilidade das células assim como a fragmentação internucleossomal mostraram-se, respectivamente, significativa e mais expressiva na análise realizada 48h após a remoção do estímulo de 24h - somando-se 72h desde a exposição inicial das células ao tratamento com **I/II**. Apenas no tratamento contínuo por 72h é que foram verificadas diferenças significativas quanto à redução da viabilidade celular e ao aumento substancial da fragmentação nuclear, indicando, assim, que a indução de morte celular só está calhando 72h após o início do tratamento, portanto o estímulo continuado não deve ser um fator relevante para sustentação do número de células.

Dependendo da concentração, STP pode bloquear o ciclo celular em G1 ou em G2, sendo que o senso comum preza que baixas concentrações bloqueiam em G1 e concentrações maiores bloqueiam em G2, e que o bloqueio em G1 ocorre,

preferencialmente, em células normais (Crissmam *et al.*, 1991; Akinaga *et al.*, 1994). Nessas circunstâncias, STP mostrou-se reversível, inclusive com pretensões de uso em modelos de sincronização celular (Bruno *et al.*, 1996). Por outro lado, a parada em G2 foi, em alguns casos, completa e reversível. Em outros casos, a constatação de células poliplóides indica que, além de irreversível, STP pode ainda admitir a re-entrada do núcleo no ciclo celular sem que ocorra a citocinese (Abe *et al.*, 1991; Gadbois *et al.*, 1992; Traganos *et al.*, 1994). De fato, células HL-60 poliplóides também foram verificadas no presente estudo quando tratadas com 100 ou 200ng/mL STP.

A 80ng/mL, **I/II** demonstrou-se citotóxica sob os mesmos parâmetros de análise, promovendo uma redução do número células e, mais drasticamente, a diminuição continuada da viabilidade após a 12<sup>a</sup> hora. A visualização de células sub-diplóides foi detectada a partir da análise com 6h e permaneceu crescente até a análise de 72h. Nem a fragmentação nuclear nem a redução da viabilidade celular apresentaram relação óbvia com alguma fase específica do ciclo celular.

A fragmentação nuclear, juntamente à condensação da cromatina, está relacionada à indução de morte celular por apoptose. Outras características estruturais típicas são a redução do volume celular e do conteúdo citoplasmático e a formação de *blebs* na membrana plasmática, que, tomadas em conjunto, levam, finalmente à formação de corpos apoptóticos. Bioquimicamente, a apoptose é tida como a morte celular programada, executada por uma família de proteases – as caspases – que, à ativação, regulam o desmonte da célula de maneira precisa e orquestrada, e este é o distintivo inconfundível do processo de apoptose (revisado por Blank & Shiloh, 2007).

A rigor, essa descrição costumada de apoptose é, de fato, a seqüência mais típica, mas representa apenas uma das vias alistadas ao processo de morte celular. A elucidação de outras vias está decompondo a noção clássica de morte celular programada, seja ela espontânea ou induzida. Recentemente, 8 categorias diferentes de morte celular são conhecidas, e quase que a totalidade delas é tida como programada (Kroemer *et al.*, 2005).

Enquanto a contagem de DNA sub-diplóide ou a visualização de núcleo fragmentado e hiper-condensação da cromatina são sugestivos de apoptose, a demonstração isolada de alterações estruturais sem a comprovação adicional de eventos bioquímicos associados à apoptose (tais como ativação de caspases ou clivagem dos seus substratos) não são suficientes para definir o processo observado como apoptótico

(Widlak *et al.*, 2003; Kroemer & Martin, 2005). Desse modo, a distinção entre apoptose e necrose a nível celular pode ser de difícil reconhecimento, posando, inclusive, como objeto de muitos embates. Ambos os processos compartilham muitas das características estruturais, podem ser causa ou conseqüência um do outro e até podem vir sobrepostos numa mesma célula. De qualquer sorte, formalmente, a ostentação de certos distintivos são designados à apoptose ou à necrose, sendo o principal deles, a perda da integridade de membrana da célula necrótica, ao passo que as células em apoptose mantêm suas membranas íntegras até os últimos estágios do processo (Masquelier *et al.*, 2004).

A translocação da fosfatidilserina (PS), um fosfolípídeo da membrana plasmática, para a face externa da membrana é um dos primeiros eventos bioquímicos desencadeado após a ativação das caspases, portanto carrega uma intrínseca relação à indução de apoptose. No processo fisiológico, a externalização da PS permite o rápido reconhecimento das células apoptóticas pelos macrófagos e demais células circundantes, marcando-as para fagocitose.

A translocação tempo-dependente da PS para a parte externa da membrana plasmática, permitindo o reconhecimento de células em apoptose inicial e tardia, foi detectada para o tratamento de HL-60 com 80ng/mL **I/II**, mas foi pouco expressiva para o tratamento com 40ng/mL.

STP, além de sua função inibitória sobre proteínas quinases, é também reconhecida por sua ubíqua ativação de apoptose, atuando sobre variados alvos que culminam, eventualmente, em apoptose celular; inclusive é uma difundida ferramenta experimental utilizada em modelos para estudos de indução de apoptose. Interessantemente, o estudo realizado por Heerd *et al.* (2000), sugere que a iniciação do processo de apoptose de células da linhagem do carcinoma do cólon SW620 não seja necessariamente uma resposta ao bloqueio em G2/M induzido por STP. O referido trabalho mostra, ainda, que sinais de apoptose celular são evidenciados consideravelmente antes de ocorrer o bloqueio no ciclo celular.

A ativação das caspases, sobretudo das caspases efetoras 3 e 7, é, de fato, o principal distintivo bioquímico para a caracterização do processo de apoptose. Este fenômeno demarca, necessariamente, o comprometimento irreversível da célula à morte. **I/II** a 80ng/mL induziu um efeito tempo-dependente sobre a expressão das procaspases e da ativação das caspases 3 e 7, mas não operou sobre a caspase 9.

Ao passo que as caspases efetoras 3 e 7 estão envolvidas em praticamente qualquer via de indução de apoptose, o acionamento da caspase 9 responde, sobremaneira, aos estímulos advindos da ativação da via intrínseca de indução de apoptose. A via intrínseca é desencadeada pela despolarização do potencial eletroquímico no espaço intermembrana da mitocôndria ( $\Delta\Psi_m$ ) e conseqüente inibição de Bcl-2 e Bcl-xL, e liberação de citocromo c, smac/diablo e diversos outros fatores pró-apoptóticos que incitam a autoclivagem de caspase 9.

Do tratamento com 80ng/mL **I/II**, onde as células já apresentam diversas características típicas de apoptose, apenas uma leve, ainda que significativa alteração do  $\Delta\Psi_m$  foi registrada. Este fato, unicamente, não é suficiente para descartar o envolvimento da via intrínseca na indução de morte por **I/II**. A alteração do  $\Delta\Psi_m$  é parte dos eventos primordiais que desencadeiam a morte celular se este processo está vinculado ao sensor mitocondrial e, nos pontos temporais considerados para análise, a população das células tratadas já apresentava propriedades distintas de um estágio apoptótico consideravelmente instalado e não necessariamente inicial, quando se esperaria a observação de um efeito mais expressivo. Todavia, a expressão de procaspase 9 aparece bastante reduzida, enquanto que a forma ativada da enzima apresenta expressão relevante, sugerindo o implicação de caspase 9 neste evento.

Características estruturais ou bioquímicas compatíveis com apoptose são, se tanto, apenas parcamente anunciadas, e a via intrínseca tampouco se mostra substancialmente ativada à exposição das células HL-60 a 40ng/mL **I/II**. Entretanto, pareado a esta observação, pode-se notar o aumento tempo-dependente da expressão de procaspase 9, ainda que não necessariamente de seus produtos de clivagem, se comparados ao controle. Desse modo, é adequado conjecturar quanto ao envolvimento da via intrínseca no disparo da apoptose, quando conveniente, de células HL-60 tratadas com **I/II**.

Diversos modelos experimentais demonstraram que a indução de apoptose por STP envolve a ativação de caspase 3 (Higuchi *et al.*, 1997; Mahajan *et al.*, 1999). Paralelamente, outros estudos descreveram a alteração no  $\Delta\Psi_m$  induzido por STP (Polyak *et al.*, 1997; Kruman *et al.*, 1998; Ahlemeyer & Krieglstein, 1998; 2000) e relacionaram a geração de espécie reativas de oxigênio (ROS) a este efeito. O estudo realizado por Heerdt *et al.* (2000) mostrou, em células SW620, que a ativação de caspase 3 em resposta a STP ocorre durante as primeiras horas de exposição ao passo

que, simultaneamente, detectou-se alteração no  $\Delta\Psi_m$  e aumento da expressão de citocromo c, além de bloqueio em G2/M. Entretanto, estes efeitos não foram relacionados à ativação de caspase 9. Mais além, a reversão da despolarização do  $\Delta\Psi_m$  não alterou nem a iniciação de apoptose nem a indução do bloqueio do ciclo celular.

O dano ao DNA pode emanar de processos fisiológicos naturais, como estresse celular metabólico levando à produção de radicais livres ou do mau-funcionamento pontual de enzimas que cuidam da sua replicação e reparo. Entretanto, mais comumente, o dano em DNA decorre de fontes externas capazes de induzir estresse genotóxico, como radiação e exposição a toxinas (revisado por Berra *et al.*, 2006). À detecção de dano em DNA, em células saudáveis, duas estratégias podem ser acessadas: ou o dano é reparado ou a célula é induzida à morte (Roos & Kaina, 2006). A maioria dos tumores exibe deficiência nas vias de indução de morte, de modo que a tolerância ao dano ao DNA não-reparado é um evento intimamente ligado à transformação maligna das células (Kultz, 2005).

As quinases ATM e ATR parecem estar envolvidas no acionamento das vias de reparo em resposta a vários tipos de dano genotóxico em células eucarióticas. Em particular, o dano de dupla fita (DSB) é entendido como o mais comprometedor à estabilidade genética celular se tolerado, de modo que a incapacidade de reparo deste tipo de dano induz, em células saudáveis, a morte celular, frequentemente por apoptose. ATM é o principal sensor de DSB (Ismail *et al.*, 2005). Ao reconhecimento do dano, ATM é rapidamente autofosforilada e segue ativando tanto proteínas centrais à indução e sustento do bloqueio da divisão celular como aquelas relacionadas ao rastreamento do dano e execução do reparo (Lee & Paull, 2007; Tang *et al.*, 2008).

**I/II** induziu DSB tempo- e concentração-dependentes em células HL-60. Enquanto que o tempo de tratamento influenciou o número de células que apresentaram lesões de nível baixo, mas não necessariamente a extensão do dano induzido por 40ng/mL, o tratamento com 80ng/mL induziu, ainda, danos de nível médio e alto com o passar do tempo. A expressão de p-H2A.X mostrou-se alta e relativamente constante com o tratamento com 80ng/mL, ao passo que, a 40ng/mL pode ser observado um aumento gradual da sua expressão. A ativação da histona H2A.X é um marcador chave para o reconhecimento de DSB e acredita-se que sua principal função esteja relacionada com o reconhecimento do sítio do dano (Stucki *et al.*, 2005).

Por outro lado, a ativação de ATM foi reduzida com o tempo de incubação nos dois tratamentos, ainda que, com 80ng/mL **I/II**, a detecção de p-ATM tenha sido pouco expressiva. A ativação de BRCA1 só foi detectada nas células tratadas com 40ng/mL **I/II** e, ainda assim, foi reduzida com o tempo de incubação. BRCA1 possui múltiplos sítios de fosforilação e pode ser ativada por diversas quinases, entre elas, ATM, ATR, Chk2 e Cdks (Tirkkonen *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999; Ouchi, 2006). Cada circunstância induz uma resposta celular diferente, mas todas são ligadas a DSB. Em resposta ao DSB, BRCA1 é fosforilada e translocada ao local do dano aonde, aparentemente, exerce um papel fundamental nas etapas iniciais de recrutamento de proteínas de reparo.

A via de sinalização sequencial que liga o dano em DNA ao bloqueio do ciclo celular é altamente conservada nas células eucarióticas e envolve posterior ativação de Chk1 e Chk2, p21 e p53 (revisado por Berra *et al.*, 2006). p53 recebeu uma vez a alcunha de “guardião do genoma” (Lane, 1992) devido à sua ubíqua participação em vias de regulação do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose. Todavia, mutações ou nulidade na expressão de p53 são conhecidas em uma ampla proporção dos tumores (Vogelstein & Kinzler, 1992). Não obstante, tanto células normais como células tumorais podem decidir por vias independentes de p53 para cumprir essas funções (Roos *et al.*, 2007). A célula HL-60 é p53 nula e, como visto, se consideradas independentemente, a indução da parada em G2/M por **I/II**, ativação das caspases e a expressão de proteínas relacionadas ao reparo de DNA foram eficientes.

Shao *et al.* (1997) demonstraram que UCN-01 foi capaz de induzir apoptose tanto em células derivadas de carcinoma de cólon como de leucemias independentemente de p53. Mais além, um substancial bloqueio em G2/M foi verificado quando da exposição à UCN-01 de células com disfunção ou nulidade em p53 (Wang *et al.*, 1996).

Estudos envolvendo vias p53-independentes de indução de bloqueio da divisão celular ressaltaram que estas operavam, preferencialmente, na transição de G2 para M, mediada pela via ATM/ATR – Chk1/Chk2 – Cdc25C – CycB/Cdk1 (Russell *et al.*, 1995; Fan *et al.*, 1995).

O bloqueio cumulativo de células HL-60 em G2/M induzido por 40ng/mL **I/II** sugere a participação exatamente de moléculas dessa via. As quinases Chk1 e Chk2 são as principais reguladoras dos pontos de checagem do ciclo celular que respondem ao dano em DNA (revisado por Berra *et al.*, 2006). Chk1, em especial, modula a

ativação/desativação das Cdc25 que, por sua vez, atuam na ativação/desativação das Cdks que regulam o cumprimento das fases ou a transição de uma fase para a seguinte no ciclo celular. Precisamente, acredita-se em 4 pontos de checagem no ciclo celular - em G1-S, S, G2-M e M; todos respondem ao dano em DNA e envolvem, em alguma instância, o controle por Chk1/Chk2 (revisado por Scott & Pandita, 2006).

Cdc25C permanece inativa no citoplasma durante a maior parte da interfase celular e é translocada para o núcleo durante a fase G2 aonde irá desfosforilar Cdk1, ativando-a. Em resposta ao dano em DNA, Cdc25C é fosforilada pela Chk1 ativada, assim impedindo o seu transporte para o núcleo e, conseqüentemente, a ativação do complexo CycB/Cdk1 (Sanchez *et al.*, 1997). Ao tratamento com **I/II**, a expressão de p-Cdc25C foi detectada apenas quando as células HL-60 foram submetidas à concentração citostática, juntamente com o aumento da expressão de CycB, da forma inativa de Cdk1 e das células em G2/M.

Pode-se ressaltar, pois, que enquanto o tratamento citostático com **I/II** induziu a expressão de proteínas ligadas tanto ao reconhecimento como ao reparo do dano, o tratamento citotóxico, que induziu danos de extensão mais ampla, teve maior influência sobre a expressão sustentada apenas das proteínas indicadoras de dano. Ora, se DSB levam, em última instância, à morte celular, a indução de vias de reparo pode ser ponderada como um mecanismo anti-apoptótico transitório. A ativação de vias de reparo após detecção de dano é, grosso modo, determinada pela extensão deste dano, uma vez que, à exagerada extensão ou à falência do reparo, ATM participa, ainda, na indução de apoptose celular.

A parada em G2/M provocada por UCN-01 foi creditado à sua particular seletividade para Chk1, bloqueando a sua função quinase e inibindo a resposta celular seqüencial à convocação do ponto de checagem de dano em DNA que ocorre no limiar de G2 e M (Graves *et al.*, 2000; Levesque *et al.*, 2008). Em um estudo considerando três moléculas estruturalmente relacionadas, UCN-01, STP e SB-218078 (outro derivado de estaurosporina que traz uma carbonila ligada ao C7), atribuiu a maior afinidade de UCN-01 por Chk1 à ligação da hidroxila ao C7. Em concentrações mais elevadas, UCN-01 bloqueou, ainda, a função de Cdk 2 e 1, nessa ordem de potência. STP mostrou-se igualmente potente sobre a inibição de Cdk 1 e 2, seguido, contiguamente, por Chk1 (Zhao *et al.*, 2002).

À instalação do processo de apoptose, ATM passa a ser também substrato das caspases efetoras (Smith *et al.*, 1999). A clivagem de ATM desmonta um sensor central na detecção de dano em DNA, inibindo toda a cascata seqüencial que ativaria, eventualmente, as vias de reparo. A 80ng/mL, **I/II** induziu o incremento tempo-dependente, mas substancial desde a análise com 24h de tratamento, da expressão das procaspases efetoras e dos seus respectivos produtos de clivagem, fornecendo os indícios moleculares para a confirmação de morte por apoptose. Isso justifica a redução tempo-dependente da expressão de ATM pelas células HL-60 experimentadas sob estas condições. PARP também se configura entre os substratos das caspases efetoras, sendo, inclusive, um marcador freqüentemente utilizado para a verificação de células em apoptose. De fato, a expressão de PARP íntegro, que atua também no reparo de danos de fita simples de DNA (Modjtahedi *et al.*, 2006), tem sua expressão aumentada em 24h e reduzida de maneira tempo dependente ao tratamento com 80ng/mL **I/II**, ao passo que a expressão de seus produtos de clivagem se mantém elevada e constante.

A maior parte dos tumores apresenta resposta deficiente no ponto de checagem em G1-S devido à função ou expressão corrompida de p53 e pRb. Essas proteínas, freqüentemente, aparecem alteradas em células neoplásicas e o ponto de checagem em G1-S é mais susceptível à regulação por esses fatores. Desse modo, ao passo que a deficiência de p53 ou pRb equipa as células tumorais com uma vantagem na sobrevivência, também induz à absoluta dependência no ponto de checagem em G2-M como principal mecanismo de resposta a dano em DNA (Levine, 1997; Carrassa *et al.*, 2004). As células normais apóiam-se, primariamente, no ponto de checagem em G1-S como proteção contra a perpetuação de danos em DNA – um fator essencial no desencadeamento da carcinogênese –, enquanto as células tumorais, comumente, apóiam-se na checagem em G2-M. Assim, o bloqueio em G2 pode sensibilizar as células tumorais a concentrações menores de determinados agentes indutores de dano em DNA e, usados em terapia combinada, oferecer uma interessante estratégia de seletividade, quiçá protegendo as células normais (Russell *et al.*, 1995; Sunganuma *et al.*, 1999; Kawabe, 2004).

UCN-01 é um dos agentes farmacológicos de maior relevância clínica, ainda que em fase experimental, que opera sobre a função das CDKs. Foi observada, do tratamento combinado de diversas linhagens celulares, a relação sinérgica de UCN-01 e tiotepa, mitomicina C, topotecan, gentitabina, 5-fluorouracil, fludarabina e melfalan,

indicando que essa substância é capaz de sensibilizar alguns tipos celulares aos efeitos lesivos ao DNA induzidos por quimioterápicos alquilantes ou antimetabólicos. Por outro lado, a combinação com antimitóticos – paclitaxel e vincristina – ou inibidores da enzima topoisomerase II – doxorubicina e etoposida – não resultou em sinergismo, mas simplesmente no incremento da citotoxicidade destes fármacos. Mais além, foi demonstrado, pois, que os efeitos sinérgicos de UCN-01 com agentes alquilantes estavam vinculados à circunstância da célula quanto à funcionalidade de p53, sendo as linhagens mais susceptíveis aquelas que traziam mutações ou nulidade na expressão de p53. Contrastando com este achado, os efeitos sinérgicos entre UCN-01 e os antimetabólicos não apresentaram relação significativa com a condição de p53 (Monks *et al.*, 2000). Atualmente, esse composto é candidato a fármaco quimioterápico em terapia combinada e atravessa diversos protocolos de testes clínicos de fases 1 e 2 ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

Idealmente, o ponto alto do estudo das vias de sinalização e na transdução de sinal seria o entendimento completo dos eventos de fosforilação protéica intracelular e como estas respostas afetam o comportamento celular (Hanks, 2003). Ao passo que a mera identificação individual de cada quinase já posa como tarefa difícil, concluir a caracterização pormenorizada de cada via e de cada enzima de cada via parece ainda paira longinquamente de ser alcançada. Entretanto, o reconhecimento de compostos seletivos a determinadas quinases podem ser de crucial aplicação à distinção dos diversos subgrupos de proteínas quinases e na elucidação das respectivas semelhanças ou diferenças. Por exemplo, o domínio protéico envolvido na identificação do substrato protéico varia entre as quinases distribuídas entre as diversas categorias (Hanks *et al.*, 1988; Hanks, 2003).

O mau-funcionamento de determinadas quinases está vinculado ao processo etiológico de diversas patologias, inclusive e de modo especial, no câncer. Uma compreensão mais abrangente do chamado “quinoma humano” será terminantemente benéfica frente ao esclarecimento de processos patológicos e, principalmente, à confecção de fármacos direcionados especificamente às enzimas envolvidas no desequilíbrio da homeostase celular (Hanks *et al.*, 1988; Manning *et al.*, 2002).

Finalmente, tomando-se por base os achados do presente estudo, aliados aos elementos disponíveis na literatura especializada referente aos alvos celulares de estaurosporinas e moléculas estruturalmente relacionadas, aqui expostos, faz-se adequado sugerir, para a mistura **I/II**, que:

1) O dano em DNA observado pode ser decorrência de uma interação direta de **I/II** ao DNA ou à topoisomerase, induzindo estresse replicativo e parada do ciclo celular;

2) A parada sustentada e irreversível em G2/M pode ser decorrente da resposta ao dano em DNA e à conseqüente ativação das vias de reparo, mantendo, assim, o ciclo bloqueado;

3) O bloqueio em G2/M pode ser resultado da interação de **I/II** com quinases responsáveis pelo controle da progressão do ciclo celular, acarretando parada da divisão celular seguido por estresse celular em nível bioquímico e, naturalmente, por dano em DNA;

4) A leve alteração do potencial transmembrana mitocondrial pode ser ocasionado com reflexo do dano em DNA. Vale arriscar, pois, que a mitocôndria esteja centralmente envolvida no processo de indução de apoptose celular por **I/II** em algum estágio mais precoce do que aqueles que foram analisados;

5) Em concentrações elevadas, **I/II** perde o efeito citostático e dá lugar a um efeito de natureza citotóxica devido à perda da seletividade por seu alvo de ação, tratando este como uma enzima funcional, ou à indução exagerada de dano ao DNA, e

6) Em resposta a um extenso nível de dano ao DNA em decorrência direta ou indireta da ação de **I/II**, a ativação de vias de reparo é superposta pela indução de morte celular, levando a célula a iniciar seu processo de apoptose.

## CONCLUSÕES

A prospecção de compostos bioativos em invertebrados marinhos da costa do Ceará revelou a ascídia *Eudistoma vannamei* como uma atraente fonte de substâncias citotóxicas. O fracionamento bioguiado de seu extrato bruto levou à identificação de dois derivados inéditos de estaurosporina (7-oxo-2-hidroxiestaurosporina e 7-oxo-3-hidroxiestaurosporina), cuja expressiva citotoxicidade *in vitro* oferece notória seletividade direcionada às células tumorais. Diante das células leucêmicas HL-60, o efeito citostático dos compostos em questão resulta do bloqueio irreversível do ciclo celular e da indução de danos leves ao DNA, de onde emana, em resposta, a ativação de vias de reparo. Mediante exposição a concentrações elevadas, efeitos citotóxicos fazem-se evidentes e parecem surgir da intensificação do dano ao DNA e conseqüente superposição da via de reparo pela indução de morte por apoptose. Os achados aqui descritos, particularmente, reforçam a relevância das fontes marinhas frente ao arsenal de moléculas naturais com propriedades biomédicas ou instrumentais e validam o litoral cearense como reservatório de um substancial potencial na prospecção de novas moléculas de interesse farmacológico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe K, Yoshida M, Usui T, Horinouchi S, Beppu T (1991) Highly synchronous culture of fibroblasts from G2 block caused by staurosporine, a potent inhibitor of protein kinases. *Exp Cell Res* 192, 122-127.

Adesanya SA, Chbany M, Pais M, Debitus C (1992) Brominated beta-carbolines from the marine tunicate *Eudistoma album*. *J Nat Prod* 55, 525-527.

Ahlemeyer B & Krieglstein J (1998) Retinoic acid reduces staurosporine-induced apoptotic damage in chick embryonic neurons by suppressing reactive oxygen species production. *Neurosci Lett* 246, 93-96.

Ahlemeyer B & Krieglstein J (2000) Inhibition of glutathione depletion by retinoic acid and tocopherol protects cultured neurons from staurosporine-induced oxidative stress and apoptosis. *Neurochem Int* 36, 1-5.

Akinaga S, Nomura K, Gomi K, Okabe M (1994). Effect of UCN-01, a selective inhibitor of protein kinase C, on the cell cycle distribution of human epidermoid carcinoma, A 431 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 33, 273-280.

Anizon F, Moreau P, Sancelme M, Voldoire A, Prudhomme M, Ollier M, Severe D, Riou JF, Bailly C, Fabbro D, Meyer T, Aubertin AM (1998). Syntheses, biochemical and biological evaluation of staurosporine analogues from the microbial metabolite rebeccamycin. *Bioorg Med Chem* 6, 1597-1604.

Bergmann W & Burke DC (1955) Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymadine and spongouridine. *J Org Chem* 20, 1501-1507.

Bergmann W & Burke DC (1956) Contributions to the study of marine products. XL. The nucleosides of sponges. *J Org Chem* 21, 226-228.

Bergmann W & Feeney RJ (1951) Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. *J Org Chem* 16, 981-987.

Bergmann W & Stempien Jr MF (1957) Contributions to the study of marine products. XLIII. The nucleosides of sponges. V. The synthesis of spongosine. *J Org Chem* 22, 1575-1577.

Berlinck RGS, Britton R, Piers E, Lim L, Roberge M, Rocha RM, Andersen RJ (1998) Granulatimide and isogranulatimide, aromatic alkaloids with G2 checkpoint inhibition activity isolated from the Brazilian ascidian *Didemnum granulatum*: structure elucidation and synthesis. *J Org Chem* 63, 9850-9856.

Berlinck RGS, Hajdu E, Rocha RM, Oliveira JHHL, Hernández ILC, Selegim MHR, Granato AC, Almeida EVR, Nuñez CV, Muricy G, Peixinho S, Pessoa C, Moraes MO, Cavalcanti BC, Nascimento GGF, Thiemann O, Silva M, Souza AO, Silva CL, Minarini PRR (2004) Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. *J Nat Prod* 67, 510-522.

Berra CM, Menk CFM, Mascio P (2006) Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Quim Nova* 29, 1340-1344.

Blank M & Shiloh Y (2007) Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* 6, 686-695.

Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR (2009) Marine natural products. *Nat Prod Rep* 25, 170-244.

Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR (2008) Marine natural products. *Nat Prod Rep* 25, 35-94.

Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MH, Northcote PT, Prinsep MR (2007) Marine natural products. *Nat Prod Rep* 24, 31-86.

Bonfanti M, La Valle E, Sousa-Faro, JMF, Faircloth G, Caretti G, Mantovani R, D'Incalci M (1999) Effect of ecteinascidin-743 on the interaction between DNA binding proteins and DNA. *Anti-Cancer Drug Des* 14, 179-186.

Britton R, Oliveira JHHL, Andersen RJ, Berlinck RGS (2001) Granulatimide and 6-Bromogranulatimide, minor alkaloids from the Brazilian ascidian *Didemnum granulatum*. *J Nat Prod* 64, 254-255.

Broggini M, Marchini SV, Galliera E, Borsotti P, Taraboletti G, Erba E, Sironi M, Jimeno J, Faircloth GT, Giavazzi R, D'Incalci M (2003) Aplidine, a new anticancer agent of marine origin, inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and blocks VEGF-VEGFR-1 (flt-1) autocrine loop in human leukemia cells MOLT-4. *Leukemia* 17, 52-59.

Bruno S, Traganos F, Darzynkiewicz Z (1996) Cell cycle synchronizing properties of staurosporine. *Meth Cell Sci* 18, 99-107.

Budworth J & Gescher A (1995) Differential inhibition of cytosolic and membrane-derived protein kinase C activity by staurosporine and other kinase inhibitors. *FEBS Lett* 362, 139-142.

Budworth J, Davies R, Malkhandi J, Gant TW, Ferry DR, Gescher A (1996) Comparison of staurosporine and four analogues: their effects on growth, rhodamine 123 retention and binding to P-glycoprotein in multidrug-resistant MCF-7/Adr cells. *Br J Cancer* 73, 1063-1068.

Bush JA, Long BH, Catino JJ, Bradner WT, Tomita KJ (1987) Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent. *Antibiotics* 40, 668-670.

Butler M & Dawson M (1992) Initiation and maintenance of cultures. In: *Cell culture*. Bios Scientific Publishers, Oxford, 25-42.

Cardilo-Reis L, Cavalcante MCM, Silveira CBM, Pavão MSG (2006) *In vivo* antithrombotic properties of a heparin from the oocyte test cells of the sea squirt *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). *Braz J Med Biol Res* 39, 1409-1415.

Carrassa L, Broggin M, Erba E, Damia G (2004) Chk1, but not Chk2, is involved in the cellular response to DNA damaging agents: differential activity in cells expressing or not p53. *Cell cycle* 3, 1177-1181.

Cavalcante MC, Andrade LR, Du Bocage Santos-Pinto C, Straus AH, Takahashi HK, Allodi S, Pavão MSG (2002) Colocalization of heparin and histamine in the intracellular granules of test cells from the invertebrate *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). *J Struct Biol* 137, 313-321.

Clardy J & Walsh C (2004) Lessons from natural molecules. *Nature* 432, 829-837.

ClinicalTrials.gov. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), acessado em 25.04.2009

Conrad HE (1998) Structures of heparinoids. In: *Heparin-binding proteins*, Academic Press, San Diego, 7-60.

Costa LV, Malpezzi ELA, Berlinck RGS, Rowan EG, Freitas JC (1997) The histamine-like effects of *Phallusia nigra* extracts: evidences for direct activity at H1 receptor. *Comp Biochem Physiol C 117*, 111-115.

Costa, LV, Malpezzi, ELA, Matsui, DH, Machado-Santelli, GM, Freitas, JC (1996). Cytotoxic activity of a methanol extract of *Phallusia nigra* (Tunicata, Ascidiacea). *Braz J Med Biol Res 29*, 367-373.

Costa-Lotufo LV, Pessoa C, Moraes MEA, Moraes OM, Alemida AMP, Lotufo TMC (2006) Marine organisms from Brazil as source of potential anticancer agents. In: Khan MTH & Ather A. *Lead molecules from natural products - Discovery and new trends*, Elsevier, Amsterdã, 181-196.

Costa-Lotufo LV, Wilke DV, Jimenez PC, Epifânio RA (2009) Organismos marinhos como fonte de novos fármacos - histórico & perspectivas. *Quim Nova 32*, 703-716.

Cragg GM & Newman DJ (2000) Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert Opin Investig Drugs*, 1-15.

Cragg GM, Newman DJ, Snader KM (1997) Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod 60*, 52-60.

Cragg GM, Newman, DJ, Snader KM (2003) Natural products as source of new drugs over the period of 1981 - 2002. *J Nat Prod 66*, 1022-1037.

Crampton SL, Adams EG, Kuentzel SL, Li LH, Badiner G, Bhuyan BK (1984) Biochemical and cellular effects of didemnins A and B. *Cancer Res 44*, 1796-1801.

Crissman HA, Gadbois DM, Tobey RA, Bradbury EM (1991) Transformed mammalian cells are deficient in kinase-mediated control of progression through the G1 phase of cell cycle. *PNAS 88*, 7580-7584.

Damia G, Silvestri S, Carrassa L, Filiberti L, Faircloth GT, Liberi G, Foiani M, D'Incalci M (2001) Unique pattern of ET-743 activity in different cellular systems with defined deficiencies in DNA-repair pathways. *Int J Cancer 92*, 583-588.

Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry 13*, 795-808.

Davidson BS (1993) Ascidiens: producers of amino acid derived metabolites. *Chem Rev* 93, 1771-1791.

Davies SP, Reddy H, Caviano M, Cohen P (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351, 95-105.

Davis AR & Wright AE (1989) Interspecific differences in fouling of two congeneric ascidians (*Eudistoma olivaceum* and *E. capsulatum*): is surface acidity an effective defense? *Mar Biol* 102, 491-497.

Dewick PM (2002) The acetate pathway: fatty acids and polyketides. In: *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 2<sup>a</sup> ed. Wiley, Londres, 35-120.

Dietzmann GR (1997) The marine environment as a discovery resource in high throughput screening: the discovery of bioactive substances. In: Devlin JP. *High throughput screening: the discovery of bioactive substances*. Marcel Dekker Inc., Nova Iorque, 99-144.

Erba E, Bergamaschi D, Bassano L, Damia G, Ronzoni S, Faircloth GT, D'Incalci M (2001) Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound with a unique mechanism of action. *EJC* 37, 97-105.

Erba E, Serafini M, Gaipa G, Tognon G, Marchini S, Celli N, Rotilio D, Brogini M, Jimeno J, Faircloth G, Biondi A, D'Incalci M (2003) Effect of aplidin in acute lymphoblastic leukaemia cells. *Br J Cancer* 89, 763-73.

European Medicines Agency. [www.emea.europa.eu](http://www.emea.europa.eu), acessado em 25.04.2009

Fan S, Smith ML, Rivet DJ 2nd, Duba D, Zhan Q, Kohn KW, Fornace AJ Jr, O'Connor PM (1995) Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Res* 55, 1649-1654.

Farnsworth NR (1985) Medicinal plants in therapy. *Bull WHO* 63, 965 - 981.

Faulkner DJ (2000) Marine Pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 135-145.

Feher M & Schmidt JM (2003) Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J Chem Inf Comput Sci* 43, 218-227.

Fenical (1974) Geranyl hydroquinone, a cancer protective agent from the tunicate *Aplidium* sp. In: Worten LR. *Food-Drugs from the Sea Proceedings*, Marine Technology Society, Washington, DC, 388.

Fenical W & Jensen PR (2006) Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat Chem Biol* 2, 666-673.

Fenical W (1997) New pharmaceuticals from marine organism. *Mar Biotechnol*, 339-341.

Ferreira EG (2008) Fracionamento bioguiado do extrato bruto da esponja marinha *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864) coletada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, CE. Monografia de graduação. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 46pp.

Gadbois DM, Crissman HA, Tobey RA, Bradbury EM (1992) Multiple kinase arrest points in the G1 phase of nontransformed mammalian cells are absent in transformed cells. *PNAS* 89, 8626-8630.

Gandra, M.; Cavalcante, M. C. M.; Pavão, M. S. G. 2000. Anticoagulant sulfated glycosaminoglycans in the tissues of the primitive chordate *Styela plicata* (Tunicata). *Glycobiology* 10, 1333-1340.

Garcia-Rocha M, Bonay P, Avila J (1996) The antitumoral compound Kahalalide F acts on cell lysosomes. *Cancer Lett* 99, 43-50.

Gescher A (2000) Staurosporine analogues - pharmacological toys or useful antitumour agents? *Crit Rev Oncol Hematol* 34, 127-135.

Gesher A (1998) Analogs of staurosporine: potential anti-cancer drugs? *Gen Pharmac* 31, 721-728.

Givan AL (2001) Seeing the light: lasers, fluorochromes and filters. In: *Flow cytometry: first principles*, 2<sup>a</sup> ed. Wiley-Liss Inc., Nova Iorque, 59-80.

Gomez SG, Bueren JA, Faircloth GT, Jimeno J, Albella B (2003) In vitro toxicity of three new antitumoral drugs (trabectedin, aplidin, and kahalalide F) on hematopoietic progenitors and stem cells. *Exp Hematol* 31, 1104-1111.

Gorman AM, Samali A, McGowan AJ, Cotter TG (1997) Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells. *Cytometry* 29, 97-105.

Grabowski K & Schneider G (2007) Properties and architecture of drugs and natural products revisited. *Curr Chem Biol* 1, 115-127.

Graves PR, Yu L, Schwarz JK, Gales J, Sausville EA, O'Connor PM, Piwunica-Worms H (2000) The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN 01. *J Biol Chem* 275, 5600-5605.

Hanks SK (2003) Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol* 4, 111-117.

Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaad S, Burlinson B, Clay P, Collins AR, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR (2003) Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis* 18, 45-51.

Harvey AL (2008) Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today* 13, 894-901.

Heerdt BG, Houston MA, Mariadson JM, Augenlicht LH (2000) Dissociation of staurosporine-induced apoptosis from G2-M arrest in SW620 human colonic carcinoma cells: initiation of the apoptotic cascade is associated with elevation of the mitochondrial membrane potential. *Cancer Res* 60, 6704-6713.

Heingard D & Paulson M (1984) Structure and metabolism of proteoglycans. *In: Piez, KA & Reddi AH. Extracellular Matrix Biochemistry*. Elsevier, Nova Iorque, 277-328.

Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson C (2008) DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature* 453, 193-204.

Higuchi M, Aggarwal BB, Yeh ET (1997) Activation of CPP32-like protease in tumor necrosis factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function. *J Clin Invest* 99, 1751-1758.

Horton PA, Longley RE, McConnell OJ, Ballas LM (1994) Staurosporine aglycone (K252-c) and arcylflavin A from the marine ascidian, *Eudistoma* sp. *Experientia* 50, 843-845

Hunt B & Vincent ACJ (2006). A high-throughput screening approach to drug discovery. *Pure Appl Chem* 74, 519-526.

Ireland C, Copp B, Foster M, McDonald L, Radisky D, Swersey J (1993) Biomedical potential of marine natural products. In: Attaway D & Zaborsky O. *Marine biotechnology volume 1: Pharmaceutical and bioactive products*, Plenum Press, Nova Iorque, 1-43.

Ismail HI, Nyström S, Nygren J, Hammarsten O (2005) Activation of ataxia telangiectasia mutated by DNA strand break-inducing agents correlates closely with the number of DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 280, 4649-4655.

Jackson JR, Gilmartin A, Imburgia C, Winkler JD, Marshall LA, Roshak A (2000) An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (Chk1) abrogates cell cycle arrest caused by DNA damage. *Cancer Res* 60, 566-572.

Jimenez PC (2004) Bioprospecção de substâncias com potencial antimorfol em ascídias do litoral cearense: estudos com *Eudistoma vancouveri* Millar, 1977 (Urochordata, Ascidiacea). Dissertação de Mestrado. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 93 pp.

Jimenez PC, Fortier SC, Lotufo TMC, Pessoa C, Moraes MEA, Moraes MO, Costa-Lotufo LV (2003) Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. *JEMBE* 287, 93-101.

Jimenez PC, Wilke DV, Takeara R, Lotufo TMC, Pessoa CO, Moraes MO, Lopes NP, Costa-Lotufo LV (2008) Preliminary studies on the cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vancouveri* (Tunicata : Ascidiacea). *Comp Biochem Physiol C* 151, 391-398.

Jimeno J, Faircloth G, Sousa-Faro JMF, Scheuer P, Rinehart K (2004) New marine derived anticancer therapeutics: a journey from the sea to clinical trials. *Mar Drugs* 1, 14-29.

Jin S, Gorfajn B, Faircloth G, Scotto KW (2000) Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *PNAS* 97, 6775-6779.

Kanzaki A, Takebayashi Y, Ren XQ, Miyashita H, Mori S, Akiyama S, Pommier Y (2002) Overcoming multidrug drug resistance in P-glycoprotein/MDR1-overexpressing cell lines by ecteinascidin 743. *Mol Cancer Ther*, 1327-1334.

Kawabe T (2004) G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol Cancer Therap*, 513-519.

Kikuchi Y, Ishibashi M, Sasaki T, Kobayashi J (1991) Iejimalides C and D, new antineoplastic 24-membered macrolide sulfates from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma cf. rigida*. *Tetrahedron Lett* 32, 797-798.

Kinnel RB & Scheuer PJ (1992) 11-hydroxystaurosporines a highly cytotoxic powerful protein kinase C inhibitor from a tunicate. *J Org Chem* 57, 6327-6329.

Kinzer KF & Cardelina JH, II (1987) Three beta-carbolines from the Bermudan tunicate *Eudistoma olivaceum*. *Tetrahedron Lett* 28, 925-926.

Kjéllen L & Lindahl U (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 60, 443-475.

Kobayashi J, Cheng JF, Kikushi Y, Ishibashi M, Yamamura S, Ohizumi Y (1990) Rigidin, a novel alkaloid with calmodulin antagonistic activity from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma cf. rigida*. *Tetrahedron Lett* 31, 4617-4620.

Kobayashi J, Cheng JF, Ohta T, Nakamura H, Nozoe S, Hirata Y, Ohizumi Y, Sasaki T (1988) Iejimalides A and B, novel 24-membered macrolides with a potent antileukemic activity from the Okinawan tunicate *Eudistoma cf. rigida*. *J Org Chem* 53, 6147-6150.

Kossuga MH, MacMillan JB, Rogers EW, Molinski TF, Nascimento GGF, Rocha RM, Berlinck RGS (2004) (2S,3R)-2-Aminododecan-3-ol, a new antifungal agent from the ascidian *Clavelina oblonga*. *J Nat Prod* 67, 1879-1881.

Kroemer G & Martin SJ (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11, 725-730.

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G (2005) Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ* 12, 1463-1467.

Kruman I, Guo Q, Mattson MP (1998) Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* 51, 293-308.

Kultz D (2005) Molecular evolutionary basis of cellular stress response. *Annu Rev Physiol* 67, 225-257.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16.
- Lee JH & Paull TT (2007) Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26, 7741-7748.
- Levesque AA, Fanous AA, Poh A, Eastman A (2008) Defective p53 signaling in p53 wild-type tumors attenuates p21waf1 induction and cyclin B repression rendering them sensitive to Chk1 inhibitors that abrogate DNA damage-induced S and G2 arrest. *Mol Cancer Ther* 7, 252-262.
- Levine AJ (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Li WR & Joullie MM (1992) The didemnins: biological properties, chemistry and total synthesis. *Studies Nat Prod Chem* 10, 241-302.
- Lin Y, Chrest FJ, Gabrielson EW (1992) Reversible G1 arrest of a human lung epithelial cell line by staurosporine. *J Cell Physiol* 152, 646-653.
- Lindquist N, Fenical W, Van Duyne GD, Clardy J (1991) Isolation and structure determination of diazonamides A and B, unusual cytotoxic metabolites from the marine ascidian *Diazona chinensis*. *Journal of the Chemical Society* 113, 2303-2304.
- Lotufo TMC & Silva AMB (2006) Ascidiacea do litoral cearense. In: Matthews-Cascon H & Lotufo TMC. *Biota marinha da costa oeste do Ceará*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 221-247.
- Lotufo TMC (2002) Ascidiacea (Chordata:Tunicata) do litoral tropical brasileiro. Tese de doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 183pp.
- Lovell DP, Thomas G, Dubrow R (1999) Issue related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet assay. *Teratog Carcinog Mutag* 19, 109-119.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Mahajan NP, Harrison-Shostak DC, Michaux J, Herman B (1999) Novel mutant green fluorescent protein protease substrates reveal the activation of specific caspases during apoptosis. *Chem Biol* 6, 401-409.

- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- Marminon C, Anizon F, Moreau P, Pfeiffer B, Pierré A, Golsteyn RM, Peixoto P, Hildebrand MP, David-Cordonnier MH, Lozach O, Meijer L, Prudhomme M (2008) Rebeccamycin derivatives as dual DNA-damaging agents and potent checkpoint kinase 1 inhibitors. *Mol Pharmacol* 74, 1620-1629.
- Masquelier M, Zhou QF, Gruber A Vitols S (2004) Relationship between daunorubicin concentration and apoptosis induction in leukemic cells. *Biochem Pharmacol* 67: 1047-1056.
- Millar RH (1977) Ascidians (Tunicata:Ascidiacea) from the northeastern Brazilian shelf. *J Nat History* 11, 169-223.
- Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G (2006) Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol* 16, 264-272.
- Molinski TF (1993) Marine pyridoacridine alkaloids: structure, synthesis, and biological chemistry. *Chemi Rev* 93, 1825-1838.
- Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP (2009) Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Disc* 8, 69-85.
- Monks A, Harris ED, Vaigro-Wolff A, Hose CD, John W. Connelly JW, Sausville EA (2000) UCN-01 enhances the *in vitro* toxicity of clinical agents in human tumor cell lines. *Investig New Drugs* 18, 95-107.
- Monniot C, Monniot F, Laboute P (1991) Coral reefs ascidians of New Caledonia. *Collection faune tropicale*, No. XXX. ORSTOM Editions, Paris, 247 pp.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65, 55-63.
- Munro MHG, Blunt JH, Dumdei EJ, Hickford SJH, Lill RE, Li S, Battershill CN, Duckworth AR (1999) The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J Biotechnol* 70, 15-25.
- Murata O, Shigemori H, Ishibashi M, Sugama K, Hayashi K & Kobayashi J (1991) Eudistomidins E and F, new beta-carboline alkaloids from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma glaucus*. *Tetrahedron Lett* 32, 3539-3542.

- Nascimento JBSC (2008) Potencial farmacológico da microbiota bacteriana associada à ascídia *Eudistoma vannamei*. Monografia de graduação. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 66pp.
- Newman DJ & Cragg GM (2006) Natural products from marine invertebrates and microbes as modulators of antitumor targets. *Curr Drug Targets* 7, 279-304.
- Newman DJ & Cragg GM (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70, 461-477.
- Newmann DJ & Cragg GM (2004) Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J Nat Prod* 64, 1216-1238.
- Nociari MM, Shalev A, Benias P, Russo C (1998) A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Meth* 213, 157-167.
- Olive PL (1989) Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiation Res* 117, 79-92.
- Omura S, Iwai Y, Hirano A, Nakagawa A, Awaya J, Tsuchiya H, Takahashi Y, Masuma R (1977). A new alkaloid AM-2282 os *Streptomyces* origin: taxonomy, isolation, fermentation and preliminary characterization. *J Antibiot* 30, 275-282.
- Ostling O & Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Bioph Res Co* 123, 291-298.
- Ouchi T (2006) BRCA1 phosphorylation: biological consequences. *Cancer Biol Ther* 5, 470-475.
- Parry DL (1984) Cyanophytes with R-phycoerythrins in association with seven species of ascidians from the Great Barrier Reef. *Phycologia* 23, 503-513.
- Pavão MS, Aiello KR, Werneck CC, Silva LC, Valente AP, Mulloy B, Colwell NS, Tollefsen DM, Mourão PAS (1998) Highly sulfated dermatan sulfates from ascidians. Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 273, 27848-227857.
- Pavão MS, Mourao PA, Mulloy B, Tollefsen DM (1995) A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from ascidian. Its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. *J Biol Chem* 270, 31027-31036.

Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnica-Worms H (1997) Mitotic and G2 checkpoint control: Regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 277, 1501-1505.

Pharmamar. www.pharmamar.com, acessado em 25.04.2009

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.

Pommier Y, Kohlhagen G, Bailly C, Waring M, Mazumder A, Kohn KW (1996) DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Biochemistry* 35, 13303-13309.

Prado MP, Torres YR, Berlinck RGS, Desidera C, Sanchez MA, Craveiro MV, Hajdu E, Rocha RM, Machado-Santelli GM (2004) Effects of marine organism extracts on microtubules integrity and cell cycle progression in cultured cells. *JEMBE* 313, 125-137.

Puchalski TA, Ryan DP, Garcia-Carbonero R, Demetri GD, Butkiewicz L, Harmon D, Seiden MV, Maki RG, Lopez-Lazaro L, Jimeno J, Guzman C, Supko JG (2002) Pharmacokinetics of ecteinascidin 743 administered as a 24-h continuous intravenous infusion to adult patients *Cancer Chemother Pharmacol* 50, 309-319.

Reyes F, Fernández R, Rodríguez A, Bueno, S, Eguilior C, Francesch A, Cuevas C (2008) Cytotoxic staurosporines from the marine ascidian *Cystodytes solitus*. *J Nat Prod* 71, 1046-1048.

Rinehart Jr KL, Kobayashi J, Harbour GC, Gilmore J, Mascal M, Holt TG, Rinehart KL Jr, Kobayashi J, Harbour GC, Shield LS, Lafargue F (1987) Eudistomins A-Q beta-carbolines from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. *JACS* 109, 3378-3387.

Rinehart Jr KL, Kobayashi J, Harbour GC, Hughes RG Jr, Mizsak SA, Scahill TA (1984) Eudistomins C, E, K and L potent antiviral compounds containing a novel oxathiazepine ring from the Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. *JACS* 106, 1524-1526.

Rinehart Jr LK, Gloer JB, Hughes RG Jr, Renis, HE, McGouren JP, Swynenberg EB, Stringfellow DA, Kwentzel SL, Li LH (1981) Didemnins: antiviral and antitumor depsipeptides from a Caribbean tunicate. *Science* 212, 933-935.

Rinehart KL (2000) Antitumor compounds from tunicates. *Med Res Rev* 20, 1-27.

Rinehart KL, Holt TG, Fregean NL, Stroh JG, Keifer PA, Sun F, Li LH, Martin DG (1990) Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B and 770: potent antitumor agents from the caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *J Org Chem* 55, 4512-4515.

Rinehart KL, Kishore V, Bible KC, Sakai R, Sullins DW, Li KM (1988) Didemnins and tunicholorin: novel natural products from the marine tunicate *Trididemnum solidum*. *J Nat Prod* 51, 1-21.

Roberge M, Berlinck RGS, Xu L, Anderson HJ, Lim LY, Curman D, Stringer CM, Friend SH, Davies P, Vincent I, Haggarty SJ, Kelly MT, Britton R, Piers E, Andersen RJ (1998) High-throughput assay for G2 checkpoint inhibitors and identification of the structurally novel compound isogranulatimide. *Cancer Res* 58, 5701-5706.

Rocha RM (2002) Série Zoologia: Ascidiacea. Departamento de Zoologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. CD-ROM.

Rodrigues SA, Rocha RM, Lotufo TMC (1998) Guia ilustrado para identificação das ascídias do litoral do estado de São Paulo. Editora IB-USP/FAPESP, São Paulo, 190pp.

Roos WP & Kaina B (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12, 440-450.

Roos WP, Batista LFZ, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CFM, Kaina B (2007) Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene* 26, 186-197

Ruppert EE & Barnes RB (1996) Protocordados e quetógnatos. In: *Zoologia dos Invertebrados*, 6<sup>a</sup> ed., Roca, São Paulo, 841-895.

Russell KJ, Wiens LW, Demers GW, Galloway DA, Plon SE, Groudine M (1995). Abrogation of the G2 checkpoint results in differential radiosensitization of G1 checkpoint-deficient and G1 checkpoint-competent cells. *Cancer Res* 55, 1639-1642.

Sakai R, Rinehart KL, Kishore V, Kundu B, Faircloth G, Gloer JB, Carney JR, Namikoshi M, Sun F, Hughes RG, Gravalos DG, Quesada TG, Wilson GR, Heid RM (1996) Structure-activity relationships of the didemnins. *J Med Chem* 39, 2819-2934.

Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnica-Worms H, Elledge SJ (1997) Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: Linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277, 1497-1501.

Sausville EA, Johnson J, Alley M, Zaharevitz D, Senderowicz AM (2000) Inhibition of CDKs as a therapeutic modality. *Ann NY Acad Sci* 910, 207-221.

Schupp P, Eder C, Proksch P, Wray V, Schneider B, Herderich M, Paul V (1999) Staurosporine derivatives from the ascidian *Eudistoma toetalensis* and its predatory flatworm *Pseudoceros* sp. *J Nat Prod* 62, 959-962.

Schupp P, Proksch P, Wray V (2002) Further new staurosporine derivatives from the ascidian *Eudistoma toetalensis* and its predatory flatworm *Pseudoceros* sp. *J Nat Prod* 65, 295-298.

Schupp P, Steube K, Meyer C, Proksch P (2001) Anti-proliferative effects of new staurosporine derivatives isolated from a marine ascidian and its predatory flatworm. *Cancer Lett* 174, 165-172.

Schwartzmann G (2000) Marine organisms and other novel natural sources of new anticancer drugs. *Ann Oncology* 11, 235-243.

Schwartzmann G, Rocha AB, Berlinck RGS, Jimeno J (2001) Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Lancet Oncology* 2, 221-225.

Scott SP & Pandita TK (2006). The cellular control of DNA double-strand breaks. *J Cell Biochem* 99, 1463-1475.

Selegim MHR, Lira SP, Kossuga MH, Batista T, Berlinck RGS, Hajdu E, Muricy G, Rocha RM, Nascimento GGF, Silva M (2007) Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. *Rev Bras Farmacog* 17, 287-318.

Shao RG, Shimizu T, Pommier Y (1997) 7-Hydroxystaurosporine (UCN-01) induces apoptosis in human colon carcinoma and leukaemia cell independently of p53. *Exp Cell Res* 234, 388-397.

Sigel MM, Welham LL, Lichter W, Dudeck LE, Gargus J, Lucas AH (1969) Anticellular and antitumoral activity of extracts from tropical marine invertebrates. In: Youngen Jr HW. *Food-Drugs from the Sea Proceedings*. Marine Technology Society, Washington, DC, 281-294.

- Singh MP, McCoy M, Tice RR, Schneider P (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.
- Smith GC, d'Adda di Fagagna F, Lakin ND, Jackson SP (1999) Cleavage and inactivation of ATM during apoptosis. *Mol Cell Biol* 19, 6076-6084.
- Spainhour CB (2005) Natural Products. In: Gad SC. *Drug discovery handbook*. Wiley-Interscience, Hoboken, 11-72.
- Stoecker DK (1980) Distribution of acid and vanadium in *Rhopalaea birkelandi* Tokioka. *JEMBE* 48, 277-281.
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213-1226.
- Suganuma M, Kawabe T, Hori H, Funabiki T, Okamoto T (1999) Sensitization of cancer cells to DNA damage-inducing cell death by specific cell cycle G2 checkpoint abrogation. *Cancer Res* 59, 5887-5991.
- Swanson KM & Hohl RJ (2006) Anti-cancer therapy: targeting the mevalonate pathway. *Curr Cancer Drug Targets* 6, 15-37.
- Takahashi Y, Kobayashi E, Asano K, Kawamoto I, Tamaoki T, Nakano H (1989) UCN-01 and UCN-02, new selective inhibitors of protein kinase C: screening, producing organism and fermentation. *J Antibiot* 42, 564-570.
- Takahashi Y, Kobayashi E, Asano K, Yoshida M, Nakano H (1987) UCN-01, a selective inhibitor of protein kinase C from *Streptomyces*. *J Antibiot* 40, 1782-1784.
- Takeara R (2006) Estudo químico e avaliação da atividade citotóxica das ascídias *Didemnum psammatoedes* (Sluiter, 1885) e *Eudistoma vancouveri* Millar, 1977 (Tunicata: Ascidiacea). Tese de doutorado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 186pp.
- Takeara R, Jimenez PC, Wilke DV, Moraes MO, Pessoa CO, Lopes JLC, Lopes NP, Costa-Lotufo LV (2008) Effects of isolates from a hydromethanolic extract of *Didemnum psammatoedes* (Tunicata: Ascidiacea) on human leukemia cell lines. *Comp Biochem Physiol A* 151, 363-369.

Tirkkonen M, Johannsson O, Agnarsson BA, Olsson H, Ingvarsson S, Karhu R, Tanner M, Isola J, Barkardottir RB, Borg A, Kallioniemi OP (1997) Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. *Cancer Res* 57, 1222–1227.

Torres YR, Bugni TS, Berlinck RGS, Ireland CM, Magalhaes A, Ferreira AG, Rocha RM (2002) Sebastianines A and B, novel biologically active pyridoacridine alkaloids from the Brazilian ascidian *Cystodytes dellechiaiei*. *J Org Chem* 67, 5429-5432.

Traganos F, Gong J, Ardelt B, Darzynkiewicz Z (1994) Effect of staurosporine on MOLT-4 cell progression through G2 and on cytokinesis. *J Cell Physiol* 158, 535-544.

Urdiales, J. L., Morata, P, Nunez De Castro, I, Sanchez-Jimenez F (1996) Antiproliferative effect of dehydrodidemnin B (DDB), a depsipeptide isolated from Mediterranean tunicates. *Cancer Lett* 102, 31-37.

Vera MD & Joullié MM (2002) Natural products probes of cell biology: 20 years of Didemnin research. *Med Res Rev* 22, 102-145.

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

Vogelstein B & Kinzler KW (1992) p53 function and dysfunction. *Cell* 70, 523–526.

Wagner-Döbler I, Beil W, Lang S, Meiners M, Laatsch H (2002) Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 74, 207-238.

Wang Q, Fan S, Eastman A, Worland PJ, Sausville EA, O'Connor PM (1996) UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted P53. *J Natl Cancer Inst* 88, 956-965.

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

Widlak P, Lanuszewska J, Cary RB, Garrard WT (2003) Subunit structures and stoichiometries of human DNA fragmentation factor proteins before and after induction of apoptosis. *J Biol Chem* 278, 26915-26922.

Wilke DV (2005) Fracionamento bioguiado do extrato hidroalcoólico da esponja marinha *Ircinia felix* (Porifera, Demospongiae) encontrada no Parque Estadual Marinha Pedra da Risca do Meio. Monografia de graduação. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 68pp.

Xu X, Weaver Z, Linke SP, Li C, Gotay J, Wang XW, Harris CC, Ried T, Deng CX (1999) Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell* 3, 389-395.

Zewail-Foote M & Hurley LHJ (1999) Ecteinascidin 743: a minor groove alkylator that bends DNA toward the major groove. *Med Chem* 42, 2493-2497.

Zewail-Foote M, Li VS, Kohn H, Bears D, Guzman M, Hurley LH (2001) The inefficiency of incisions of ecteinascidin 743-DNA adducts by the Uvr ABC nuclease and the unique structural feature of the DNA adducts can be used to explain their repair-dependent toxicities of this antitumor agent. *Chem Biol* 8, 1033-1049.

Zhao B, Bower MJ, McDevitt PJ, Zhao H, Davis ST, Johanson KO, Green SM, Concha NO, Zhou BBS (2002) Structural basis for Chk1 inhibition by UCN-01. *J Biol Chem* 277, 46609-46615.

Tang X, Hui ZG, Cui XL, Garg R, Kastan MB, Xu B (2008) A novel ATM-dependent pathway regulates protein phosphatase 1 in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 8, 2559-2566.

## **ANEXOS**

## Anexo I

### SOLUÇÕES E KITS

#### Cultura de Células

PBS (*Phosphate Buffer Solution*; pH 7,2)

NaCl .....	0,15M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	10mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2mM

Constituição do meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab)

**Sais inorgânicos:**

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	100,00	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	100,00	NaHCO <sub>3</sub>	2.000,00
KCL	400,00	NaCl	6.000,00	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	800,00

**Aminoácidos:**

L-arginina.HCL	200,00	L-hidroxiprolina	15,00	L-prolina	20,00
L-asparigina.H <sub>2</sub> O	50,00	L-isoleucina	20,00	L-tirosina	28,00
L-ácido aspártico	20,00	L-leucina	50,00	L-serina	30,00
L-cistina	50,00	L-lisina.HCL	40,00	L-valina	20,00
L-ácidoglutâmico	20,00	L-metionina	15,00	L-treonina	20,00
L-glutamina	300,00	L-fenilalanina	15,00	L-triptofano	5,00
L-histidina.HCL.H <sub>2</sub> O	10,00				

**Vitaminas:**

biotina	0,200	ácido p-aminobenzóico	1,000	ácido fólico	1,000
pantotenato de cálcio	0,250	piridoxina.HCL	1,000	inositol	35,000
cloreto de colina	3,000	riboflavina	0,200	nicotinamida	1,000
tiamina.HCL	1,000	vitaminaB12	0,005		

**Outros componentes:**

glicose	2.000,00	glutacione	1,00	vermelho de fenol	5,00
---------	----------	------------	------	-------------------	------

### Estudos por Citometria de Fluxo

#### Solução PI-ciclo

Iodeto de propídeo (Sigma) .....	50mg/mL em PBS
Citrato de sódio .....	0,2%
Triton X-100 .....	0,1%

#### Solução de Rodamina 123

##### Solução estoque:

Rodamina 123 (Sigma) .....	1mg/mL em EtOH
----------------------------	----------------

##### Solução de uso:

“Solução estoque” .....	1:1000 em PBS
-------------------------	---------------

#### Composição do reagente Guava® Nexin (Guava Technologies)

Anexina-V .....	
7-AAD .....	

### Análise da Morfologia Celular

#### Solução de Eosina

Eosina (Vetec) .....	0,5%
EtOH .....	80% em dH <sub>2</sub> O
Ácido acético glacial .....	0,5%

### Teste do Cometa

#### Tampão de lise (pH 10,0)

Tris (PlusOne) .....	100mM
EDTA .....	25mM
NaCl .....	5M
N-lauroil sarcosina .....	1%
Triton X-100 .....	1%
DMSO .....	10%

#### Tampão de corrida alcalino (pH 8,5)

Tris (PlusOne).....	100mM
Acetato de sódio .....	300mM

### Western Blot

#### Solução de acrilamida/bisacrilamida 30.8%

Acrilamida (PlusOne) .....	30% em dH <sub>2</sub> O
Bisacrilamida (PlusOne) .....	0,8% em dH <sub>2</sub> O

#### Tampão de corrida (pH 8,3)

Tris (PlusOne) .....	25mM
Glicina (PlusOne) .....	0,192M
SDS (Fisher Scientific) .....	0,1%

Tampão de transferência

Tris (PlusOne) .....	25mM
Glicina (PlusOne) .....	0,192M
MeOH .....	20%

Tampão de revelação (pH 9,5)

Tris (PlusOne) .....	50mM
MgCl <sub>2</sub> .....	5mM
NaCl .....	0,15M

Composição do tampão de lise RIPA *Lysis Buffer* (Santa Cruz Biotechnology)

Nonidet P-40 .....	1% em TBS
Deoxicolado de sódio .....	0,5%
SDS .....	0,1%
Azida sódica .....	0,004%

Composição do tampão de amostra *Blue Juice* (10X; Invitrogen)

Tris-HCl (pH 7,5) .....	10mM
EDTA .....	10mM
Sacarose .....	65%
Azul de bromofenol .....	0,3%

Componentes do kit para dosagem de proteínas DC *Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories)

<i>Reagent A</i> .....	Solução alcalina de tartarato de Cu
<i>Reagent B</i> .....	Reagente de Folin
<i>Reagent S</i> .....	Detergente

## Anexo II

### FRACIONAMENTO QUÍMICO

#### Rendimento do Extrato Hidroalcoólico Bruto e Partições Derivadas de *E. vannamei*

EHA Bruto			Partição DCM		Partição n-BuOH		Resíduo MeOH/H <sub>2</sub> O	
Massa úmida (kg)	Massa (g)	Rend. (%)	Massa (g)	Rend. # (%)	Massa (g)	Rend. # (%)	Massa (g)	Rend. # (%)
8,81	351,80	3,99	17,36	4,93	27,38	7,78	N.D.	N.D.

# rendimento relativo à massa do extrato hidroalcoólico bruto de *E. vannamei*.

#### Fracionamento fase DCM - Cromatografia em coluna de Si

Amostra	Eluente	Amostra	Eluente	Amostra	Eluente
<b>Início</b>	Hex/AcOEt 8:2	<b>46-82</b>	Hex/AcOEt 2:8	<b>189-213</b>	AcOEt/MeOH 8:2
<b>1-7</b>	Hex/AcOEt 8:2	<b>83-148</b>	AcOEt	<b>214-250</b>	AcOEt/MeOH 6:4
<b>8-28</b>	Hex/AcOEt 6:4	<b>149-155</b>	AcOEt/MeOH 8:2	<b>251-257</b>	AcOEt/MeOH 3:7
<b>29-45</b>	Hex/AcOEt 4:6	<b>156-188</b>	AcOEt/MeOH 9:1	<b>Final</b>	MeOH

**Reunião das Frações da Fase DCM Obtidas da Coluna de Si – CCDC**

<b>Fração</b>	<b>Amostras Reunidas</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Fração</b>	<b>Amostras Reunidas</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>DCM 1</b>	1-4	1,6292	<b>DCM 11</b>	70-104	0,5355
<b>DCM 2</b>	5-7	0,3486	<b>DCM 12</b>	105-123	0,1885
<b>DCM 3</b>	8-11	0,2625	<b>DCM 13</b>	124-151	0,2973
<b>DCM 4</b>	12-13	0,6988	<b>DCM 14</b>	152-158	1,8093.
<b>DCM 5</b>	14-20	1,2396	<b>DCM 15</b>	159-171	0,5589
<b>DCM 6</b>	21-29	0,4632	<b>DCM 16</b>	172-190	0,3201
<b>DCM 7</b>	30-35	0,4095	<b>DCM 17</b>	191-199	0,8804
<b>DCM 8</b>	36-40	0,2023	<b>DCM 18</b>	200-207	1,3933
<b>DCM 9</b>	41-55	0,2294	<b>DCM 19</b>	208-234	1,205.
<b>DCM 10</b>	56-69	0,1966	<b>DCM 20</b>	235-257	1,090

**Processamento da Fração DCM-12 – CCDP**

<b>Amostra</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa (mg)</b>
<b>Banda 0 (origem)</b>	2,7	<b>Banda 4</b>	9,6	<b>Banda 8</b>	28,8
<b>Banda 1</b>	2,1	<b>Banda 5<sup>#</sup></b>	73,6	<b>Banda 9</b>	18,4
<b>Banda 2</b>	3,4	<b>Banda 6</b>	13,2		
<b>Banda 3</b>	13,9	<b>Banda 7</b>	18,3		

# contaminada

**Processamento da Fração DCM-13 – CCDP**

<b>Amostra</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa (mg)</b>
<b>Banda 0 (origem)</b>	4,8	<b>Banda 2<sup>#</sup></b>	2,2	<b>Banda 5</b>	14,1
<b>Banda 1</b>	11,2	<b>Banda 3</b>	20,0	<b>Banda 6</b>	28,2
<b>Banda 2</b>	46,5	<b>Banda 4</b>	8,7	<b>Banda 7</b>	9,1

# uma banda visível, amarela, correu quase junto com a banda 2, uma banda larga, não-visível, mas que absorvia intensamente UV de ondas curtas. A banda amarela apareceu em meio a banda 2 e foi recortada em separado e a amostra designada por 2’.

**Processamento da Fração DCM-14**

**Cromatografia em coluna de Si e reunião por comparação em CCDC**

<b>Fração</b>	<b>Amostras Reunidas</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Fração</b>	<b>Amostras Reunidas</b>	<b>Massa (mg)</b>
<b>DCM-14.1</b>	1-2	16,3	<b>DCM-14.8</b>	66-80	57,9
<b>DCM-14.2</b>	3-7	74,1	<b>DCM-14.9</b>	81-91	159,1
<b>DCM-14.3</b>	8-14	184,3	<b>DCM-14.10</b>	92-123	64,9
<b>DCM-14.4</b>	15-22	98,0	<b>DCM-14.11</b>	124-143	33,6
<b>DCM-14.5</b>	23-29	98,6	<b>DCM-14.12</b>	144-148	32,4
<b>DCM-14.6</b>	30-45	171,6	<b>DCM-14.13</b>	149-159	13,6
<b>DCM-14.7</b>	46-65	262,8	<b>DCM-14.14</b>	160-190	10,6

**Processamento da Fração DCM-15 – CCDP**

<b>Amostra</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa (mg)</b>
<b>Banda 0 (origem)</b>	55,2	<b>Banda 4</b>	15,5	<b>Banda 8</b>	4,6
<b>Banda 1</b>	29,8	<b>Banda 5</b>	14,1	<b>Banda 9</b>	22,2
<b>Banda 2</b>	16,2	<b>Banda 6</b>	10,2		
<b>Banda 3</b>	16,2	<b>Banda 7</b>	26,0		

**Processamento da Fração DCM-16 – CCDP**

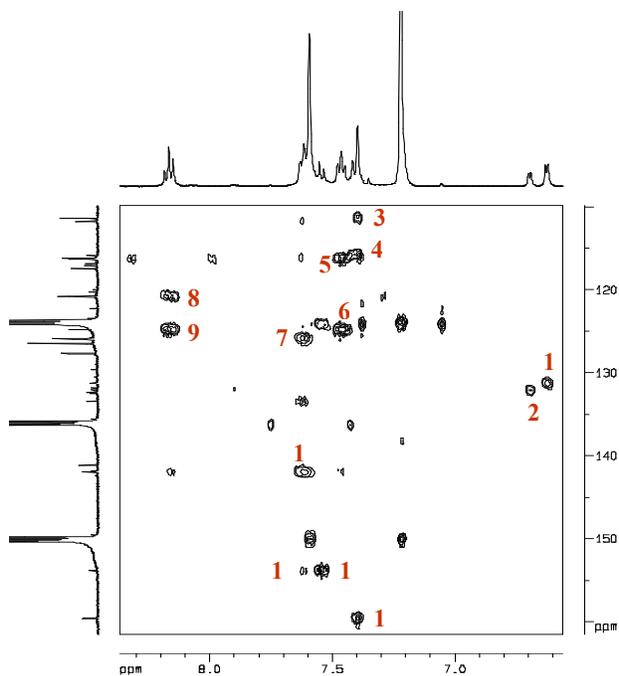
<b>Amostra</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa (mg)</b>
<b>Banda 0 (origem)</b>	41,5	<b>Banda 3</b>	14,9	<b>Banda 6</b>	14,0
<b>Banda 1</b>	15,4	<b>Banda 4</b>	11,1	<b>Banda 7</b>	11,8
<b>Banda 2</b>	52,3	<b>Banda 5</b>	17,8	<b>Banda 8</b>	8,3

## Anexo III

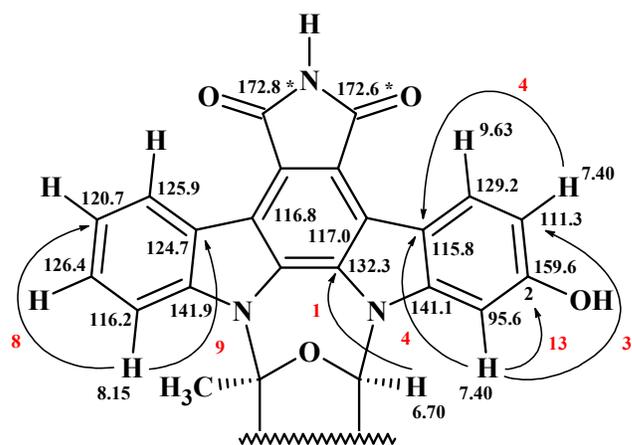
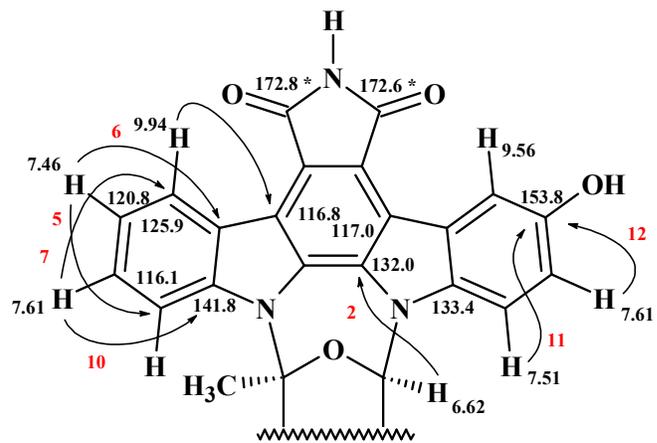
### ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

#### Passos para a Elucidação Estrutural de DCM 14.3.1

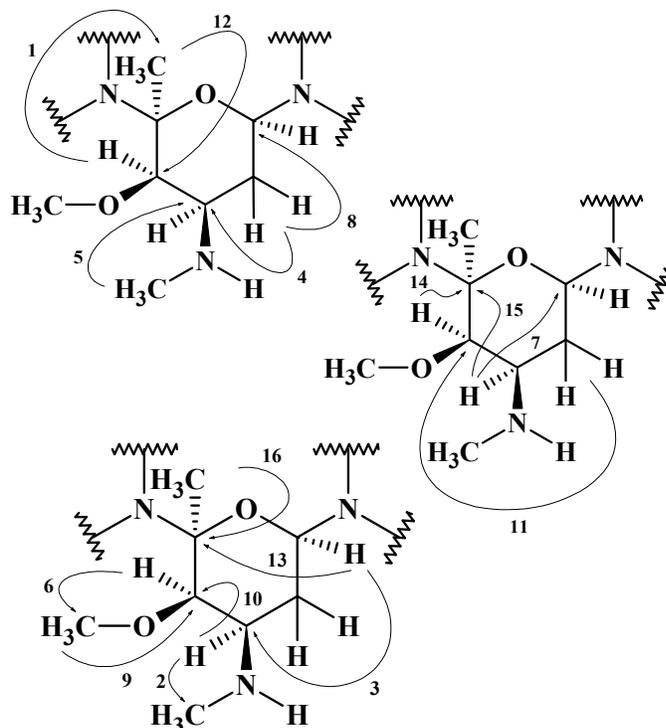
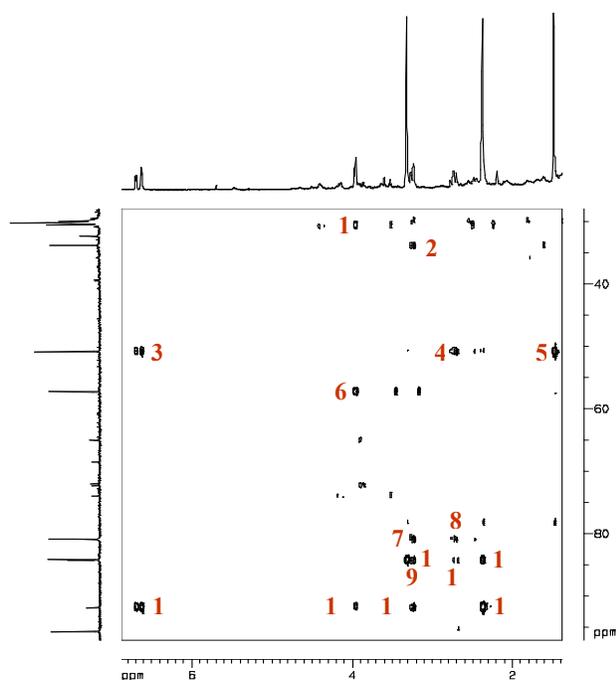
Estruturas parciais apresentando correlações heteronucleares de amplo espectro (evidenciadas pelas setas) observado no espectro por HMBC.



Designações para carbono e hidrogênio (Schupp *et. al.*, 1999).







Estrutura sugerida para os dois componentes majoritários identificados em **DCM 14.3.1.3**. A sugestão foi baseada em análises de ESIMS ( $M^+ + 1 = 487$ ) e RNM 2D, particularmente por HSQC e HMBC (500/125 MHz, Pyr- $d_5$ ), e por comparação com dados na literatura. (Interpretação e esquematização proposta pelo Dr. Edilberto Rocha Silveira).

