



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

**IGOR DA SILVA BOMFIM**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* DE UMA  
BENZOISOQUINOLINA ISOLADA DE *Mitracarpus baturitensis* SUCRE (*Rubiaceae*)**

**FORTALEZA**

**2013**

**IGOR DA SILVA BOMFIM**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* DE UMA  
BENZOISOQUINOLINA ISOLADA DE *Mitracarpus baturitensis* SUCRE (*Rubiaceae*)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa

**FORTALEZA**

**2013**

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- B683a Bomfim, Igor da Silva.  
Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* de uma benzoisoquinolina isolada de *Mitracarpus baturitensis* Sucre (*Rubiaceae*) / Igor da Silva Bomfim. – 2013.  
68 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2013.  
Orientação: Prof. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

1. Quinonas. 2. Toxicidade. 3. Apoptose. I. Título.

CDD 615.32

---

**IGOR DA SILVA BOMFIM**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* DE UMA  
BENZOISOQUINOLINA ISOLADA DE *Mitracarpus baturitensis* SUCRE (*Rubiaceae*)**

Dissertação submetida à coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Farmacologia outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

**BANCA EXAMINADORA**

Aprovada em    /    /

---

Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque  
Universidade Estadual do Vale do Acaraú

---

Profa. Dra. Claudia Roberta de Andrade  
Faculdades INTA

*À Deus,*

*Aos meus pais,*

**Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:**

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq**

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES**

**Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP**

**Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa - FUNCAP**

**Instituto Claude Bernard – InCb**

## AGRADECIMENTOS

À **Dra. Cláudia do Ó Pessoa**, pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE), pela generosidade e orientação.

Ao **Dr. Bruno Cavalcanti** pela amizade e contribuição científica.

Ao **Felipe** a quem sou grato por muitas lições de citometria de fluxo e pela ativa participação em muitos experimentos.

Ao **Dr. Manoel Odorico de Moraes** favorecer as melhores condições de trabalho no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) para que esse trabalho fosse realizado;

À **Silvana França** pela paciência e dedicação.

À **Erivanda** e à **Rogéria** pelo suporte dado ao laboratório, fazendo acontecer todos os experimentos.

À **Adelania Roque, Sheyla Prado**, pessoas que completam o laboratório, dando suporte técnico!

Aos amigos do LOE: **Gabriella, Patrícia Marçal, Assuero, Washington, Aline Sbardelloto, Prof. Hidenburgo, Danilo Damasceno, Diego Veras, Delano, Ana Jérсия, Adriana, Michel Ferreira, Arinice, Eveline, Levy, Sergio, Marcos.**

À **Aura Yda** pela disposição e boa vontade que a todos acolhe.

## RESUMO

As quinonas representam uma das mais importantes classes de compostos utilizados na clínica oncológica, suas moléculas são de ocorrência natural e distribuem-se em três grupos (antraquinonas, benzoquinonas e naftoquinonas). Neste trabalho foi estudado a atividade citotóxica e mecanismos de ação anticâncer de um composto pertencente ao grupo benzoquinona, denominado FR42 (benz[g]isoquinolina-5,10-diona) em células de glioblastoma humano (SF-295). Primeiramente realizou-se o ensaio de citotoxicidade em um painel de 4 linhagens de células cancerígenas, sendo que a FR42 apresentou elevada toxicidade para todas as células cancerígenas testadas, exibiu  $IC_{50}$  entre 1,70-2,45  $\mu$ M. Com relação ao ensaio de citotoxicidade realizado em células normais, mostrou  $IC_{50}$  entre 12,18-23,27  $\mu$ M, houve ligeira seletividade para células cancerígenas. Estudos em citometria de fluxo realizados em células SF-295 sugerem que o composto FR42 na maior concentração testada, induz morte celular por apoptose, evidenciado pela fragmentação do DNA e despolarização da membrana mitocondrial. O composto FR42 na menor concentração testada 2  $\mu$ M apresentou interferência no ciclo celular, promovendo acúmulo de células na fase G2/M. Os resultados indicam que o composto FR42 possui notável toxicidade para células tumorais.

Palavras chave: Benzoisoquinolina. Quinonas. Citotoxicidade. Apoptose.

## **ABSTRACT**

Quinones represent one of the most important classes of compounds used in clinical oncology, and they are natural products easily found in the nature. They have been distributed in three groups (anthraquinones, benzoquinones and naphthoquinones). This study investigated the cytotoxic activity and anticancer mechanism of action of a compound belonging to the benzoquinone group, called FR42 (benz [g] isoquinoline-5 ,10-dione) in human glioblastoma cells (SF-295). First of all, it was performed the cytotoxicity assay on a panel of four cancer cell lines, and the FR42 showed high toxicity to all cancer cells tested, exhibited IC<sub>50</sub> between 1.70 to 2.45 mM. In order to the cytotoxicity assay performed on normal cells showed IC<sub>50</sub> between 12.18 to 23.27 mM, there was a slight selectivity for tumor cells. Flow cytometry studies performed in SF-295 cells has been suggested that the compound FR42 in the highest concentration tested, induced cell death by apoptosis as evidenced by DNA fragmentation and depolarization of the mitochondrial membrane. FR42 lowest concentration tested (2 mM) presented interference in the cell cycle promoting arresting of cells in G<sub>2</sub> / M. The results has been indicated the a notable toxicity from FR42 in cancer cells lines.

**Key Words:** Benzoisoquinoline. Quinone. Cytotoxicity. Apoptosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Marcos do câncer.....	17
<b>Figura 2 -</b>	Estimativas para o ano de 2012/2013 do número dos casos novos de câncer .....	18
<b>Figura 3 -</b>	Taxa de incidência de câncer por 100 mil habitantes para homens e mulheres.....	19
<b>Figura 4 -</b>	As dez principais causas de morte por câncer, segundo o sexo.....	20
<b>Figura 5 -</b>	Características estruturais dos principais tipos de morte celular.....	21
<b>Figura 6 -</b>	Esquema da via extrínseca da apoptose.....	22
<b>Figura 7 -</b>	Esquema da via intrínseca da apoptose.....	23
<b>Figura 8 -</b>	Esquema das fases do ciclo celular.....	25
<b>Figura 9 -</b>	Estrutura do paclitaxel e seu análogo docetaxel.....	28
<b>Figura 10 -</b>	Estruturas dos mais relevantes grupos de quinonas.....	30
<b>Figura 11 -</b>	Estruturas de quinonas utilizadas na clínica oncológica.....	31
<b>Figura 12 -</b>	Estrutura química da Benzoisoquinolina.....	32
<b>Figura 13 -</b>	Taxa de depósito de patentes de benzoquinonas e benzoisoquinolinas por país.....	33
<b>Figura 14 -</b>	Empresas que mais depositaram patentes de compostos do grupo benzoquinona.....	33
<b>Figura 15 -</b>	Evolução anual do depósito de patentes de benzoisoquinolinas e outras benzoquinonas.....	34

<b>Figura 16 -</b>	Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) por meio de gradiente de densidade estabelecido pelo Histopaque™-1077.....	42
<b>Figura 17 -</b>	Gênero Mitracarpus.....	43
<b>Figura 18 -</b>	Equipamento xCELLigence.....	47
<b>Figura 19 -</b>	Curva de crescimento em tempo real.....	51
<b>Figura 20 -</b>	Integridade de membrana celular e concentração de células por citometria de fluxo.....	52
<b>Figura 21 -</b>	Fragmentação internucleossomal de DNA.....	53
<b>Figura 22 -</b>	Efeito do composto FR42 sobre o ciclo celular.....	54
<b>Figura 23 -</b>	Efeito da FR42 sobre o potencial transmembrânico de Mitocôndria..	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e estudo do mecanismo de ação.....	41
<b>Tabela 2 -</b>	Atividade citotóxica da FR42 em linhagens celulares de câncer pelo ensaio MTT.....	50
<b>Tabela 3 -</b>	Efeito citotóxico da FR42 em células normais (Células Mononucleares do Sangue Periférico Humano) pelo ensaio Alamar Blue.....	51

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>®</b>	Marca Registrada
<b>ANOVA</b>	Analisis of Variance (Análise de Variância)
<b>BE/LA</b>	Brometo de Etídio / Laranja de Acridina
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>E.P.M.</b>	Erro Padrão da Média
<b>FDA</b>	U.S. Food and Drug Administration
<b>HTS</b>	High Throughput Screening
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração Inibitória Média
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
<b>pH</b>	Potencial Hidrogênionico
<b>q.s.p</b>	Quantidade suficiente para
<b>RNM</b>	Ressonância Nuclear Magnética
<b>RPMI</b>	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
<b>TBS</b>	Tris Buffer Solution (Tampão Tris)
<b>US-NCI</b>	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>Caracterizando o câncer.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2</b>	<b>Necrose e morte celular (apoptose).....</b>	<b>20</b>
<b>1.3</b>	<b>Ciclo celular e PRB.....</b>	<b>24</b>
<b>1.4</b>	<b>Produtos naturais com propriedades medicinais.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5</b>	<b>Mitracarpus baturitensis sucre.....</b>	<b>28</b>
<b>1.6</b>	<b>Quinonas.....</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Obtenção e manutenção das células mononucleadas do sangue periférico.....</b>	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>Obtenção da molécula.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4</b>	<b>Determinação da citotoxicidade celular através do ensaio MTT.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Determinação da citotoxicidade para células normais através do método Alamar Blue.....</b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade em tempo real .....</b>	<b>46</b>
<b>3.6</b>	<b>Estudo do mecanismo de ação.....</b>	<b>47</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Integridade de membrana celular e concentração de células por citometria de fluxo.....</b>	<b>47</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Análise do ciclo celular e da fragmentação de DNA.....</b>	<b>48</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Determinação do potencial transmembrânico de mitocôndria.....</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Avaliação da atividade citotóxica da FR42.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade em tempo real .....</b>	<b>51</b>

<b>4.3</b>	<b>Análises celulares utilizando citometria de fluxo.....</b>	<b>52</b>
4.3.1	<b>Integridade de membrana celular e concentração de células por citometria de fluxo.....</b>	<b>52</b>
4.3.2	<b>Análise do ciclo celular e da fragmentação de DNA.....</b>	<b>53</b>
4.3.3	<b>Determinação do potencial transmembrânico de mitocôndria.....</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Caracterizando o Câncer

Câncer é uma palavra comumente utilizada para designar todos os tumores malignos, esta palavra é oriunda do grego *carcinos*, cujo significado é caranguejo. Acredita-se que os tumores malignos passaram a ser chamados de câncer em decorrência de uma analogia entre a capacidade de aderência das células neoplásicas e a obstinação de um caranguejo quando se agarra a algo (KUMAR *et al.*, 2004; INCA, 2010). O termo neoplasia significa crescimento novo, já a expressão tumor deve-se a tumefação decorrente da inflamação característica (LIOTTA; KOHN, 2001; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

O câncer pode ser caracterizado por uma proliferação ou diferenciação celular anormal, onde mesmo quando interrompido seu estímulo, o crescimento celular não cede. O desenvolvimento de neoplasias está associado a diversos fatores genéticos, ambientais, ocupacionais e comportamentais. A exposição a radiação, como também à algumas substâncias inorgânicas em seres humanos e experimentalmente em animais mostraram-se capazes de produzir danos ao DNA, provocando anormalidades no crescimento e diferenciação celular. É válido salientar que as mutações podem também ocorrer como resultado de erros na replicação celular, sem a interferência de fatores externos ao organismo (DOLL; PETTO, 1981). As chances de incidência do câncer podem aumentar ao passo que ocorrem danos ao DNA celular, mutações em células normais e genes promotores do crescimento ou reguladores (COLDITZ *et al.*, 1996). As células cancerígenas possuem habilidade para invadir células vizinhas, ou até disseminar-se em locais distantes de sua origem (metástase), apresentam capacidade aumentada de angiogênese, como também possibilidade de replicação ilimitada, insensibilidade a estímulos controladores do crescimento e inibição da apoptose (DOLL; PETO, 1981; COLDITZ *et al.*, 1996; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Vários genes e moléculas endógenas são determinantes no aparecimento de neoplasias, como exemplo a proteína p53, por atuar diretamente ou indiretamente induzindo células com mutações ou defeituosas à apoptose. O gene p53 é capaz de interromper o ciclo celular, induzir a atividade de moléculas responsáveis pela checagem e ou capazes de induzir apoptose. A apoptose representa uma via de morte celular programada minuciosamente regulada, que envolve interação de diversos fatores. São identificadas alterações de natureza

morfológica como resultado do desencadear de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos. Mutações no gene p53 são responsáveis pelo desenvolvimento de um número expressivo de neoplasias (ALMEIDA *et al.*, 2005; ESSERS; VERMEULEN; HOUTSMULLER, 2006).

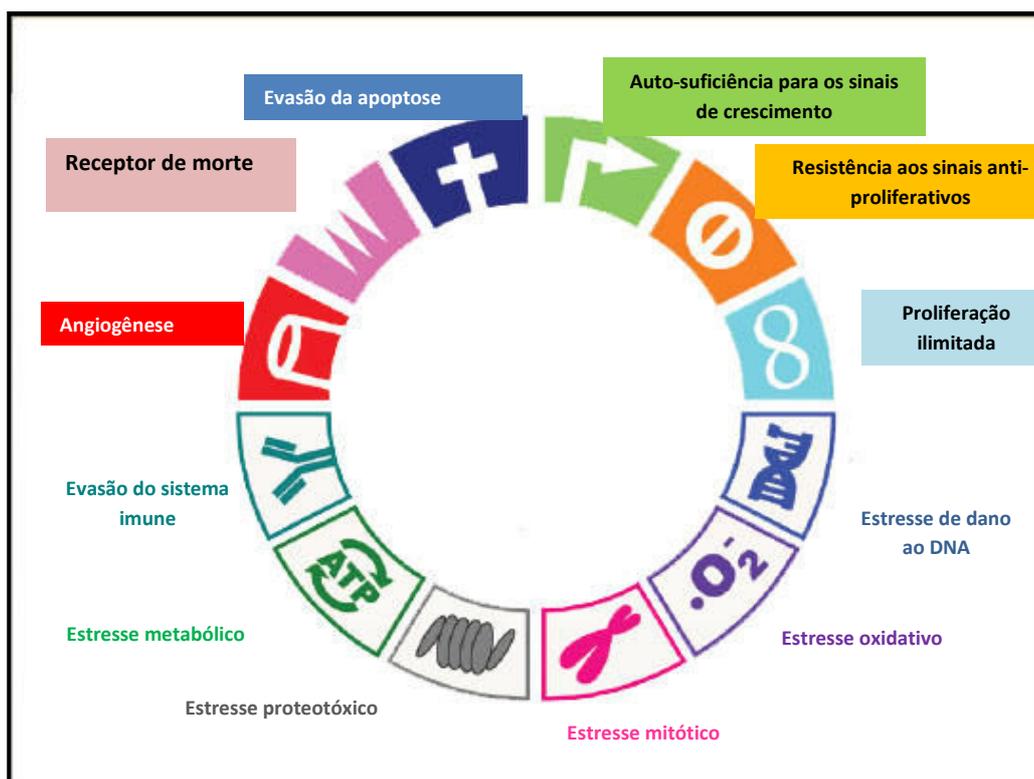
O câncer tem sua gênese vinculada a seis determinantes: manutenção da proliferação celular independente de sinalização, resistência a estímulos de morte celular, insensibilidade a supressão do crescimento, capacidade de invasão de células vizinhas além de migração para células mais distantes (metástase), indução de angiogênese e imortalidade (capacidade infinita de replicação) (KUMAR *et al.*, 2004). Provavelmente, a característica mais notável das células cancerígenas seja a possibilidade de manter sua proliferação sem necessidade de estímulos. As células cancerosas beneficiam-se da desregulação da sinalização celular, através de fatores de crescimento que ligam-se a receptores da superfície celular (normalmente contendo domínios de tirosina quinase intracelular), tornando-se completamente autônomas (SOUZA *et al.*, 2007). Estudos sugerem que mutações somáticas podem ocasionar ativação constitutiva no sistema de sinalização da proliferação celular, com frequência desencadeada por receptores de fatores de crescimento (CARVALHO; TIRNAUER; PELLMAN, 2003).

A propriedade de ser insensível aos sinais supressores de proliferação consiste noutra característica relevante de células neoplásicas. Apesar da existência de diversos sistemas de supressão do crescimento celular, as células cancerígenas podem “driblar” estes programas. A fosfoproteína nuclear pRB e a p53 são moléculas de extrema importância no controle da proliferação, estes em condições normais têm dentre suas atribuições a possibilidade de decidir entre a continuação do crescimento celular ou a parada do ciclo. A herança de genes supressores do crescimento defeituosos está comumente associada a cânceres familiares (ANAZETTI *et al.*, 2003). A pRB exerce o papel de supressor da proliferação celular, nas situações onde encontra-se inativado, representa um aumento no risco de desenvolvimento de câncer familiar. Ainda não está comprovada a herança de outros genes supressores do crescimento defeituosos como causa de tumores malignos, é certo que provavelmente estes genes supressores do crescimento possuem semelhanças restritas quanto a sua atividade biológica referente à antiproliferação (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004).

A transformação observada na célula neoplásica referente à imortalidade consiste numa transformação que a célula neoplásica necessita para executar com sucesso todas as etapas de formação de um tumor maligno. Possivelmente o organismo estabeleça a característica de limitação da replicação de células normais com o intuito de evitar o câncer.

Os telômeros são estruturas moleculares complexas que exibem um padrão replicação lento, são hexanucleotídeos de sequência 5`-TTAGGG-3` em uma das fitas (rica em G), na outra fita 5`-CCCTAA-3` (COSTA *et al.*, 2008). Podem ter sua função grosseiramente comparada a um laço, preserva as estruturas intracelulares das adversidades no citoplasma (ANAZETTI *et al.*, 2003). Ao passo que uma célula normal replica-se, o telômero tende a degradar-se, sendo que esta estrutura funciona como uma espécie de “laço” da célula, preservando assim a integridade dos componentes intracelulares (KRYSKO *et al.*, 2008). Provavelmente o telômero tenha intrínseca ligação com a limitação do crescimento em células normais. Todavia em células portadoras de transformações malignas a capacidade de proliferação torna-se ilimitada em decorrência da não degradação do telômero em resposta a proliferação (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). A figura 2 apresenta alguns fatores endógenos determinantes no desenvolvimento do câncer, bem como características da tumorigênese.

**Figura 1.** Marcos do câncer.



**Fonte:** Adaptado de LUO *et al.*, 2009.

A célula neoplásica tem a capacidade de invadir células vizinhas, ou até mesmo colonizar e atingir tecidos relativamente distantes de sua origem. Neste sentido a colonização é considerada como fenômeno mais complexo do que a própria metástase. Células neoplásicas

migradas para novos parênquimas teciduais são capazes de promover massa tumoral neste novo local (EDINGER; THOMPSON, 2004; KUMAR *et al.*, 2005).

A angiogênese consiste em uma das alterações observadas no tumor maligno. A explicação para a neovascularização seria a estratégia das células neoplásicas para garantir uma irrigação sanguínea superior, com o intuito de obter oxigênio e outros nutrientes com relativa abundância para suas células. Além de garantir eficiente sistema de drenagem para eliminação de moléculas ou gases desnecessários ao seu funcionamento. O gene VEGF (Fator de Crescimento do endotélio Vascular), está envolvido com a indução da proliferação de vasos sanguíneos na embriogênese e no período neonatal. O gene VEGF tem em sua via de sinalização os receptores (VEGF 1-3), e está implicado angiogênese observada nos tumores malignos (WEINBERG, 2008).

No Brasil, estima-se que ocorram mais de 518 mil novos casos de câncer no ano de 2013 (Figura 2). Sendo que os tipos de cânceres mais incidentes por localização primária para o ano de 2013 nos homens são: próstata, pulmão, cólon e reto. Nas mulheres: mama, colo do útero, cólon e reto (INCA,2011).

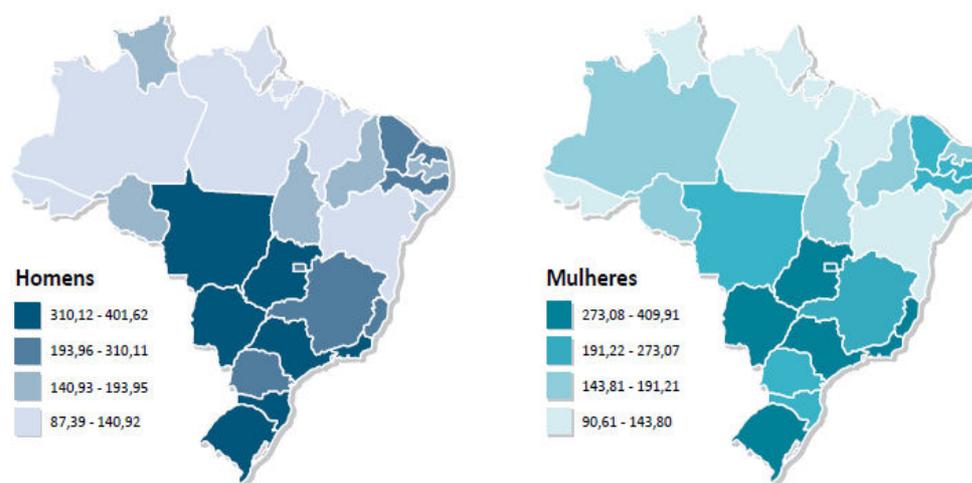
**Figura 2.** Estimativas para o ano de 2012/2013 do número dos casos novos de câncer, em homens e mulheres, segundo a localização primária.

Localização primária	Estimativas de casos novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	60.180	-	60.180
Mama feminina	-	52.680	52.680
Traqueia, brônquios e pulmões	17.210	10.110	27.320
Cólon e reto	14.180	15.960	30.140
Estômago	12.670	7.420	20.090
Colo do útero	-	17.540	17.540
Cavidade oral	9.990	4.180	14.170
Laringe	6.110	-	6.110
Bexiga	6.210	2.690	8.900
Esôfago	7.770	2.650	10.420
Ovário	-	6.190	6.190
Linfoma não Hodgkin	5.190	4.450	9.640
Glândula Tireoide	-	10.590	10.590
Sistema Nervoso Central	4.820	4.450	9.270
Leucemias	4.570	3.940	8.510
Corpo do Útero	-	4.520	4.520
Pele melanoma	3.170	3.060	6.230
Outras localizações	43.120	38.720	81.840
<b>Subtotal</b>	<b>195.190</b>	<b>189.150</b>	<b>384.340</b>
Pele não melanoma	62.680	71.490	134.170
<b>Todas as neoplasias</b>	<b>257.870</b>	<b>260.640</b>	<b>518.510</b>

Fonte: INCA, 2011.

Podem ser observadas na figura 3, as taxas brutas da incidência de câncer por 100 mil habitantes para homens e mulheres estimadas para o ano de 2013, segundo a Unidade da Federação, para todas as neoplasias. Para o sexo masculino as maiores taxas de câncer por 100 mil habitantes esperadas em 2013 são na região centro-oeste (Góias, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul). Nas mulheres estima-se que a maior incidência em 2013 seja nos estados de Góias, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Rio Grande do Sul.

**Figura 3.** Taxa de incidência de câncer por 100 mil habitantes para homens e mulheres, segundo a Unidade da Federação, para todas as neoplasias.



Fonte: INCA,2011.

O câncer consiste na segunda principal causa de morte no Brasil, tem uma taxa de mortalidade inferior apenas às doenças do aparelho circulatório. Em 2008 os cânceres de pulmão, estômago, próstata, cólon e reto e mama, consistiram nas principais causas de morte por câncer na população brasileira (figura 4). Sendo que nos homens as três principais causas de mortalidade foram por cânceres de traquéia, brônquios e pulmões, seguido de câncer na próstata e estômago. Nas mulheres as três principais causas de morte por neoplasias foram por cânceres de mama, brônquios, traqueia (INCA, 2011).

**Figura 4.** As dez principais causas de morte por câncer, segundo o sexo.

Homens		Mulheres	
Traqueia, brônquios e pulmões	15,3%	Mama	16,0%
Próstata	14,1%	Traqueia, brônquios e pulmões	10,0%
Estômago	9,7%	Cólon e reto	8,6%
Cólon e reto	6,8%	Colo do útero	6,6%
Esôfago	6,5%	Estômago	6,1%
Fígado e vias biliares intra-hepáticas	4,6%	Pâncreas	4,6%
Cavidade oral	4,2%	SNC	4,5%
SNC	4,2%	Fígado e vias biliares intra-hepáticas	4,2%
Pâncreas	3,9%	Localização primária desconhecida	4,0%
Laringe	3,7%	Ovário	3,9%
Outras	27,0%	Outras	31,3%
<b>Total</b>	<b>85.988</b>	<b>Total</b>	<b>73.775</b>

Fonte: BRASIL, 2008.

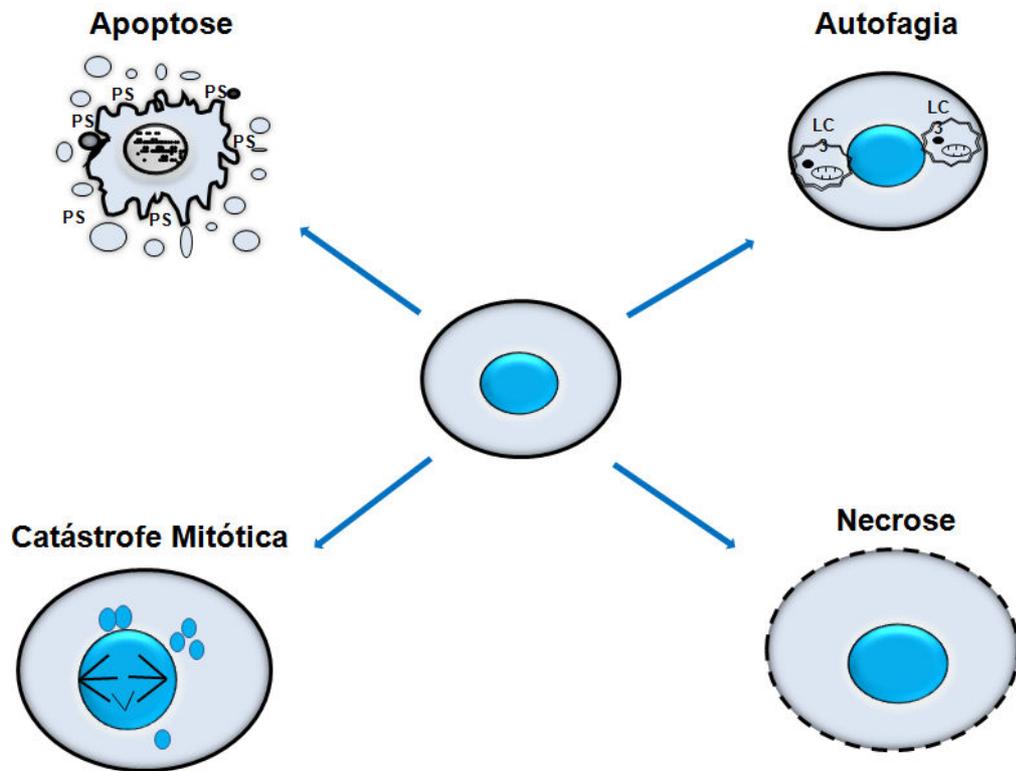
As neoplasias representam doenças de grande magnitude em todo o mundo, cujos mecanismos fisiopatológicos são de complexo entendimento. Contudo, dentre os fatores vinculados ao desenvolvimento do câncer, pode-se citar a falha do organismo em induzir a morte celular (STRASSER; O'CONNOR; DIXIT, 2000).

## 1.2 Necrose e Morte Celular Programada (Apoptose)

A teoria de morte celular programada foi proposta pela primeira vez em 1965 por Lockshin e Williams. Os eventos de mortes celulares são classificados baseando-se nas suas características morfológicas e bioquímicas. Dentre as formas de mortes conhecidas, a necrose e a apoptose são duas vias bastante estudadas (figura 5). A necrose é notadamente identificada após a célula sofrer dano, neste caso, morfológicamente a mesma apresenta um aumento do volume celular, perda de integridade da membrana, cromatina agregada e desorganização celular. Na necrose, em decorrência da perda da integridade da membrana ocorre extravasamento do conteúdo celular, geralmente resultando em danificação de células vizinhas, podendo desencadear uma inflamação local (KUMAR *et al.*, 2004; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). A apoptose é conhecida como “morte celular programada”, é relativamente fácil de ser identificada. Geralmente a membrana celular permanece íntegra, as organelas com a morfologia preservada, com a exceção da mitocôndria que em algumas situações podem ter sua membrana externa rompida. A cromatina apresenta-se condensada e permanece junta a membrana nuclear, ocorre a formação de corpos apoptóticos. Estes últimos

geralmente são fagocitados por macrófagos antes de provocarem um processo inflamatório (STRASSER; O'CONNOR; DIXIT, 2000; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

**Figura 5.** Características estruturais dos principais tipos de morte celular.



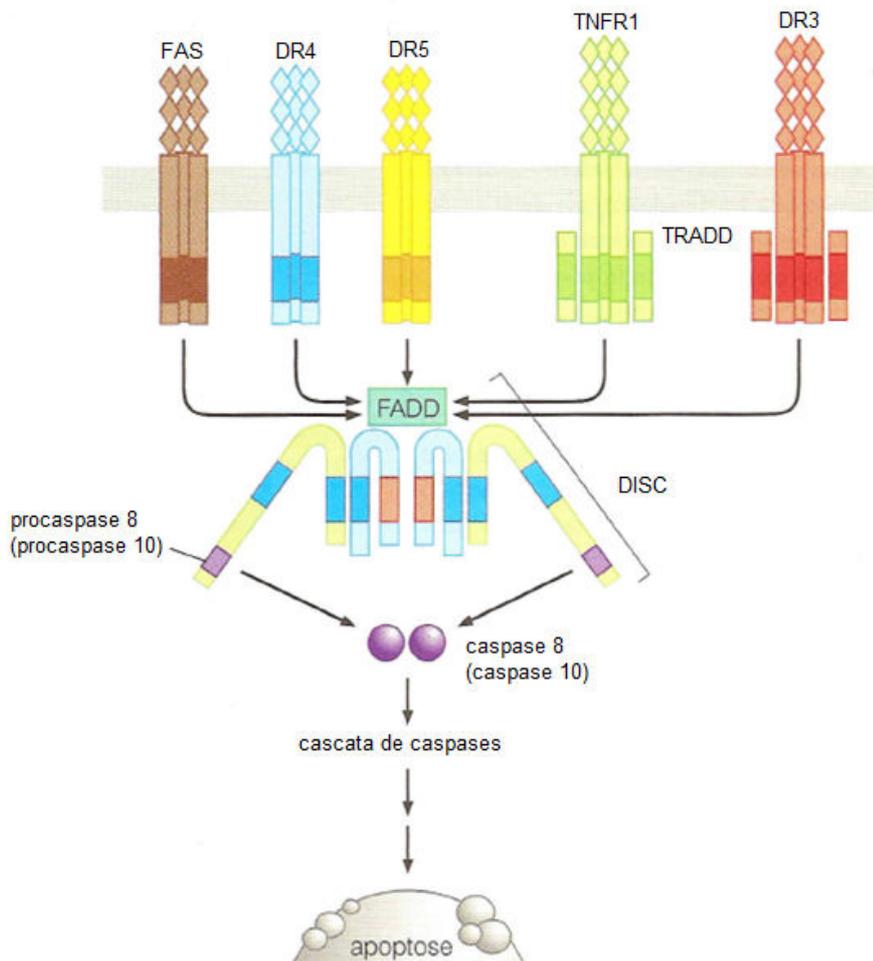
Fonte: BRUNIN e MEDENA, 2008.

A apoptose pode ocorrer pelas vias intrínseca e extrínseca. A via extrínseca ocorre quando há ligação de moléculas específicas as proteínas de membrana pertencentes a família dos receptores de fatores de necrose tumoral. A ligação referida possibilita a ativação da cascata de caspases. Os receptores da família dos fatores de necrose tumoral possuem subdomínio extracelular dotado de cisteína que confere ao mesmo a capacidade de reconhecer seus ligantes, tendo tem como resultado uma trimerização e posterior ativação dos receptores de morte específicos. A partir daí a sinalização passa a ocorrer por conta da porção citoplasmática do receptor, trata-se de um segmento de 65 aminoácidos conhecido como “domínio de morte”. Esta porção após reconhecer o estímulo pela ligação do ligante passa a interagir com moléculas chamadas de FAAD/MORT-1, provocando o recrutamento da caspase -8, que por sua vez ativa a caspase -3 e promove a morte celular (LI *et al.*, 1998; LUO *et al.*, 1998).

Dentre as importantes moléculas diretamente envolvidas com a apoptose estão as proteínas da família Bcl-2, as proteínas inibidoras da apoptose, além da própria p53. As

caspsases são da família cisteínas proteases, estas são capazes de induzir e executar a apoptose através da clivagem do asparato, levando a condensação, fragmentação nuclear e a saída de fosfolípidios da membrana que ativa a fagocitose desta célula por macrófagos. As caspsases que tiveram sua atividades biológicas vinculadas a apoptose são as (caspsases: 3, 6, 7, 8, 9, 10). Na apoptose as caspsases podem ser classificadas como iniciadoras (possuem pró-domínios longos) ou efetoras (pró-domínios curtos ou ausentes).

**Figura 6.** Esquema da via extrínseca da apoptose.

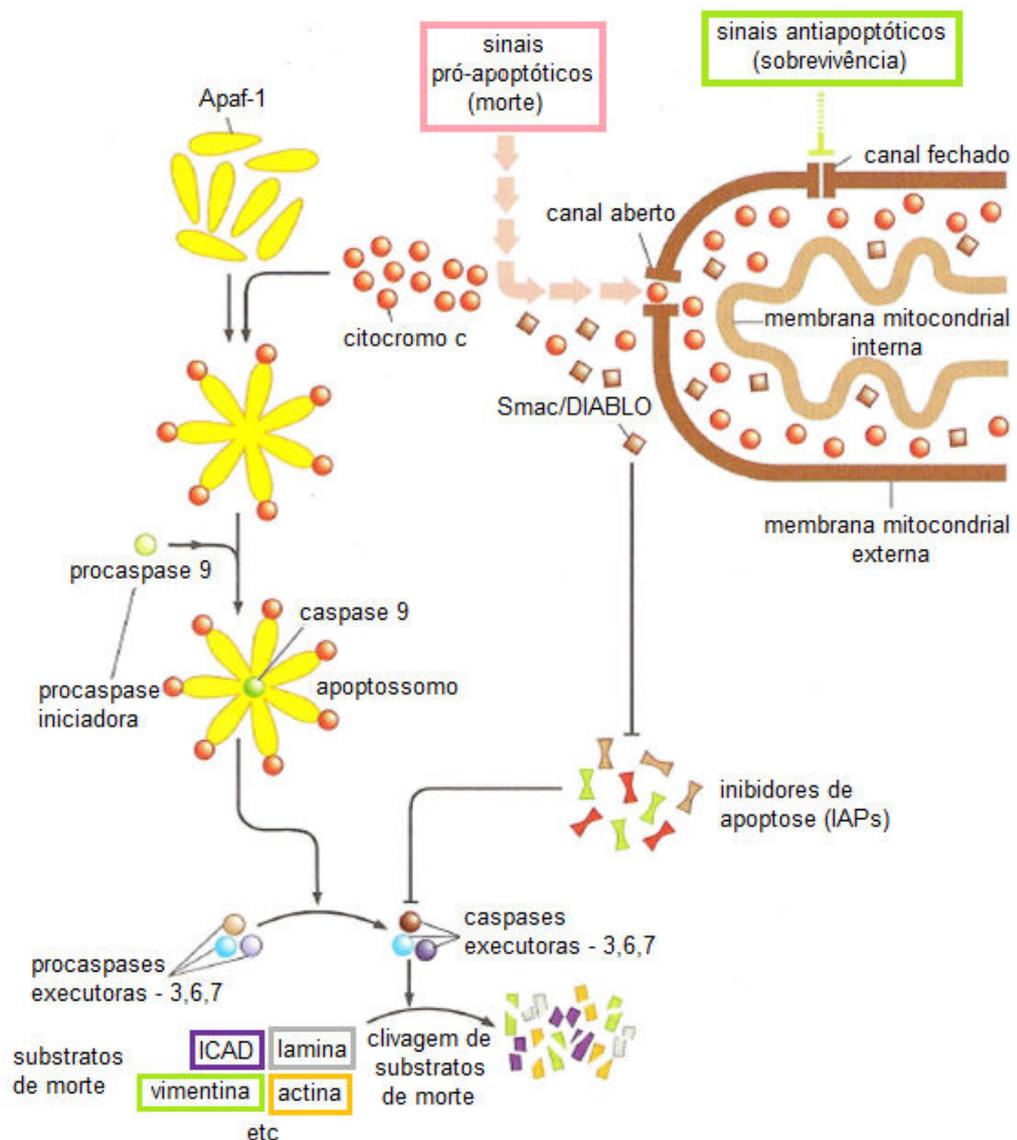


Fonte: WEINBERG, 2008.

Bax, assim como outras proteínas pertencentes a família Bcl-2 estão envolvidas com indução ou repressão da apoptose. As proteínas Bcl-2 e Bcl-XL inibem a saída do citocromo c da mitocôndria, por tanto são consideradas reguladoras da apoptose ou antiapoptóticas. Já as proteínas Bax, Bid e Bak, ligam-se a receptor específico na membrana mitocondrial, promovem o potencial de membrana, aumentam sua permeabilidade, favorecendo a liberação do citocromo c no citoplasma, neste caso ocorre um aumento da expressão de espécies

reativas de oxigênio, contribuindo assim para a morte celular programada “apoptose” (STRASSER; O’CONNOR; DIXIT, 2000). As proteínas inibidoras da apoptose ou IAP’s, atuam ao inibir a atividade das caspases efetoras -3 e -7, da caspase iniciadora -9 e ainda modulação do fator de transcrição NF-kB. Na apoptose as IAP’s são removidas por proteínas liberadas da mitocôndria denominadas smac/DIABLO (MACFARLANE; WILLIAMS, 2004).

**Figura 7.** Esquema da via intrínseca da apoptose.



Fonte: WEINBERG, 2008.

Como já assinalado, o gene p53 está relacionado com a indução de morte celular programada, o mesmo pode parar o ciclo celular, favorecendo durante um período a

possibilidade de checagem de possíveis danos ou mutações. Em condições normais, caso o dano não seja reparável a célula é induzida a morte.

### 1.3 Ciclo Celular e pRb

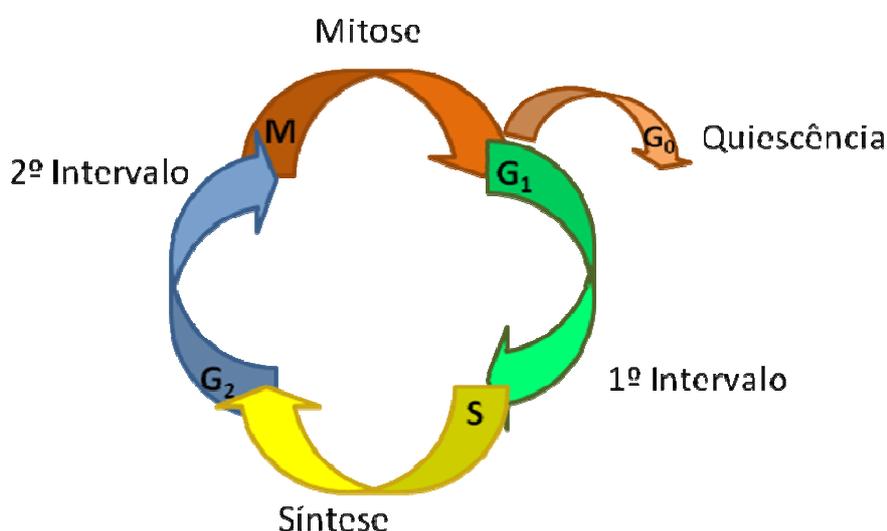
O termo “relógio do ciclo celular” apesar de equivocado é largamente utilizado pelos autores, que pretendem melhor designar um sistema de proteínas responsáveis pelo processamento de sinais (FOSTER, 2008). Este recebe influências de origens intra e extracelulares, compacta as informações e finalmente decide o destino da célula (KING *et al.*, 1996). O relógio do ciclo celular uma vez decidindo seguir a proliferação, induz eventos que conjuntamente assumem o papel de regência do crescimento e divisão celular. Caso o relógio do ciclo celular favoreça a quiescência, o mesmo utilizará fatores que contribuirão para um estado não proliferativo sobre a célula (LOURO *et al.*, 2002; WEINBERG, 2008).

O ciclo pode ser dividido em duas fases: interfase e fase M (mitose). Na interfase existem as subfases G1, G2 e S, na fase M existem prófase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese (KING *et al.*, 1996; WEINBERG, 2008). Em vários momentos destas subfases as células condicionam a proliferação a um “ponto de checagem”, um momento de verificação, onde o relógio celular decide entre a continuação do ciclo ou a entrada no estado de quiescência (VAKIFAHMETOGLU; OLSSON; ZHIVOTOVSKY, 2008). Sobre as subfases da interfase sabe-se que G0 ocorre logo após a mitose, caracteriza-se como um estágio de intensa reação bioquímica, observa-se o aumento do volume celular, para que o ciclo tenha continuidade nesta fase a célula passa pelo ponto de restrição ou ponto “R”. Passando pelo ponto de restrição na continuidade do ciclo inicia-se a fase S, esta última é apontada como a fase de síntese de DNA, nesta etapa os cromossomos sofrem duplicação longitudinal, resultando em duas cromátides, são sintetizadas proteínas importantes como as histonas (JACKSON *et al.*, 2007). Na sequência G2 é conhecida como a fase pós sintética, constituindo o intervalo que antecede a mitose. A célula na fase G2 que possui um duplo complemento de DNA, divide-se em duas células – filhas G1. Cada uma destas duas células – filha podem entrar no ciclo celular ou passarem a um estado não-proliferativo denominado G0 (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004).

A mitose inicia-se logo após G2, corresponde a etapa onde ocorrem mudanças na célula que resultam na sua divisão, originando duas outras, ambas com mesmo número de cromossomos. A mitose possui cinco subfases: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e

telófase (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A prófase ocorre no início da mitose, em células diplóides, observa-se centrossomos e cromossomos duplicados. Ao microscópio óptico é possível evidenciar o início da condensação cromossômica, os centríolos deslocam-se para as extremidades formando o fuso mitótico, ocorre uma desorganização do invólucro nuclear e desaparecimento dos nucléolos (HANAHAN; WEINBERG, 2000; LOURO *et al.*, 2002; FOSTER, 2008). Na prometáfase microtúbulos emergem do centrossomas e à nível dos polos atingem os cromossomos (condensados), os microtúbulos ligam-se ao cinetócoro (estrutura proteica das cromátides irmãs), nesta fase o cromossoma é praticamente visível a olho nú (SCHOTTENFELD; BEEBE-DIMMER, 2005). É na metáfase que os cromossomos condensados passam a alinhar-se no centro da célula. A anáfase ocorre quebra dos centrômeros, são formados dois cromossomos independentes, estes migram para pólos opostos (KUMAR *et al.*, 2004). A telófase é caracterizada pela descondensação dos cromossomos filhos situados em cada polo da célula, uma nova carioteca surge em próximo a cada conjunto cromossômico, ainda nesta fase os cromossomos já descondensados retomam a síntese de RNA e os nucléolos retornam (SALGALLER; LODGER, 1998).

Figura 8. Esquema das fases do ciclo celular.



Dentre os fatores relacionados com a regulação da proliferação celular o pRb desenvolve importante papel, servindo como uma espécie de guardião do portão do ponto de restrição, acredita-se que pRb consiste numa proteína inibidora do crescimento durante a fase G<sub>1</sub>, para que o ciclo progrida é necessário que pRb seja extensivamente fosforilada após o

ponto R (ponto de verificação da fase G1), neste caso pRb hiperfosforilado torna-se inativo (BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2004). Como a pRb representa a decisão entre continuar ou parar o ciclo celular, este deve ser rigorosamente controlado. Neste caso pRb é regida por moléculas envolvidas no ciclo celular, estas moléculas são ciclinas e cinases dependentes de ciclinas. Existem vários tipos de ciclinas, porém as ciclinas A, B e D já tiveram sua atividade comprovada no ciclo celular. As ciclinas formam complexos com as cinases dependentes de ciclinas (CDK's), que por sua vez têm os subtipos (CDK's 2,4, 6 e CDC 2) vinculados a atividade no ciclo celular (DRUKER *et al.*, 2001).

Diversos antineoplásicos exercem sua atividade antiproliferativa através de interferência no ciclo celular, neste sentido para a compreensão dos mecanismos de formação dos tumores malignos, como também a atuação das drogas anticâncer, se faz relevante o entendimento do ciclo celular (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2005).

Drogas como a vincristina e a vimblastina atuam especificamente na fase da mitose "M", a hidroxiuréia e 6 – mercaptopurina atuam na fase de síntese "S" de maneira um tanto distinta, enfim existem vários outros fármacos capazes de parar o ciclo celular de modo específico ou inespecífico (LOURO *et al.*, 2002). Diversas moléculas envolvidas no sistema do ciclo celular são alvos de drogas antineoplásicas já conhecidas, como também alguns outros alvos neste sistema complexo consistem em objetos de pesquisa para o estabelecimento de novas drogas para o tratamento do câncer (HARTWELL; KASTAN, 1994).

#### **1.4 Produtos Naturais Com Propriedades Mediciniais**

Os primeiros registros que relacionam a utilização de plantas com fins medicinais na humanidade estão presentes em escrituras sagradas, sendo descoberto e publicado por George Ebers (HARVEY, 2008). Estas escrituras foram encontradas próximas a casa mortuária de Ramsés II, todavia pertence a XVIII dinastia, seu conteúdo consta de cerca de 100 doenças e respectivos tratamentos baseados em produtos de origem vegetal e animal (BUTLER, 2008). No período pré-cristianismo, os gregos destacaram-se, principalmente através das publicações de Hipócrates, que é considerado pioneiro da medicina moderna, este estabeleceu a natureza como referência para o tratamento de enfermidades (HARVEY, 1999).

Os produtos naturais consistem em tema frequente dentre pesquisadores químicos e farmacologistas no Brasil. Os autores indicam a existência de problema associado à falta de sincronia entre a indústria e as subáreas (química, farmacologia, genética, etc) envolvidas na

pesquisa básica, favorecendo para um insatisfatório índice de desenvolvimento de produtos inovadores (SHANG; TAN, 2005).

O reino vegetal é o que mais contribui para a obtenção de metabólitos secundários, muitos destes utilizados como medicamentos, cosméticos e defensivos agrícolas (MANN, 2002). Os produtos naturais nem sempre contribuem de maneira integral na síntese de medicamentos, porém em vários exemplos servem como modelo para síntese de fármacos sintéticos recentes: procaína, cloroquina, vincristina, vinblastina, camptotecina e outros (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; BUTLER, 2004; BALUNAS; KINGHORN, 2005; FERREIRA *et al.*, 2008).

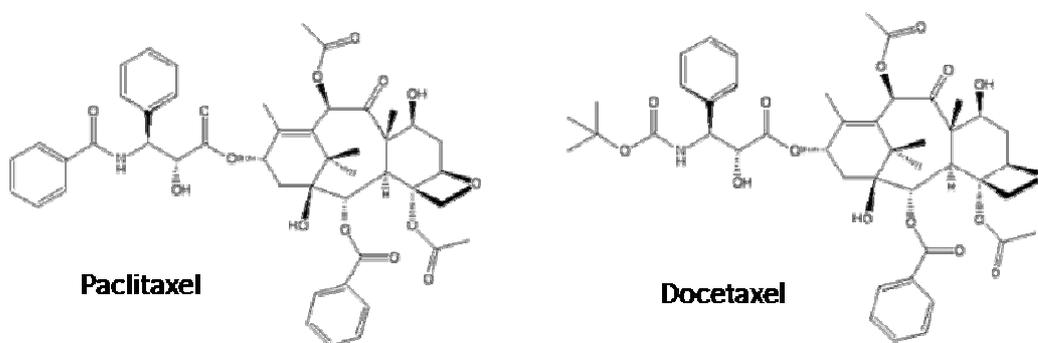
Os produtos naturais sempre tiveram importante papel no desenvolvimento de medicamentos, em especial “antineoplásicos”. Sendo assim a atenção têm sido voltada para moléculas comumente presentes na dieta (frutas, cereais, temperos e etc.), (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Muitas destas moléculas como os flavonóides já foram isoladas e testadas contra células cancerígenas (*in vivo e in vitro*) e apresentaram resultados alentadores, sugerindo que estas moléculas presentes nos produtos naturais não só podem ser utilizados no desenvolvimento de novos medicamentos, como também na prevenção do câncer (EISENHAUER; VERMORKEN, 1998).

A partir da década de 1980 e nos seguintes 20 anos que se passaram mais de 1.000 moléculas foram aprovadas como medicamento pela Food and Drug Administration (FDA), sendo que destes, 5% foram produtos naturais e 23% foram entidades químicas sintetizadas a partir dos produtos naturais, outros 20 % foram de moléculas sintéticas que “imitam” a atividade de produtos naturais. Apesar do avanço tecnológico nas técnicas de síntese e combinação química, os produtos naturais como também algumas plantas com propriedades medicinais continuam como uma relevante fonte para o desenvolvimento de medicamentos com atividade antiproliferativa (antifúngicos, antibacterianos, antineoplásicos, imunomodulatórios) (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Por meio de uma bioprospecção realizada em cerca de 114 mil extratos de aproximadamente 35 espécies de plantas o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI/US), foram apontados importantes agentes anticâncer (camptotencina, podofilotoxina. Neste sentido, considerando todas as drogas com propriedades antitumorais, cerca de 75% são originadas de produtos naturais e quase 10% são de moléculas sintéticas inspiradas em produtos naturais. Reconhecida a importância dos produtos naturais no tratamento das mais diversas patologias, há anos existe uma importante tendência na tentativa de sintetizar

análogos destes, em muitas situações visando maior estabilidade, solubilidade, moléculas mais específicas e com menos efeitos adversos. Um fenômeno que pode ser utilizado como exemplo foi o surgimento do diterpeno Paclitaxel, que posteriormente fora substituído em muitas situações pelo seu análogo Docetaxel, este último exibe atividade antitumoral similar ao seu protótipo, porém seus efeitos adversos são menos pronunciados (BALUNAS; KINGHORN, 2005; FERREIRA *et al.*, 2008).

**Figura 8.** Estrutura do paclitaxel e seu análogo docetaxel.



### 1.5 *Mitracarpus Baturitensis* Sucre (Rubiaceae)

No contexto dos produtos naturais a família Rubiaceae consiste em um grupo botânico que pertence às angiospermas, ocupando o quarto lugar em diversidade dentre estas. Compreende 637 gêneros e aproximadamente 13.000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do globo. (COELHO; AGUIAR; BARBOSA, 2006). É representada por 112 gêneros e 1347 espécies, das quais 66 gêneros e 270 espécies encontradas na região nordeste (GERMANÒ *et al.*, 1999). A família Rubiaceae é amplamente distribuída no globo terrestre, porém sua diversidade encontra-se mais concentrada em regiões de clima tropical, é considerada uma família botânica bastante importante para a sociedade, pois nela encontra-se o café, uma das bebidas mais requisitadas do mundo, além de possuir algumas espécies ornamentais e medicinais como a do gênero *Cinchona* que produz o quinino, utilizado no tratamento da malária (BISIGNANO *et al.*, 2000).

O *Mitracarpus baturitensis* Sucre consiste numa erva ereta, altura variando entre 13 e 70 cm de altura, sendo os caules tetrágonos a subtetrágonos, ramos opostos, glabros ou levemente pilosos sobre a bainha estipular, esparsamente ciliadas, folhas opostas sem

branquioblastos nas axilas, estreito-elípticas, agudas no ápice, agudas na base, herbáceas, com margens revolutas. Caracteriza-se pelos caules de ramificação oposta, além da corola glabra externamente e pelas sementes com depressão cruciforme dorsal. No Brasil o *Mitracarpus baturitensis* é encontrado no Distrito Federal, além dos estados Ceará, Bahia, Goiás, Piauí, Pernambuco, Paraíba e Mato Grosso. Corresponde a uma espécie heliófita, encontrada preferencialmente entre 40 e 1.000 metros de altitude, comumente em solos rochosos, lateríticos, inselbergs além de afloramentos rochosos na caatinga e no cerrado (FABRI *et al.*, 2012 (A)).

Algumas espécies do gênero *Mitracarpus* são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversos tipos de doenças, especialmente cefaléias, dor de dente, amenorréia, dispepsia, hanseníase e doenças venéreas (IROBI; DARAMOLA, 1993). Adicionalmente, as plantas pertencentes a este gênero estão associadas a importantes propriedades biológicas como antimicrobiana, antifúngica, hepatoprotetora, antiinflamatória, analgésica e citotóxica e laxativa (OKUNADE, 1999; FABRI *et al.*, 2012)

Um extrato do gênero *Mitracarpus Frigidus* mostrou importante citotoxicidade contra células cancerígenas (HL-60) e (MCF-7), apresentando IC<sub>50</sub> de 4.5 e 1.1 µM respectivamente. O mesmo extrato ainda demonstrou atividade citotóxica *in vitro* contra quatro espécies de Leishmania com IC<sub>50</sub> variando entre 1.7 a 2.7 µM (FABRI *et al.*, 2012). O óleo essencial obtido do *Mitracarpus Frigidus* exibiu uma moderada atividade inibitória contra *estaphylococcus aureus*, *bacilos cereus* e *pseudomonas aeruginosa*. O mesmo óleo exibiu relevante atividade de citotoxicidade contra alguns fungos como *Cryptococcus neoformans* e *Candida Albicans*. Foi testado contra formas de promastigotas (*L. major* e *L. amazonensis*), para estes foram encontradas IC<sub>50</sub> de 47.2 e 89.7 µg/mL respectivamente, neste caso apresentando potente inibição (FABRI *et al.*, 2012).

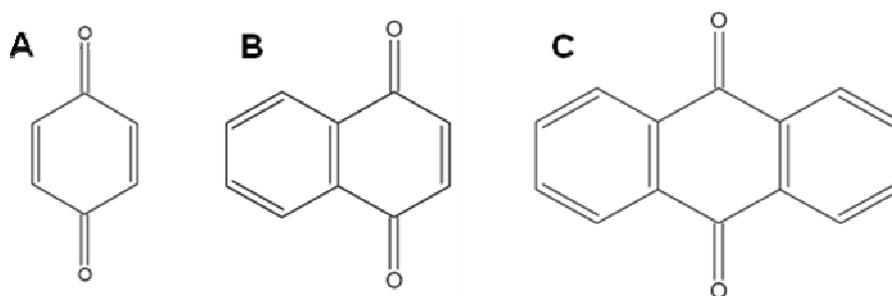
Ao extrato do *Mitracarpus scaber* foi atribuída um ação hepatoprotetora, em experimento *in vivo*, onde ratos pré – tratados com o composto CCL4 (indutor de dano ao hepatócito) e associados ao extrato do *Mitracarpus*, sofreram menos danos do que os animais tratados apenas com o CCL4. Dentre as classes de compostos com importante atividade biológica isolados do *Mitracarpus* estão a classe química quinona, estas possuem notáveis efeitos *in vitro*, bem como aplicabilidade na clínica oncológica. (GERMANÒ *et al.*, 1999).

## 1.6 Quinonas

As quinonas são uma relevante classe de substâncias presentes na natureza, podendo ser obtidas como produto sintético e com variedade de aplicações (THOMSON, 1987). A estrutura quinona foi identificada como um importante grupo farmacofórico, caracteriza-se por importante efeito citotóxico através de várias drogas utilizadas no tratamento de doenças (DRISCOLL *et al.*, 1974; LIU; LI; SAKYA, 2004), constituindo uma classe de agentes anti-neoplásicos bastante representativa (ASCHE, 2005).

As quinonas são compostos orgânicos que podem ser entendidos como resultado da oxidação de fenóis; da mesma forma, a redução de quinonas pode também originar os correspondentes fenóis. Sua característica marcante é a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C. Assim, em função do ciclo no qual o sistema de duplas e cetonas conjugadas está inserido, têm-se os três grupos principais de quinonas: benzoquinonas – um anel benzênico; naftoquinonas - um anel naftalênico; antraquinonas - um anel antracênico (Figura 9) (SIMÕES; SCKENKEL; GOSMANN, 2002).

**Figura 10:** Estruturas dos mais relevantes grupos de quinonas: benzoquinona (A), naftoquinona (B) e antraquinona (C).

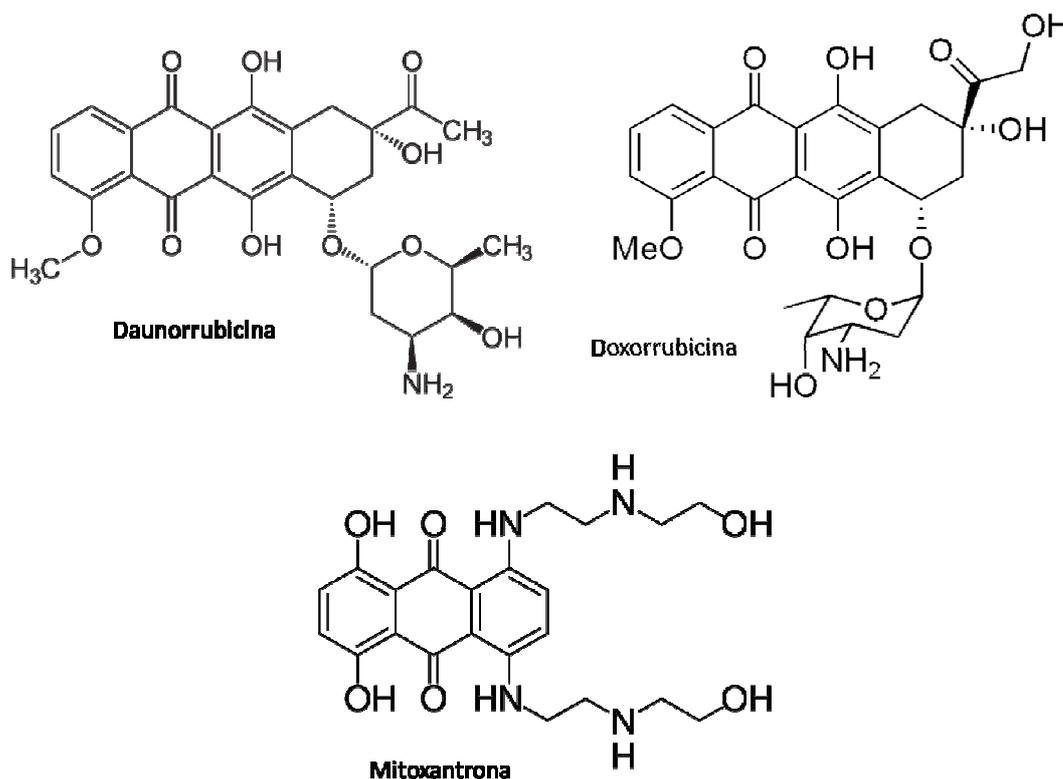


As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural. Em estudos farmacológicos, as quinonas mostram variadas atividades destacando-se, dentre outras, as propriedades microbicidas, anti-inflamatórias e antitumorais (MONKS *et al.*, 2002).

Drogas que possuem um grupamento quinona tais como antraquinonas e mitoxantronas apresentam uma excelente atividade anti-neoplásica na clínica oncológica, sendo bastante aceito que a citotoxicidade de quinonas esteja relacionada à geração de

espécies reativas de oxigênio, além da inibição da enzima topoisomerase-II, levando a quebra da molécula de DNA. No entanto, a contribuição exata da subestrutura quinona para seu efeito antitumoral permanece incerta (ASCHE, 2005).

**Figura 11.** Estruturas de quinonas utilizadas na clínica oncológica.



A doxorubicina representa um bem sucedido composto antineoplásico pertencente à classe das quinonas, a mesma é comumente utilizada nas doses 60-75 mg/mL, ou 1,2 a 2,4 mg/kg, em uma única injeção intravenosa, administrada com intervalos de 21 dias. Dosagens mais baixas podem ser usadas em pacientes com inadequada reserva medular ou por terapia anterior. Pode-se usar 20 mg/mL semanalmente ou 30 mg/ml em 3 dias consecutivos, repetindo-se após (MUÑOZ – GÁMEZ *et al.*, 2010). Há registros bem sucedidos da utilização da doxorubicina em neoplasias da mama, sarcomas dos ossos e tecidos moles, doença de Hodgkin, linfomas hodgkinianos e não hodgkinianos; neoplasias sólidas das crianças, neoplasias do pulmão, leucemias agudas e crônicas, neoplasias da bexiga, do ovário, da tireóide e do estômago, tumor de Wilms e neuroblastoma (MUSSI *et al.*, 2012)

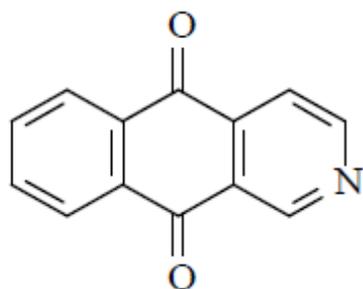
O grupo benzoquinona é também conhecido como par-quinona, em estado puro formam cristais brilhantes amarelo com odor irritante característico, semelhante a do cloro;

amostras impuras são muitas vezes de cor escura, devido à presença de quinidrona (1:1 complexo de quinona com hidroquinona). Este composto anel de seis membros é a derivada oxidada da hidroquinona 1,4 [1]. A molécula exibe as propriedades de uma cetona, formando uma oxima, um oxidante, formando o derivado dihidroxi e um alceno, passando disso. reações, especialmente aqueles típicos para  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados cetonas. 1,4-benzoquinona é sensível para ambos os ácidos minerais fortes e álcalis, que causam a condensação e decomposição do composto (KOYAMA, 2005).

A benz[g]isoquinolina-5,10-diona tem sido alvo de muitos estudos para determinação de atividades biológicas em diversos modelos experimentais nos últimos anos. Foi observado através de testes em insetos que a benzoisoquinolina era capaz de causar teratogênese e anormalidades morfológicas, quando este composto foi utilizado para tratar os ovos destes invertebrados. Estes dados sugerem que a benzoisoquinolina consiste em uma substância com elevado potencial inseticida (WALTON, 2010). Após realização ensaio de citotoxicidade *in vitro* para bactérias e fungos utilizando compostos benzoquinonas, constatou-se que a benzoisoquinolina apresentou a melhor atividade antibacteriana e uma notável ação antifúngica, sendo esta última ação comparável com o antibiótico anfotericina B (CLARK *et al.*, 1984).

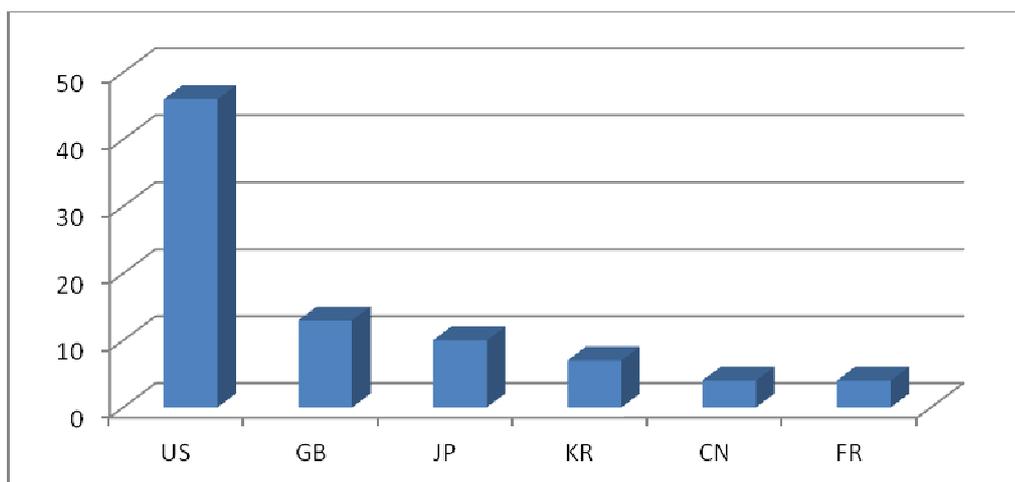
O composto FR42 foi disponibilizado pela Profa. Maria Rose Jane, da Universidade Estadual do Vale do Acaraú, faculdade de química, através uma parceria estabelecida com o Laboratório Nacional de Oncologia Experimental. Este último consiste no local onde são realizados os ensaios para avaliação das atividades biológicas da substância.

**Figura 12.** Estrutura química da Benzoisoquinolina



As benzoquinonas, bem como a benzoisoquinolina têm sido alvo de muitos estudos nas últimas três décadas, seus efeitos citotóxicos em ensaios *in vitro*, impulsionaram uma crescente taxa de depósito de patentes, fenômeno que ressalta a importância do estudo dos compostos pertencentes a este grupo (Figura 13) (KOYAMA, 2005).

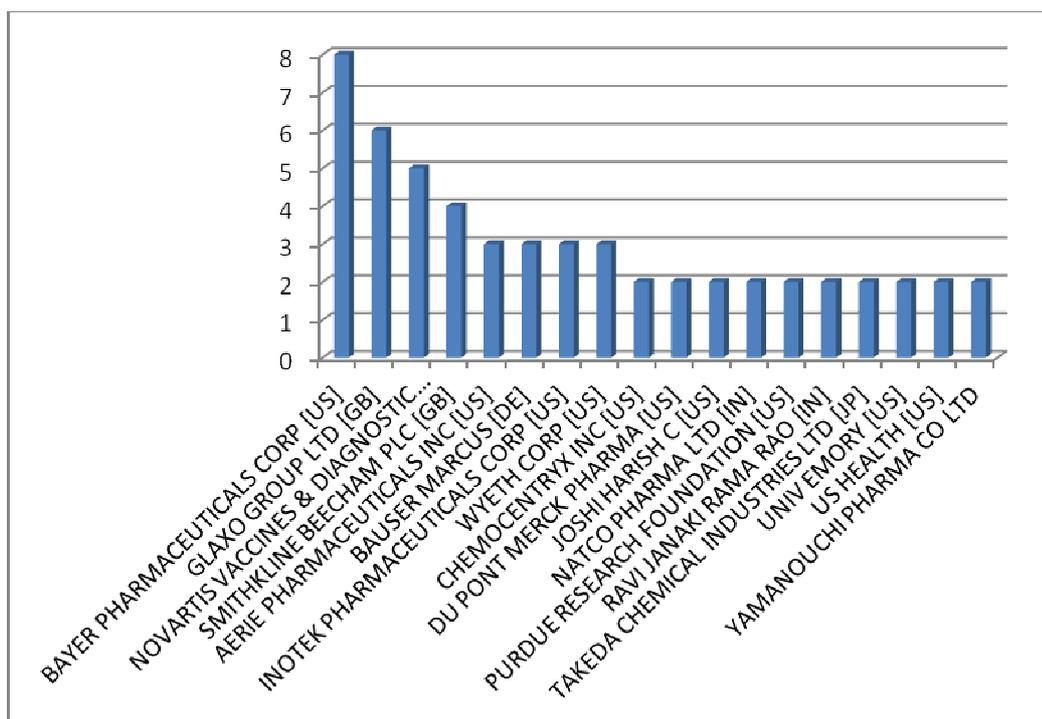
**Figura 13.** Taxa de depósito de patentes de benzoquinonas e benzoisoquinolinas por país.



Fonte: ESPACENET, 2013.

A Figura 14 mostra as empresas que mais depositaram patentes do grupo das benzoquinonas. Além da comprovada atividade antimicrobiana, este grupo exibe uma importante ação inseticida nos ensaios já realizados.

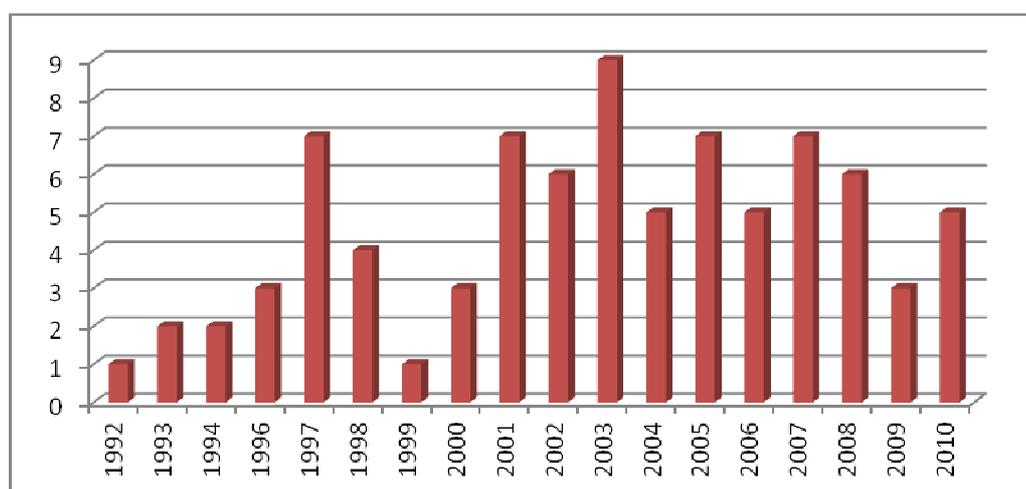
**Figura 14.** Empresas que mais depositaram patentes de compostos do grupo benzoquinona.



Fonte: ESPACENET, 2013.

De acordo com os dados extraídos do banco de patentes Espacenet em 2013, as três empresas que mais depositaram patentes relacionadas as benzoisoquinolinas e outras benzoquinonas foram a empresa farmacêutica Bayer, o grupo Glaxo e a Norvartis. O interesse da indústria farmacológica no grupo benzoquinona cresceu de maneira proporcional à obtenção de dados a respeito de suas atividade biológicas, especialmente a partir dos anos 1990 (Figura 15).

**Figura 15.** Evolução anual do depósito de patentes de benzoisoquinolinas e outras benzoquinonas.



Observando a Figura 15, é possível constatar que após o ano 2000, os depósitos de patentes para o grupo benzoquinona apresentaram maiores taxas.

Os mecanismos envolvidos na citotoxicidade da benzoisoquinolina ainda são desconhecidos, todavia outras quinonas já demonstraram mecanismos antineoplásicos importantes, algumas destas drogas são utilizadas com sucesso no tratamento de certos tipos de cânceres (Figura 11). Os mecanismos antitumorais relacionados com as quinonas já identificados envolvem: interferência no ciclo celular, inibição da topoisomerase, além da geração de espécies reativas de oxigênio. Obviamente os resultados obtidos com compostos quinona podem servir de parâmetro para realização de ensaios no estudo dos mecanismos anticâncer da benzoisoquinolina (FISCHER; GLOVER; LANE, 2004). Nesta perspectiva foi determinados objetivos envolvendo a investigação das possíveis ações citotóxicas e mecanismos de ação do composto testado contra células tumorais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Estudar o potencial citotóxico em células cancerígenas e os prováveis mecanismos de ação da FR42 (benzoisoquinolina), isolada do *Mitracarpus baturitensis*, em ensaios *in vitro*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar a  $IC_{50}$  da FR42 em um painel de linhagens celulares cancerígenas: Leucemia (HL-60, K-562), cólon (HCT-116), Ovário (Ovcar-8), glioblastoma (SF-295) e melanoma (MDA/MB-435) através do ensaio de MTT.
- Definir a citotoxicidade da FR42 sobre as células SF-295, através do ensaio de citotoxicidade em tempo real (XCELLlignce)
- Avaliar o provável mecanismo de ação da FR42 através de citometria de fluxo (integridade de membrana, fragmentação de DNA, despolarização mitocondrial) de células SF-295 (glioblastoma humano) tratadas com a benzoisoquinolina.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Materiais**

##### Equipamentos

Agitador de placa Shaker PSU – 2T plus

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2

Agitador de tubo, Donner AD 8850

Banho-maria, DELTA Modelo 105Di

Centrífuga Centimicro FANEN Modelo 212

Centrífuga de lâminas, Serocito®, Centrifuge Mod. 2400, FANEM®

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403

Centrífuga Excelsa Baby I FANEN Modelo 206

Citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mine

Espectrofotômetro de placa, DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California, USA

Estufa de secagem e esterilização FANEM Modelo 315 SE

Fluxo laminar VECO

High Throughput Screening (HTS)/Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter

Incubadora de células (CO2 Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow

Microondas, Panasonic

Pipetas automáticas, Gilson

Soluções, reagentes e fármacos

Ácido Acético	-	Vetec®
Ácido Clorídrico	-	Vetec®
Álcool Etílico	-	Vetec®
Agarose 1%	0,5g de agarose Água deionizada q.s.p. 50 mL	FMC- Bioprodu cts®
Agarose LMP 1,5%	1,5 g de agarose PBS q.s.p. 100 mL	Gibco®
Agarose NMP 0,5%	0,5 g de agarose PBS q.s.p. 100 mL Gibco®	Gibco®
Anticorpo biotinilado Antiimunoglobulina de Camundongo	1,0 mL de anticorpoanti- imunoglobulina BSA 5% q.s.p.100 µLde solução	Sigma®
Azul de tripan 10%	10,0 mg de azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® -
Brometo de Etídio 100 µg/mL	1,0 mg de brometo de etídeo PBS q.s.p 10 mL de solução	Sigma® -
Citrato de Sódio	-	Grupo Química®

Cloreto de Sódio (NaCl)	-	Labsynth ®
Diaminobenzidina (DAB)	1,0 mL de DAB 1,0 mL de Tris-HCl (Tris 0,05M) pH= 7,6 2,0 µL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Immunote ch® Proquímio s® Proquímio s®
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	Vetec®
Doxorrubicina	-	Zodiac®
EDTA	-	Qeel®
Eosina 0,5%	0,5 g de Eosina 80 mL de Álcool etílico 0,5 mL de Ácido acético 20 mL de H <sub>2</sub> O	Doles®
Estreptavidina- Peroxidase	1,0 µL de Estreptavidina- peroxidase BSA 5% q.s.p. 100 µL de solução	Sigma® Dako®
Ficoll	-	Sigma®
Fito hemaglutinina	-	Sigma®
Formaldeído 10%	100 mL de formaldeído H <sub>2</sub> O q.s.p. 1L	Dinâmica ®

		Doles®
	0,5 g de Hematoxilina	Labsynth
	10 mL de Glicerina	®
Hematoxilina 0,1%	25 g de Sulfato de alumínio	Labsynth
	0,1 g de Iodeto de potássio	®
	H <sub>2</sub> O q.s.p. 500 mL de solução	Labsynth
		®
Hidróxido de Sódio (NaOH)	-	Vetec®
Iodeto de propídeo 50 µg/mL	1,0 mg de iodeto de propídeo PBS q.s.p. 50 mL	Boehrin®
Laranja de Acridina	1,0 g de laranja de acridina (100 µg/mL) H <sub>2</sub> O q.s.p. 10,0 mL de solução Diluído em água deionizada e esterelizada, filtrado em filtro Millipore (0,22 µm) e complementado com SBF 10%, 1% de glutamina, 1% de antibióticos, 1% de bicarbonato de sódio (0,75 %) e 25 mM de HEPES	Fluka®
Meio de cultura de Células RPMI 1640		Cultilab®
MTT	20 mg de MTT PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® -
N-Lauroylsarcosine	-	Sigma®
Penicilina– Estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab® Cultilab®
Ringer-lactato	Cloreto de Sódio=0,600g Cloreto de Potássio=0,030g Cloreto de Cálcio 2H <sub>2</sub> O=0,020g Lactato de Sódio=0,30g	Laboratóri os Biosintétic a®

Água q.s.p. 100 mL

		Gentamicin
Sulfato de Gentamicina	-	Novafarma®
Solução de Eletroforese	EDTA 1,0 mM, NaOH 300 mM, pH>13	-
Solução de Lise	NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM Tris 10 mM, N-Lauroylsarcosine 1% pH=10, TritonX-100 1%, DMSO 10%	-
Solução de Neutralização	Tris 0,4 M, pH=7,5	-
Soro fetal bovino	-	Cultilab®
Solução salina (para hemólise)	8,5 g de Cloreto de sódio (0,85%) 1,11 g de Cloreto de cálcio (10 mM) H <sub>2</sub> O q.s.p 1L de solução	Labsynth® Reagen®
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Citrato de sódio 0,15 M H <sub>2</sub> O	-
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio 2,14 g de NaHPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,276 g de NaHPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O q.s.p. 1L de solução (pH=7,2)	Labsynth® Labsynth® Labsynth®
		-

		Labsynth
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M	®
	Tris 0,5 M (pH=7,6)	Proquímios
	H <sub>2</sub> O	s®
		-
Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5%	Cultilab®
	0,125 g de EDTA	Proquímios
	450 mL de PBS	s®
		-
TritonX-100	-	Isofar®
Xilol 10%	100 mL de formaldeído	Dinâmica
	H <sub>2</sub> O q.s.p. 1L	®

As células utilizadas nos ensaios estão listadas quanto ao tipo histológico e a origem na **tabela 1**.

**Tabela 1** - Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e estudo do mecanismo de ação da FR42.

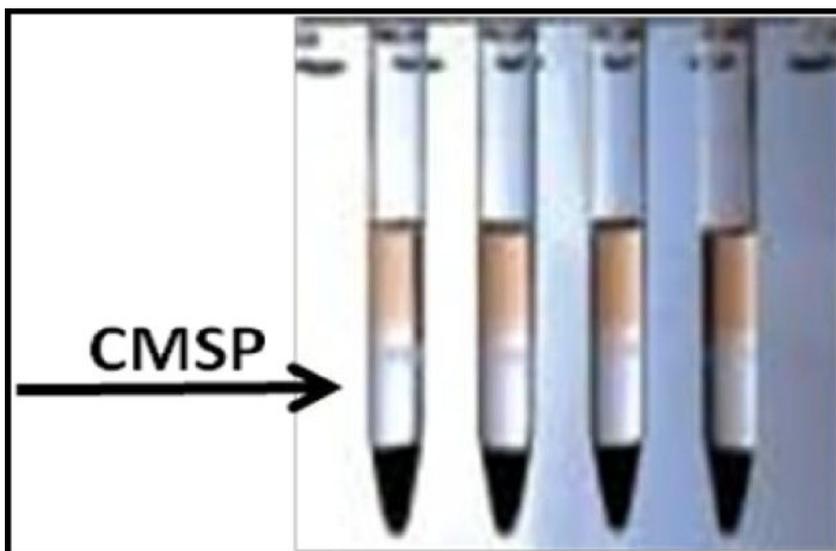
Linhagem	Tipo Histológico	Origem
HL-60	Leucemia	Humana
HCT-116	Carcinoma de cólon	Humana
SF-295	Glioblastoma	Humana
MDAMB-435	Carcinomademama	Humana
OVCAR-8	Câncer ovariano	Humana
CMSPH	Linfócitos	Humana

### 3.2 Obtenção e cultivo das células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários. A coleta de sangue foi realizada em frascos heparinizados (*vacuntainer*) por profissionais da Universidade Federal do Ceará. Cujo protocolo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisas com seres humanos.

As células foram isoladas através de um gradiente de densidade por meio da utilização do Histopaque<sup>TM</sup>-1077. Uma amostra de 3mL de sangue periférico foi diluída em 5mL de PBS. Essa solução foi adicionada a um tubo Falcon contendo 2mL de Histopaque<sup>TM</sup>-1077 e, posteriormente, centrifugada por 30 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, a solução foi separada, em virtude da densidade do Histopaque<sup>TM</sup>-1077, em três camadas visíveis (Figura 16). Uma superior (soro), uma intermediária (células) e uma inferior (hemácias). Em seguida, a região intermediária foi cuidadosamente removida e adicionada a um terceiro tubo contendo PBS, o qual foi centrifugado por 20 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspendido em 2mL de PBS. As células foram utilizadas imediatamente após o processo de isolamento, sendo cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e fitohemaglutinina (2 a 4%).

**Figura16.** Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) por meio de gradiente de densidade estabelecido pelo Histopaque<sup>TM</sup>-1077.



### 3.3 Obtenção das moléculas

#### Extração e isolamento

*M. baturitensis* foi coletado em maio de 2009, na Serra do Rosário, Sobral-CE. A identificação botânica foi realizada pelo Prof. Elnatan Bezerra de Sousa, Curso de Biologia da UVA. A exsiccata da planta, correspondente a coleta, encontra-se depositada no Herbário Francisco José de Abreu Matos do Centro de Ciências Agrárias e Biológicas da UVA sob o número de registro 14.660.

**Figura 17.** Gênero *Mitracarpus*.



Fonte: THE PLANT LIST, 2013.

A parte aérea (518,2 g) foi seca à temperatura ambiente, triturada e submetida à extração exaustiva com hexano a frio, seguida de EtOH. As soluções obtidas foram destiladas sob pressão reduzida, resultando nos extratos hexânico (6,9 g) e EtOH (37,8 g). O extrato

hexânico foi fracionado sobre gel de sílica utilizando os solventes hexano, hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de 25% em 25% até AcOEt, AcOEt/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de 25 em 25% até AcOEt, seguido de MeOH. A fração hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 50% (713,3 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico, após diversos procedimentos cromatográficos em gel de sílica, resultou no isolamento da benzoquinona benz[g]isoquinolina-5,10-diona (**1**; 12 mg). A determinação estrutural de **1** foi realizada por meio da interpretação dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, bem como por análise comparativa dos dados de RMN <sup>13</sup>C.

### **3.4 Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas - teste do MTT**

#### Princípio do teste

A avaliação do efeito citotóxico dos compostos quinônicos em células tumorais humanas foi realizada pelo Teste do MTT após 72 h de incubação. Este é um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido por Mosmann em 1983 para estimar a proliferação e a sobrevivência celular. É definido na literatura como apropriado para estimar a citotoxicidade e baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Essa técnica permite analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

#### Procedimento experimental

Inicialmente o FR42 foi testado em concentração única (5 µg/mL) para avaliação do potencial citotóxico. Nesta etapa, foram utilizadas três linhagens de tumores sólidos (HCT-116, SF-295 e MDA-MB-435). A partir deste *screening* inicial foram consideradas ativas as amostras que obtiveram um percentual de inibição do crescimento celular maior, ou igual a 90%, em pelo menos uma das linhagens testadas.

Em seguida, as amostras selecionadas foram testadas em um painel de linhagens celulares de diferentes origens (Tabela 1), para determinação de suas  $CI_{50}$  (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular), como descrito a seguir.

As células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, para células em suspensão (HL-60), e  $0,1 \times 10^6$  (SF-295), ou  $0,7 \times 10^5$  células/mL (HCT-116) e (OVCAR-8), para células aderidas. Após 72h de incubação, os estéres (0,09 a 25  $\mu\text{g/mL}$ ) dissolvidos em DMSO foram adicionados a cada poço, utilizando o HTS (high-throughput screening), e as placas incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,003 a 0,25  $\mu\text{g/mL}$ . O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (15 G/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio RPMI 1640) e a placa reincubada por 3 horas, em estufa a 37 °C e a 5%  $\text{CO}_2$ . Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (30 RPM/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensionado em 150  $\mu\text{L}$  de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm.

### Análise dos dados

Os compostos foram testados em diluição seriada, em triplicata. Foi registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinadas suas  $CI_{50}$  e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando, o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

#### 3.4.1 Avaliação da atividade citotóxica em células mononucleares de sangue humano periférico (CMSP) – ensaio do alamar blue

### Princípio do Teste

Com o objetivo de estudar a atividade dos compostos sobre a proliferação de células normais, o ensaio do alamar blue foi realizado com células mononucleares de sangue periférico (CMSP), que inclui linfócitos e monócitos. O alamar blue, recentemente identificado como resazurina, é um indicador fluorescente/colorimétrico, onde em sua forma oxidada apresenta uma coloração azul (não fluorescente/célula não viável) e em sua forma reduzida uma

coloração rósea (fluorescente/célula viável). Assim como o MTT, o alamar blue reduz-se em células viáveis, e assim pode ser quantificado e utilizado para avaliar a viabilidade celular.

### Procedimento Experimental

As células mononucleares foram isolados a partir de uma amostra de cerca de 5 mL de sangue periférico de voluntários sadios, acrescida de 5 mL de PBS. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3 mL de Ficoll, seguida por 30 minutos de centrifugação a 1500rpm, e feita aspiração das células mononucleares presentes na região intermediária entre as hemácias e o soro (“nuvem de linfócitos”). A suspensão de linfócitos foi transferida para um outro tubo ao qual foi acrescido PBS até o volume de 11 mL, sendo centrifugado por 20 min a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet de linfócitos foi ressuscitado em 2 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina para uma concentração final de final  $3 \times 10^5$  células/mL. Fitohemaglutinina (3%) foi adicionada para induzir a proliferação dos linfócitos. Após 24 horas de incubação das células, as substâncias em estudo foram adicionadas em concentrações seriadas (0,009 - 5 µg/mL) juntamente com 10 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade. A doxorrubicina (0,009 - 5 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Após o período de incubação as absorbâncias foram medidas no espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado).

### Análise dos Dados

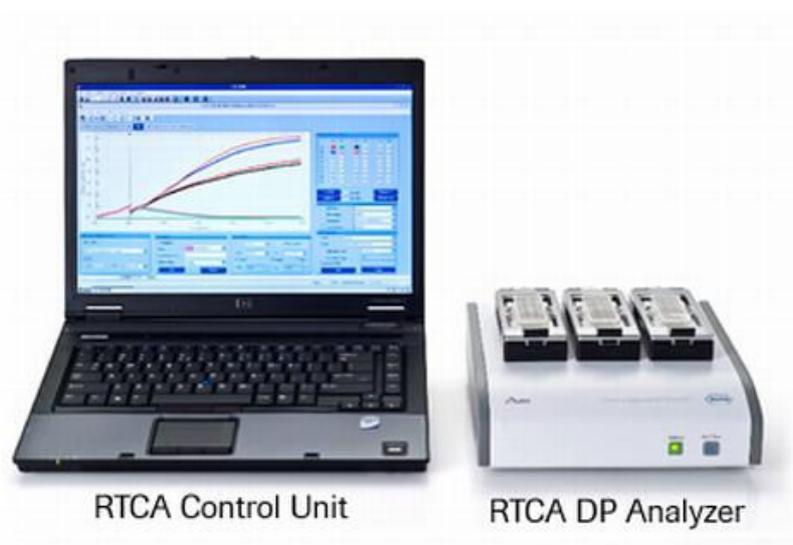
A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % proliferação =  $A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$ . Onde,  $A_{LW}$  e  $A_{HW}$  são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O  $R_0$  foi calculado utilizando a seguinte fórmula:  $R_0 = AO_{LW} / AO_{HW}$ . Onde,  $AO_{LW}$  e  $AO_{HW}$  são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. A absorbância foi medida usando um leitor de multiplacas (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Califórnia, EUA). O efeito da droga foi quantificado como a porcentagem da absorbância controle a 570 nm e a 595 nm. Os compostos foram testados em diluição seriada, em duplicata ou triplicata, e suas  $CI_{50}$

(concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram determinados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad Software).

### 3.5 Ensaio de citotoxicidade em tempo real

O ensaio de citotoxicidade em tempo real foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do equipamento (xCELLigence – Roche). As células foram plaqueadas em uma placa de 16 poços com microeletrodos no fundo de cada poço e colocadas no xCELLigence (Figura 18). Foram inicialmente incubadas por 24 horas. Após este período foram administrados os compostos testados. O sistema xCELLigence fornece um histograma em tempo real. As células SF-295 foram utilizadas neste ensaio, após observada sua maior seletividade, as mesmas foram plaqueadas na concentração de  $0,1 \times 10^6$  células/mL.

**Figura 18.** Equipamento xCELLigence – Roche.



### 3.6 Estudo de Mecanismo de Ação

## Citometria de Fluxo

As células SF-295 foram tratadas com benzoisoquinolina, incubadas nos tempos de e 48h. Todas as análises foram realizadas no citômetro Guava EasyCyte Mine (Guava Express Plus software). Cinco mil eventos foram quantificados por fibra e os debris celulares serão omitidos das análises. A citometria de fluxo (EasyCyte, Guava Technologies) é capaz de comparar populações de células quanto às características de tamanho e de granulosidade (relativo a organelas, vacúolos etc) usando um laser de argônio (488nm). A partir desta ferramenta, pode-se delimitar a região (através de um *gate*) que compreende a população de células normais realizando a contagem da população de interesse.

### 3.6.1 Integridade de Membrana

Para avaliar a integridade das membranas das células SF-295 tratadas, foi utilizada uma suspensão de células (50 $\mu$ L) na concentração de  $0,1 \times 10^6$ /mL, incubada com iodeto de propídeo (PI, 50 $\mu$ g/mL) diluído em PBS (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1992).

### 3.6.2 Fragmentação de DNA

Para análise da fragmentação internucleossomal do DNA foi utilizada uma suspensão de células (50  $\mu$ L) na concentração de  $0,1 \times 10^6$ /mL, incubada a 25 °C com PI (50  $\mu$ g/mL), 0,1 % de citrato de sódio e 0,1 % de Triton X-100. Após um período de 30 minutos de incubação protegido de luminosidade, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

### 3.6.3 Potencial transmembrânico mitocondrial

A despolarização mitocondrial foi determinada através da incorporação de rodamina 123 (Sigma Aldrich Co. - St. Louis, MO/USA), um corante fluorescente catiônico capaz de atravessar a membrana celular sem induzir efeitos citotóxicos. As células serão centrifugadas a 2000rpm por 5 min. (o sobrenadante foi descartado) e as células foram incubadas com rodamina 123 (1  $\mu$ g/mL em PBS) por 15 minutos na ausência de luz à temperatura ambiente. Após esse período de incubação, as células serão centrifugadas e o sobrenadante, descartado. O precipitado foi ressuspendido em PBS e incubado por mais 30 minutos.

#### Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. Possíveis diferenças significativas serão calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de *Student Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ), usando o programa *GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA)*.

### 3.6.4 Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula

#### Princípio do teste

Este ensaio foi realizado com o intuito de determinar o conteúdo de DNA nuclear das células. O teste baseia-se na capacidade do corante IP em ligar-se ao DNA celular e emitir fluorescência vermelha em intensidade proporcional ao seu conteúdo. Assim, as diferentes fases do ciclo celular ( $G_0/G_1$ , S e  $G_2/M$ ) podem ser determinadas a partir do seu conteúdo de

DNA. Quando a célula apresenta cromatina condensada e/ou DNA fragmentado (sub-G1), a quantidade de IP incorporada é menor, e, portanto emitirá baixa fluorescência.

### Procedimento experimental

As células SF-295 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 48 h. Uma alíquota de 100 µL foi recolhida da suspensão de células e diluída com a solução de lise contendo IP (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de triton X-100 e 2 µg/mL iodeto de propídeo em PBS). Após 30 minutos na ausência de luz e a 37 °C, o material (cinco mil eventos) foi analisado por citometria de fluxo.

### Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da atividade citotóxica da FR42

O estudo inicial da citotoxicidade da FR42 foi realizado em quatro linhagens tumorais humanas (HL-60, HCT-116, MDA-MB, OVCAR-8 e SF-295) e uma linhagem normal, as células mononucleares de sangue periférico (CMSP). Sendo a citotoxicidade determinada pelo teste do MTT, após 72h de incubação para as células cancerígenas e o teste Alamar Blue para as (CMSPH). As células foram incubadas com concentrações que variaram entre 0,38 a 23,90 µg/mL, a fim de determinar a IC<sub>50</sub>.

Na análise da atividade citotóxica da FR42, foi determinado que a mesma apresentou elevada citotoxicidade para células de linhagens cancerígenas de diferentes tipos histológicos. Tendo sido observado que o menor valor de IC<sub>50</sub> foi (1,70-2,45) µM para linhagens SF-295 (Tabela 2). Enquanto que para células normais (CMSP) a IC<sub>50</sub> foi de 16,82 µM (Tabela 3).

**Tabela 2** - Atividade citotóxica da FR42 em linhagens de células tumorais pelo método MTT. A doxorubicina (DOX) foi usada como controle positivo.

<b>Linhagens</b>	<b>FR42</b>	<b>DOX</b>
SF-295	2,00 µM (1,70-2,45)	0,41 µM (0,34-0,46)
HCT-116	2,10 µM (1,72-2,48)	0,21 µM (0,15-0,29)
OVCAR-8	4,39 µM (3,53-5,40)	0,45 µM (0,29-0,52)
HL-60	2,20 µM (1,90-2,77)	0,02 µM (0,02-0,03)

A tabela apresenta os valores de CI<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) (µM) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) realizado pelo teste do MTT, após 72 h de incubação obtidos por regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism. \* n.d. = não determinado.

O composto FR42 apresentou elevada toxicidade para todas as células tumorais testadas, todavia a células tumorais SF-295 (Glioblastoma humano) foi selecionada para realização para estudo dos possíveis mecanismos de ação, haja vista a agressividade dos

tumores provocados por transformações similares as observadas nestas células (SF-295) no sistema nervoso central.

**Tabela 3** – Determinação da atividade citotóxica da benzoisoquinolina em células normais (Células Mononucleares do Sangue Periférico Humano) pelo ensaio Alamar Blue.

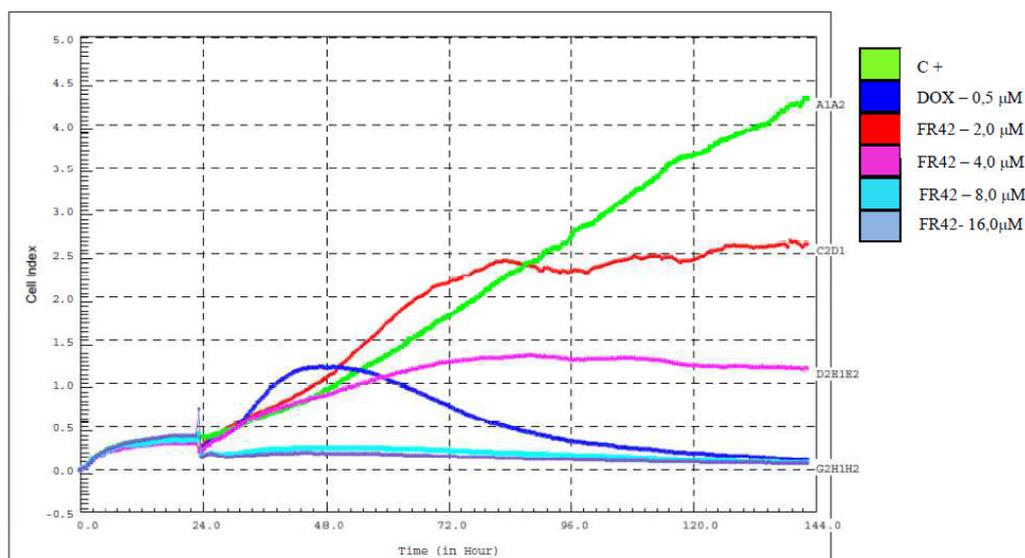
<b>Linhagem</b>	<b>Benzoisoquinolina</b>	<b>DOX</b>
CMSP	16,82 $\mu$ M (12,18-23,27)	1,78 $\mu$ M (0,52-1,80)

Os resultados são apresentados em valores de  $CI_{50}$  com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de três experimentos independentes, feitos em duplicata.

#### 4.2 Ensaio de citotoxicidade em tempo real.

No ensaio de citotoxicidade em tempo real as células SF-295 foram plaqueadas em placas de 16 poços. Foram incubadas durante 24 horas. Após decorridas 24 horas as células foram tratadas com a FR42 e a doxorubicina, a qual foi utilizada como controle positivo. Como pode ser observado na Figura 19, a FR42 apresentou diminuição da proliferação celular nas duas maiores concentrações (8,0 e 16,0  $\mu$ M), efeito evidenciado logo após o tratamento.

**Figura 19.** O histograma foi obtido através do sistema xCELLigence. O composto FR42 foi testado nas concentrações de 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 8  $\mu$ M e 16  $\mu$ M. A doxorubicina (DOX) na concentração de 0,5  $\mu$ M foi utilizada como controle positivo. Todos os compostos foram administrados após 24 horas de incubação das células. O experimento foi realizado em triplicata.



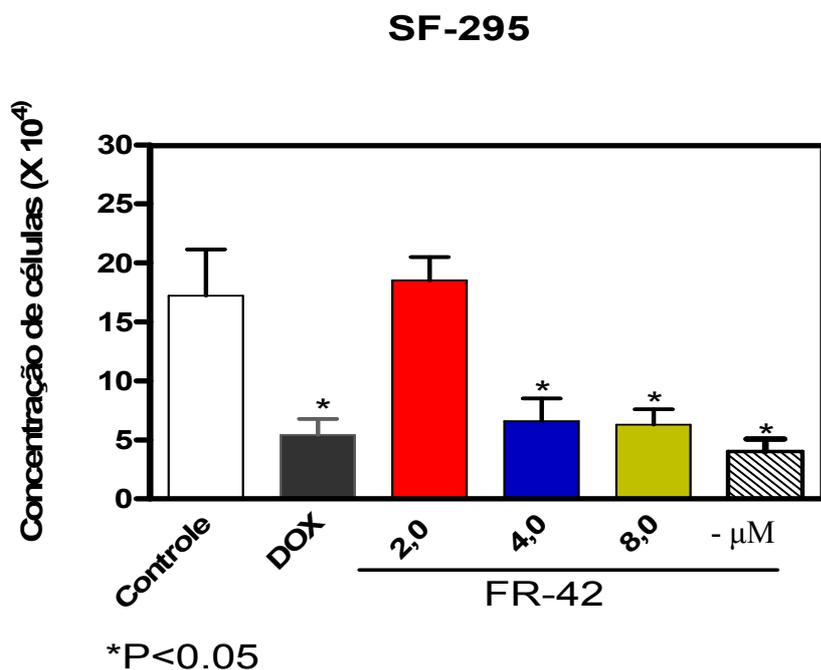


### 4.3 Análises celulares utilizando citometria de fluxo

#### 4.3.1 Integridade de membrana celular e concentração de células por citometria de fluxo.

Como mostrado na Figura 20, a FR42 provocou diminuição do número de células de maneira dose-dependente, sendo que a porcentagem de células viáveis foi reduzida significativamente nas concentrações de 4  $\mu\text{M}$   $6,59 \pm 4,70 \%$  ( $p < 0,05$ ), 8  $\mu\text{M}$ ,  $6,28 \pm 3,17 \%$  ( $p < 0,05$ ) e 16  $\mu\text{M}$ ,  $4,02 \pm 2,59 \%$  ( $p < 0,05$ ). A doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo e causou diminuição significativa do número de células.

**Figura 20.** Efeito da FR42 nas concentrações 2,0, 4,0, 8,0 e 16  $\mu\text{M}$  sobre a densidade de células cancerígenas SF-295, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 48 horas de incubação.

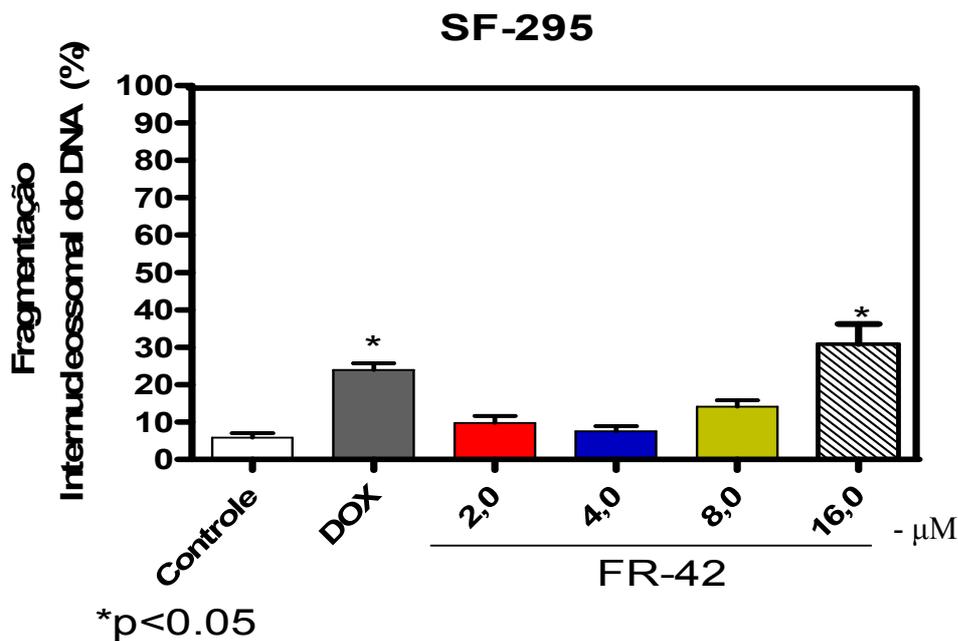


O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias. A doxorubicina (DOX) na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  foi utilizada como controle positivo. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \* $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

#### 4.3.2 Análise do ciclo celular e da fragmentação de DNA por citometria de fluxo

A progressão do ciclo celular e a fragmentação internucleossomal do DNA das células de SF-295, tratadas com a FR42 nas concentrações 2,0, 4,0, 8,0 e 16  $\mu$ M foram realizadas por citometria de fluxo e analisadas através do programa ModFit LT 3.1. Os resultados demonstram que tanto o controle positivo (DOX) quanto a maior concentração da FR42 causaram aumento significativo na fragmentação do DNA. Após 48 horas de exposição, as células do controle negativo apresentaram  $5,8 \pm 2,57\%$  ( $p < 0,05$ ) de fragmentação, enquanto que as células tratadas com FR42 na concentração de 16,0  $\mu$ M apresentaram  $30,8 \pm 12,14\%$  ( $p < 0,05$ ) de fragmentação do DNA. Já a Doxorubicina, utilizada como controle positivo mostrou  $25,3 \pm 3,83\%$  ( $p < 0,05$ ) das células com DNA fragmentado (Figura 21).

Figura 21. Fragmentação internucleossomal de DNA.

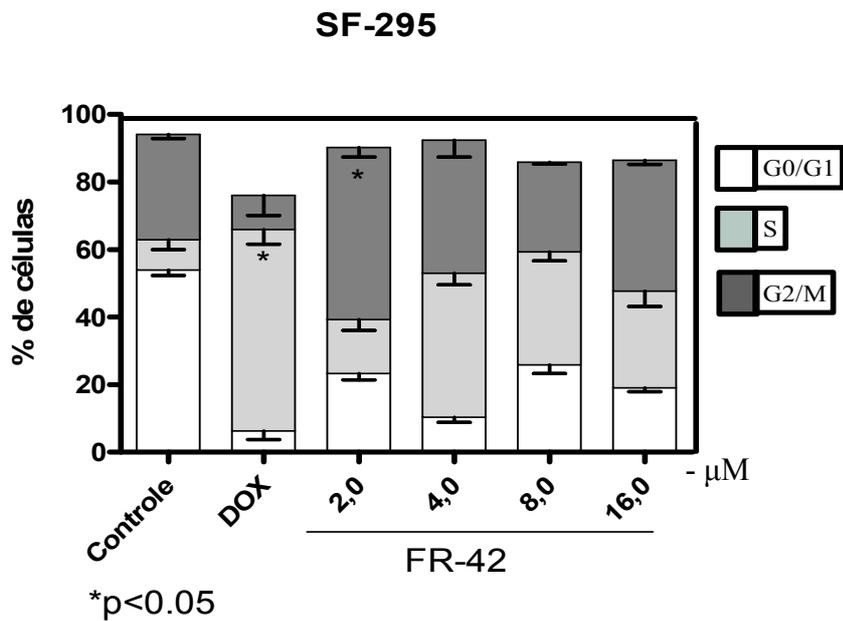


O composto FR42 foi testado nas concentrações 2,0, 4,0, 8,0, e 16  $\mu$ M. A doxorubicina 0,5  $\mu$ M (DOX) foi utilizada como controle positivo. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

O composto FR42 nas concentrações 2,0, 4,0, 8,0 e 16  $\mu$ M foi testado quanto sua interferência na progressão do ciclo celular. Neste sentido a molécula testada (FR42) na concentração de 2,0  $\mu$ M induziu um acúmulo de  $50,9 \pm 2,78\%$  ( $p < 0,05$ ) na fase G2/M das

células SF-295. A doxorubicina 0,5  $\mu\text{M}$  (DOX) foi utilizada como controle positivo e este promoveu um acúmulo de  $59,7 \pm 4,36\%$  ( $p < 0,05$ ) na fase S das células SF-295. (Figura 22).

**Figura 22.** Efeito do composto FR42 (2,0, 4,0, 8,0 e 16  $\mu\text{M}$ ) sobre o ciclo celular da SF-295 após incubação de 48 horas.

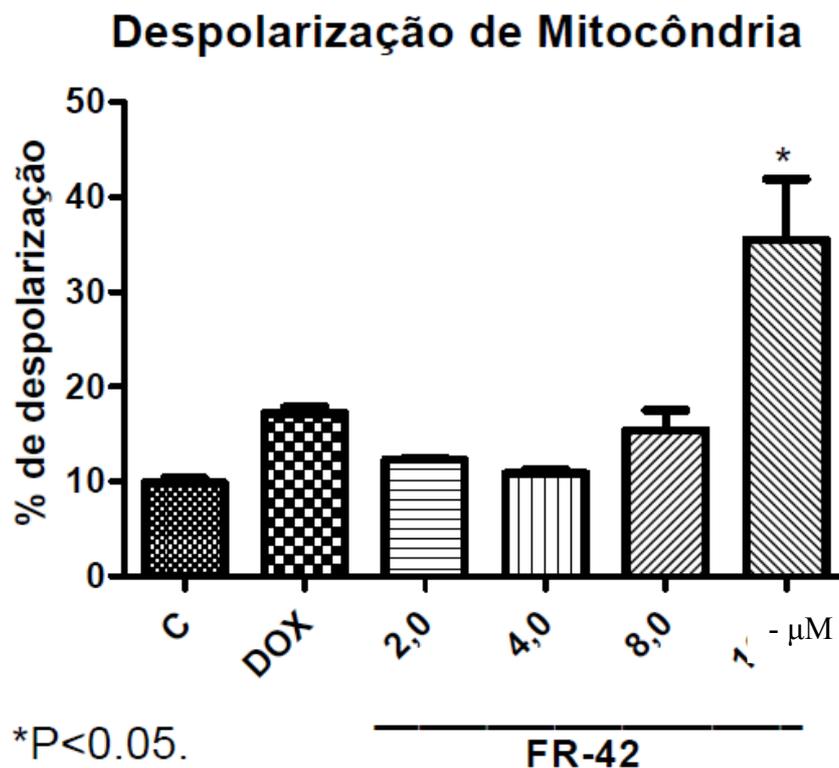


A doxorubicina 0,5  $\mu\text{M}$  (DOX) foi utilizada como controle positivo. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

#### 4.3.3 Determinação do Potencial Transmembrânico de Mitocôndria

Na figura 23, pode ser observado o efeito do composto FR42 (2,0, 4,0, 8,0 e 16  $\mu\text{M}$ ) sobre o potencial de membrana mitocondrial. Como controle positivo foi utilizada Doxorubicina 0,5  $\mu\text{M}$  (DOX). Células tratadas com o composto FR42, na concentração de 16,0  $\mu\text{M}$ , apresentaram  $35,5 \pm 12,14\%$  ( $p < 0,05$ ) de redução do potencial de membrana mitocondrial, enquanto que o controle negativo apresentou apenas  $9,8 \pm 2,57\%$  ( $p < 0,05$ ). A doxorubicina causou  $17,2 \pm 3,83\%$  ( $p < 0,05$ ) diminuição do potencial de membrana.

**Figura 23.** Efeito da FR42 (2,0, 4,0, 8,0 e 16  $\mu$ M) sobre o potencial transmembrânico em células SF-295, determinado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123, após 48 horas de incubação.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias. A doxorubicina 0,5  $\mu$ M (DOX) foi utilizada como controle positivo. Os dados correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.



## 5 DISCUSSÃO

Há uma quantidade grande de drogas anti-neoplásicas oriundas de vegetais sob avaliação pré-clínica e clínica (BALLADRIN *et al.*, 1993), e apesar do desenvolvimento da química combinatória e da modelagem molecular, a quimioterapia do câncer ainda não apresenta resultados alentadores, devido à múltipla resistência às drogas e aos sérios efeitos colaterais resultantes das similaridades morfológicas e fisiológicas entre as células normais e transformadas, o que torna uma tarefa difícil evitar a toxicidade advinda do tratamento. Por isso, é relevante identificar moléculas naturais com potencial atividade terapêutica para a realização de futuros estudos clínicos e que sirvam de alicerce de conhecimento para a síntese de novos compostos com atividade tumoral mais efetiva e menos tóxica e/ou novos mecanismos de ação (KAMB, 2005).

A planta *Mitracarpus baturitensis* Sucre já foi utilizada na medicina tradicional no tratamento de algumas enfermidades como cefaléias, dispepsia, hanseníase e doenças venéreas (FABRI *et al.*, 2009). Ao gênero *Mitracarpus* foi atribuída atividade antiviral, antifúngica, inseticida, citotóxica e hepatoprotetora (OKUNADE, 1999).

As quinonas representam uma grande classe de metabólitos de distribuição natural ou produto de síntese com uma grande variedade de funções em sistemas biológicos (ASCHE, 2005). Esses são de interesse tanto farmacológico quanto toxicológico uma vez que vários fármacos clinicamente importantes na terapia do câncer contêm o núcleo quinona (como as antraciclinas, mitoxantrona e saintopina) apresentando excelente atividade anti-câncer (FOYE, 1995; MONKS; JONES, 2002).

Nos últimos anos intensificou-se o interesse nestas substâncias, não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em variados estudos farmacológicos (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). Muitos análogos estruturalmente relacionados às naftoquinonas de origem natural e sintética, tais como plumbagina, lapachol, menadiona e seus derivados, estão sendo estudados devido ao seu potencial anticâncer contra várias linhagens de células tumorais *in vitro* e *in vivo* (NOTO *et al.*, 1989; NGO *et al.*, 1991; HSU *et al.*, 2006; ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2007).

Dados obtidos através do ensaio de citotoxicidade (MTT) mostraram que o composto FR42 exibiu elevada toxicidade para todas as células tumorais testadas, apresentado HCT-116  $IC_{50}$  - 2,10  $\mu$ M, OVCAR-8  $IC_{50}$  - 4,39  $\mu$ M, HL-60  $IC_{50}$  - 2,20  $\mu$ M (tabela 2). A partir destes

resultados iniciais a célula cancerígena SF-295 (glioblastoma humano) foi selecionada para realização dos demais testes, neste sentido levou-se em consideração a agressividade deste tipo de tumor. Estudos prévios indicam que compostos da classe quinona tendem a apresentar elevada citotoxicidade para células cancerígenas, corroborando os resultados obtido em nosso trabalho (TANDON *et al.*, 2004; RYU *et al.*, 2003).

Uma grande desvantagem no tratamento do câncer utilizando quimioterápicos são os seus efeitos colaterais. A baixa seletividade dos compostos às células tumorais favorecem para que células normais sejam mais afetadas, especialmente as que proliferam rapidamente, como as da pele, do trato gastrointestinal e do sangue. Neste sentido, o principal foco da quimioterapia é a busca por novas drogas seletivas que sejam capazes de destruir apenas as células tumorais, poupando as células normais (ANAZETTI *et al.*, 2003). A avaliação do potencial citotóxico de um composto, é de fundamental importância à utilização de células normais, tais como os linfócitos, para investigar a seletividade da substância teste para células normais ou cancerígenas (ZUCO *et al.*, 2002).

O composto FR42 apresentou  $IC_{50}$  em CMSP entre 16,82  $\mu$ M (Tabela 3). Apesar de considerar-se importante tal citotoxicidade para às células normais, pode ser ressaltado que os valores de  $IC_{50}$  para SF-295 e CMSP podem ser traduzidos numa maior sensibilidade das células de glioblastoma humano ao composto FR42.

Diversos compostos de ocorrência natural exercem sua atividade antiproliferativa em células cancerígenas como um resultado do impedimento da progressão do ciclo celular (ANAZETTI *et al.*, 2003). Para investigação de possível efeito no ciclo celular foi realizado previamente um ensaio de citotoxicidade em tempo real, para estabelecimento da dose de trabalho, bem como o período de incubação com o composto. Os resultados obtidos através do ensaio de citotoxicidade em tempo real e expresso por histograma disponibilizado pelo sistema xCELLigence, indicaram uma importante toxicidade do composto FR42 nas concentrações de 8,0  $\mu$ M e 16,0  $\mu$ M poucos minutos após a administração. Na concentração 4  $\mu$ M observou-se um efeito citotóxico mais discreto, a partir das 24 horas após sua incubação, após este período o efeito citotóxico manteve-se constante, sugerindo uma atividade citostática na horas seguintes. A dose de 2  $\mu$ M apresentou citotoxicidade apenas após 48 horas após administração, neste caso nas horas seguintes também apresentou uma atividade citostática (figura 19). Muitos análogos estruturalmente relacionados com a FR42 (benzoisoquinolina) de ocorrência natural ou origem sintética apresentaram citotoxicidade *in*

*vitro e in vivo* (NOTO *et al.*, 1989; NGO *et al.*, 1991; HSU *et al.*, 2006; ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2007).

As células em apoptose caracterizam-se por suas membranas íntegras durante quase todo o processo até a sua morte, de maneira oposta às necróticas. Em confirmação com os resultados de MTT e o ensaio de citotoxicidade em tempo real (figura 19), o composto FR42 reduziu significativamente e de maneira concentração-dependente a quantidade de células viáveis. FR42 diminuiu a integridade da membrana plasmática nas três maiores concentrações testadas (4,0, 8,0, e 16,0  $\mu\text{M}$ ) (figura 20). Os dados de concentração de células e integridade de membrana corroboram com os resultados do ensaio de citotoxicidade em tempo real, onde somente a dose de (2  $\mu\text{M}$ ) não apresentou uma diminuição significativa na viabilidade celular.

Além da já comprovada atividade antineoplásica de alguns compostos da classe quinona utilizados para tratamento de vários tipos de cânceres como a doxorubicina e daunorubicina, a benzoisoquinolina mostra-se uma substância com uma potente ação citotóxica e antiproliferativa contra bactérias e fungos (FABRI *et al.*, 2012a; GERMANÒ *et al.*, 1999).

A ativação de endonucleases é vinculada ao processo apoptótico e desencadeia uma extensa clivagem (quebra) do DNA (ANAZETTI *et al.*, 2003), podendo ser observada por citometria de fluxo, utilizando o corante iodeto de propídio. A análise da fragmentação do DNA mostrou que o composto FR42 precipitou fragmentação relevante no DNA na maior concentração testada 16,0  $\mu\text{M}$ , assim apresentando perda da integridade de membrana e 30,8% de células com fragmentação no DNA (figura 21), após 48 horas de incubação com o composto FR42, neste sentido pode-se considerar que estas células caracterizaram-se apoptóticas em estágios finais ou em processo de necrose secundária (ORMEROD, 2002).

Existem muitos ensaios para análise da interferência de compostos no ciclo celular, como a citometria de fluxo consiste em um desses métodos. Alguns compostos que desencadeiam apoptose podem ser ciclo-específico ou não, mas todos podem de alguma forma influenciar este processo (ORMEROD, 2002). O composto FR42, quando incubado por 48 horas com as células SF-295, interferiu na fase G2/M do ciclo celular, promovendo um acúmulo celular de 50,91% nesta fase, porém, apenas na menor concentração testada 2  $\mu\text{M}$  (figura 22). Portanto o FR42 tem atividade ciclo-específico na menor concentração testada, apesar de causar intensa fragmentação no DNA, como descrito anteriormente, na maior concentração testada 16,0  $\mu\text{M}$ . O mecanismo envolvido na interferência do ciclo celular não está completamente elucidado, aparentemente pode variar com linhagens celulares diferentes,

uma vez que a parada em uma fase específica do ciclo celular depende da célula testada (HENGARTNER *et al.*, 2000).

A despolarização da membrana mitocondrial foi outra variável estudada. A mitocôndria atua em papel central na regulação da sinalização apoptótica (GREEN, 1998). Alterações no padrão do potencial de membrana mitocondrial são fenômenos iniciais que acontecem após a indução da apoptose, principalmente pela via intrínseca ou via mitocondrial (HAN *et al.*, 2006; ORRENIUS, 2004). Então, na condição onde proteínas pró-apoptóticas sejam liberadas do espaço intramembranar da mitocôndria, através de um poro formado na membrana externa, haverá também a saída de H<sup>+</sup>, provocando despolarização mitocondrial (HENGARTNER *et al.*, 2000). A alteração no potencial transmembrânico mitocôndrial é um forma para constatação indireta da ativação da via intrínseca (ORRENIUS, 2004). Assim, as células SF-295 tratadas com o composto FR42 exibiram relevante diminuição do potencial de membrana mitocondrial (35,5%) quando tratadas com a maior concentração 16,0 µM (figura 23). Estudos realizados com compostos da classe das quinonas demonstram que a via intrínseca está envolvida na morte celular por apoptose (LI *et al.*, 1999).



## 6 CONCLUSÃO

O composto benz[*g*]isoquinolina-5,10-diona (FR42) isolado do *Mitracarpus Baturitensis* Sucre, demonstrou elevado potencial citotóxico contra todas as linhagens de células cancerígenas testadas, com uma ligeira seletividade para células tumorais em comparação com as células normais (CMSP). Nos ensaios direcionados ao estudo do mecanismo de ação do FR42 nas células de glioblastoma humano (SF-295), foi constatado que o composto testado exibe uma atividade citostática na menor concentração testada 2  $\mu$ M (promovendo acúmulo de células na fase G2/M). Na concentração 16  $\mu$ M provocou fragmentação internucleossomal de DNA e despolarização de mitocôndria, estes últimos achados sugerem que o composto FR42 induz apoptose na maior concentração testada.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. **Atividades antiinflamatória e antitumoral do extrato hidroalcoólico de *Casearia sylvestris***: estudo comparativo com os antiinflamatórios piroxicam e meloxicam. 2000. 97f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2000.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L, C, B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução. **Quim. Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
- ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v.188, p.261-274, 2003.
- ASCHE, C. Antitumour quinones. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 5, p. 449-467, 2005.
- BALADRIN, M. F.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. **Human medicinal agents from plants**. Washington: American Chemical Society Books, 1993. (ACS Symposium Series N° 534).
- BALUNAS, M. J.; KINGNORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sci.**, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BISIGNANO, G.; SANOGO, R. MARINO A.; AQUINO, R.; D'ANGELO V. D.; GERMAN, M.P.; DE PASQUALE, R.; PIZZA, C. Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 30, p. 105-108, 2000.
- BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J.O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, p. 1649-1659, 2004.
- BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, v. 3, p. 475-516, 2008.
- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.
- CANCER RESEARCH UNITED KINGDOM (CRUK). **CancerStats**. Disponível em: <<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/>>. Acesso em: 29 out. 2008.
- CARVALHO, P.; TIRNAUER, J. S.; PELLMAN, D. Surfing on microtubule ends. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 229-237, 2003.
- CLARK, A. M.; HUDDLESTON, D.L.; MA, C. Y.; HO, C.H. *In vitro* antimicrobial activity of benzoquinolinediones. **Pharm. Res.**, v. 6, p. 269-271, 1984.

COLDITZ, G. A.; DEJONG, D.; HUNTER, D. J.; TRICHOPOULOS, D.; WILLETT, W. C. Harvard report on cancer prevention. Volume 1. Causes of human cancer. **Cancer Causes Control**, v. 7, p. 1-59, 1996.

DOLL, R.; PETO, R. The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 66, p. 1191-1308, 1981.

DRISCOLL, J. S.; HAZARD, G. F.; WOOD, H. B.; GOLDIN, A. Structure-antitumor activity relationships among quinone derivatives. **Cancer Chemother. Rep.**, v. 4, n. 2, p. 1-362, 1974.

DRUKER, B.J.; TALPAZ, M.; RESTA, D.J.; PENG, B.; BUCHDUNGER, E.; FORD, J.M.; LYDON, N.B.; KANTARJIAN, H.; CAPDEVILLE, R.; OHNO-JONES, S.; SAWYERS, C.L. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the Bcr-Abl Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 1031-1037, 2001.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 16, p. 663-669, 2004.

EISENHAUER, E. A.; VERMORKEN, J. B. The taxoids: comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. **Drugs**, v. 55, p. 5-30, 1998.

ESPAENET (EPO). Disponível em: <<http://www.epo.org/index.html>>. Acesso em: 29 jan. 2013.

ESSERS, J.; VERMEULEN, W.; HOUTSMULLER, A. B. DNA damage repair: anytime, anywhere? **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 18, p. 240-246, 2006.

ESTEVEZ-SOUZA, A.; FIGUEIREDO, D.V.; ESTEVES, A.; CAMARA, C.A.; VARGAS, M.D.; PINTO, A.C.; ECHEVARRIA, A. Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 1399-1402, 2007.

FABRI, R. L.; COIMBRA, E. S.; ALMEIDA, A. C.; SIQUEIRA, E. P.; ALVES, T. M.; ZANI, C.L.; SCIO, E. Essential oil of *Mitracarpus frigidus* as a potent source of bioactive compounds. **Rev. An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 84, p. 1073-1080, 2012a.

FABRI, R. L.; GRAZUL, R. M.; COIMBRA, E. S.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; SILVA, E. D.; SCIO, E. Antitumor, antibiotic and antileishmanial properties of the Pyranonaphthoquinone Psychorubrin from *Mitracarpus frigidus*. **Rev. An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 84, p. 1081-1090, 2012b.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. F. U. *Moringa oleifera*: Bioactive compounds and nutritional potential. **Rev. Nutr.**, v. 21, p. 431-437, 2008.

FISCHER, P. M.; GLOVER, D. M.; LANE, D. P. Targeting the cell cycle. **Drug Disc. Today**, v. 1, p. 417-423, 2004.

- FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144-149, 2008.
- FOYE, M. O. **Cancer Chemotherapeutic Agents**. Washington, DC: American Chemical Society, 1995.
- FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1705, p. 27-41, 2004.
- GERMANÒ, M. P.; SANOGO, R.; COSTA, C.; FULCO, R.; D'ANGELO, V.; TORRE, E. A.; VISCOMI, M. G.; DE PASQUALE, R. Hepatoprotective properties in the rat of *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae). **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 51, n. 6, p. 729-734, 1999.
- GREEN, D.R. Apoptotic pathways: the roads to run. **Cell**, v. 94, p. 695-698, 1998.
- HAN, J.; GOLDSTEIN, L. A.; GASTMAN, B.R.; RABINOWICH, H. Interrelated roles for Mcl-1 and BIM in regulation of TRAIL-mediated mitochondrial apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 10153-10163, 2006.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.
- HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell cycle and cancer. **Science**, v. 266, p. 1821-1828, 1994.
- HARVEY, A. L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 20, n. 5, p. 196-198, 1999.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.
- HAYASHI, Y.; SKWARCZYNSKI, M.; HAMADA, Y.; SOHMA, Y.; KIMURA, T.; KISO, Y. A. A novel approach of water-soluble paclitaxel prodrug with no auxiliary and no byproduct: design and synthesis of isotaxel. **J. Med. Chem.**, v. 46, p. 3782-3784, 2003.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.
- HENGARTNER, M.O. Apoptosis: corralling the corpses. **Cell**, v. 104, p. 325-328, 2001.
- HSU, Y. L.; CHO, C.Y.; KUO, P. L.; HUANG, Y. T.; LIN, C. C. Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) induces apoptosis and cell cycle arrest in A549 cells through p53 accumulation via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated phosphorylation at serine 15 *in vitro* and *in vivo*. **J. Pharm. Exper. Ther.**, v. 318, p. 484-494, 2006.
- HUANG, L.; PARDEE, A. B.  $\beta$ -Lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. **Mol. Medicine**, v. 5, p.711-720, 1999.
- INCA. **Estimativas 2011**: incidência de câncer no Brasil. Disponível em:<<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 2 mar. 2013.
- INCA. **Estimativa 2010**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2010.

IROBI, O. N.; DARAMOLA, S. O. Antifungal activities of crude extracts of *Mitracarpus villosus*(Rubiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 40, p. 137-140 , 1993.

ISMAEL, G. F. V.; ROSA, D. D.; MANO, M. S.; AWADA, A. Novel cytotoxic drugs: Old challenges, new solutions. **Can. Trat. Rev.**, v. 34, p. 81-91, 2008.

JACKSON, J. R.; PATRICK, D. R.; DAR, M. M.; HUANG, P. S. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, p. 107-117, 2007.

JOENSUU, H.; KELLOKUMPU-LEHTINEN, P. L.; BONO, P.; ALANKO, T.; KATAJA, R.; ASOLA, R.; UTRIAINEN, T.; KOKKO, R.; HEMMINKI, A.; TARKKANEN, M.; HUJANEN, T. T.; JYRKKIÖ, S.; FLANDER, M.; HELLE, L.; INGALSUO, S.; JOHANSSON, K.; JÄÄSKELÄINEN, A. S.; PAJUNEN, M.; RAUHALA, M.; KEROLA, J.; K.; SALMINEN, T.; LEINONEN, M.; ELOMAA, I.; ISOLA, J. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, p. 809-820, 2006.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.4, p.161-165, 2005.

KERR, J. F. R. Apoptosis: a basic morphological phenomenon with wide range implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KING, R.W.; DESHAIES, R. J.; PETERS, J. M.; KIRSCHNER, M. W. How proteolysis drives the cell cycle. **Science**, v. 274, p. 1652-1658, 1996.

KOYAMA, J.; MORITA I.; KOBAYASHI, N.; OSAKAI, T.; USUKI, Y.; TANIGUCHI, M. Structure-activity relations of azafluorenone and azaanthraquinone as antimicrobial compounds. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 15, p. 1079-1082, 2005.

KRYSKO, D.V.; BERGHE, T. V.; D'HERDE, K.; VANDENABEEL, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, p. 205-221, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Pathology basis of disease**. Philadelphia: WB Saunders, 2004.

LEE, J. I.; CHOI, D.Y.; CHUNG, H.S.; SEO, H.G.; WOO, H.J.; CHOI, B.T.; CHOI, Y. H.  $\beta$ -Lapachone Induces Growth Inhibition and Apoptosis in Bladder Cancer Cells by Modulation of Bcl-2 Family and Activation of Caspases. **Exp. Oncol.**, v. 28, p. 30-35, 2006.

LI, C. J.; LI, Y. Z.; PINTO, A.V.; PARDEE, A.B. Potent inhibition of tumor survival in vivo by  $\beta$ -lapachone plus taxol: combining drugs imposing different artificial checkpoints. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 13369-13374, 1999.

LI, H.; ZHU, H.; XU, C. J.; YUAN, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**, v. 94, p. 491-501, 1998.

LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C. The microenvironment of the tumourhost interface. **Nature**, v. 411, p. 375-379, 2001.

LIU, K. K. C.; LI, J.; SAKYA, S. Synthetic Approaches to the 2003 New Drugs. **Mini-Rev. Med. Chem.**, v. 4, p. 1105-1125, 2004.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death. The cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. **J. Insect. Physiol.**, v. 11, p. 123-133, 1965.

LOURO, I. D.; LLERENA JR, J.C.; VIEIRA DE MELO, M. S.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FRÓES, N. **Genética molecular do câncer**. 1. ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

LUO, X.; BUDIARDJO, I.; ZOU, H.; SLAUGHTER, C.; WANG, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell**, v. 94, p. 481-490, 1998.

MACFARLANE, M., WILLIAMS, A. C. **Apoptosis and disease: a life or death decision. EMBO Rep.**, v. 5, p. 674-678, 2004.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 143-148, 2002.

MONKS, T. J.; JONES, D. C. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinine methides, and quinone-thioethers. **Curr. Drug Metabol.**, v.3, p. 425-438, 2002.

MUÑOZ-GÁMEZ, J.A.; PÉREZ, A.Q.; EXTREMERA, A. R.; ÁLVAREZ, A. B. M. NUÑEZ, L. S.; CARAZO, A.; León, A.; OLIVER, F.J.; SALMERÓN, J. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase-1 enhances doxorubicin activity against liver cancer cells. **Cancer Lett.**, v. 301, p. 47-56, 2010.

MUSSI, S. V.; SILVA, R. C.; OLIVEIRA, M. C.; LUCCI, C. M.; AZEVEDO, R. B.; FERREIRA, L. A. M. J. New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 48, p. 282-290, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1002-1037, 2003.

NGO, E. O.; SUN, T. P.; CHANG, J.Y.; WANG, C.C.; CHI, K.H.; CHENG, A.L.; NUTTER, L.M. Menadione-induced DNA damage in a human tumor cell line. **Biochem. Pharmacol.**, v. 42, p. 1961-1968, 1991.

NOTO, V.; TAPER, H.S.; JIANG, Y.H.; JANSSENS, J.; BONTE, J.; DE LOECKER, W. Effects of sodium ascorbate (vitamin C) and 2-methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K3) treatment on human tumor cell growth in vitro. I. Synergism of combined vitamin C and K3 action. **Cancer**, v. 63, p. 901-906, 1989.

OKUNADE, A. L.; CLARK, A. M.; HUFFORD, C. D.; OGUNTINMEIN, B. O. Azaanthraquinone: an antimicrobial alkaloid from *Mitracarpus scaber*. **Plant. Med.**, v. 65, n. 5, p. 447-448, 1999.

ORMEROD, M. G. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. **J. Immunol. Methods**, v. 265, p.73–80, 2002.

ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Toxicol. Lett.**, v. 149, p. 19, 2004.

PARDEE, A. B.; LI, Y. Z.; LI, C. J. Cancer Therapy with  $\beta$ -Lapachone. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 2, p. 227-242, 2002.

PICCART-GEBHART, M. J.; PROCTER, M.; LEYLAND-JONES, B.; GOLDBIRSCH, A.; UNTCH, M.; SMITH, I.; GIANNI, L.; BASELGA, J.; BELL, R.; JACKISCH, C.; CAMERON, D.; DOWSETT, M.; BARRIOS, C. H.; STEGER, G.; HUANG, C. S.; ANDERSSON, M.; INBAR, M.; LICHINITSER, M.; LÁNG, I.; NITZ, U.; IWATA, H.; THOMSEN, C.; LOHRISCH, C.; SUTER, T. M.; RÜSCHOFF, J.; SÜTŕ, T.; GRETOREX, V.; WARD, C.; STRAEHLE, C.; MCFADDEN, E.; DOLCI, M. S.; GELBER, R. D. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, p.1659-1672, 2005.

PLANCHON, S. M.; PINK, J. J.; TAGLIARINO, C.; BORNMANN, W.G.; VARNES, M. E.; BOOTHMAN, D. A. Beta-lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. **Exp. Cell Res.**, v. 267, p. 95-106, 2001.

PLANCHON, S. M.; WUERZBERGER, S.; FRYDMAN, B.; WITIAK, D.T.; HUTSON, P.; CHURCH, D.R.; WILDING, G.; BOOTHMAN, D.A.  $\beta$ -Lapachone-mediated Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia (HL-60) and Human Prostate Cancer Cells: a p53-Independent Response. **Cancer Res.**, v. 55, p. 3706-3711, 1995.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA, 2003.

RINGEL, I.; HORWITZ, S. B. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 83, p. 288-291, 1991.

RYU, C.K.; CHOI, K.U.; SHIM, J.Y.; YOU, H.J.; CHOI, I.H.; CHAE, M.J. Synthesis and antifungal activity of 6-arylthio-/6-aryl-amino-4,7-dioxobenzothiazoles. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 11, p. 4003-4008, 2003.

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

SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. **Nature**, v. 277, p. 665-667, 1979.

SCHOTTENFELD, D.; BEEBE-DIMMER, J. L. Advances in cancer epidemiology: understanding causal mechanisms and the evidence for implementing interventions. **Annu. Rev. Public Health**, v. 26, p. 37-60, 2005.

SHAH, H. R.; CONWAY, R. M.; VAN QUILL, K. R.; MADIGAN, M. C.; HOWARD, S. A.; QI, J.; WEINBERG, V.; O'BRIEN, J. M. Beta-lapachone inhibits proliferation and induces apoptosis in retinoblastoma cell lines. **Eye**, v. 22, p. 454-460, 2008.

SHANG, T.; TAN, D. S. Advancing chemistry and biology through diversity-oriented synthesis of natural product-like libraries. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 9, p.248-258, 2005.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. **Quim. Nova**, v. 26, p. 407-416, 2003.

SIMÕES, M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2002.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. C. Natural products in advance clinical trials applied to cancer. **Rev. Fitos**, v. 3, p. 25-41, 2007.

SRIVASTAVA, V.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K.; GUPTA, M.; KHANUJA, S. P. S. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, n. 21, p. 5892-5908, 2005.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 217- 245, 2000.

TANDON, V. K.; CHHOR, R.B.; SINGH, R.V.; RAI, S.; YADAV, D. B. Design, synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antifungal and anticancer agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.14, p. 1079-1083, 2004.

THE PLANT LIST. Disponível em:

<<http://www.theplantlist.org/browse/A/Rubiaceae/Mitracarpus/>>. Acesso em: 3 jan. 2013.

THOMSON, R. H. **Naturally occurring quinines**. London: Chapman and Hall, 1987. v. 3.

VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell Death Differ.**, v. 15, p. 1153-1162, 2008.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J. Immunol. Methods**, v. 184, p. 39-51, 1995.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. **Ann. Hematol.**, v. 84, p. 627–639, 2005.

WALTON, B.T.; HO, C. H.; MA, C. Y.; O'NEIL, E. G.; KAO, D. L. Benzoquinolinediones: activity as insect teratogens. **Science**, v. 222, n. 4622, p. 422-423, 1983.

WEINBERG, R. A. p53 e apoptose: guardião e executor. In: \_\_\_\_\_. **A biologia do câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol. Sci.**, v. 19, p. 124-128, 2004.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S.C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; PASSERINE-GAMBACORTI, C.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Lett.**, v. 175, p. 17-25, 2002.