



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

**DANILO DAMASCENO ROCHA**

**EFEITO ANTITUMORAL DA VITAFISALINA F E SEUS  
DERIVADOS: MECANISMOS E ALVOS DE AÇÃO**

**FORTALEZA-CE**

**2011**

DANILO DAMASCENO ROCHA

**EFEITO ANTITUMORAL DA VITAFISALINA F E SEUS DERIVADOS:  
MECANISMOS E ALVOS DE AÇÃO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo

FORTALEZA – CE

2011

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

---

R572e Rocha, Danilo Damasceno.  
Efeito antitumoral da vitafisalina F e seus derivados: mecanismos e alvos de ação/  
Danilo Damasceno Rocha. – 2011.  
110 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.  
Orientação: Prof. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo.

1. Solanaceae 2. Neoplasias 3. Ciclo Celular 4. Apoptose I. Título.

---

CDD 615.32

**DANILO DAMASCENO ROCHA**

**EFEITO ANTITUMORAL DA VITAFISALINA F E SEUS DERIVADOS:  
MECANISMOS E ALVOS DE AÇÃO**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Leticia Veras Costa-Lotufu (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira  
Universidade de Fortaleza

---

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo  
Universidade Federal do Ceará

## AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Leticia Veras Costa-Lotufo**, “minha amiga chefe” por continuar me incentivando e acreditando no meu trabalho, me dando a liberdade necessária pra conduzir meus projetos da melhor maneira possível; foi com seu jeito especial, que ela conseguiu me provar que é possível ser amigo do chefe e ter amigos no local de trabalho; pelo exemplo de uma excelente pesquisadora; pela força, pela paciência, pela amizade e por toda ajuda e orientação recebida neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Leslie Gunatilaka**, “orientador amigo”, por ter me aceitado em seu laboratório na Universidade do Arizona – EUA, onde aprendi a ser um pesquisador de verdade, com todas as obrigações e responsabilidades; por me mostrar que pra fazer pesquisa de qualidade não é necessário apenas ter bons e caros equipamentos, quando o mais importante é ter “cabeça”, conhecimento, críticas, dúvidas, perguntas e mais perguntas, qualidade e “perfeição” de resultados, compromisso e uma boa convivência e interação direta com outros profissionais, tudo leva a melhora da qualidade de pesquisa; obrigado pela tentativa de me ensinar química; pela oportunidade, apoio, incentivo e amizade.

À **Profa. Dra Claudia do Ó Pessoa**, que tem sido também uma ótima “amiga orientadora”, com suas mais diversas e empolgantes ideias de métodos, trabalhos e colaborações que podem ser realizados, que você possa imaginar; pelo eterno apoio e amizade.

Ao **Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes**, pelo incentivo e por proporcionar as melhores condições de trabalho no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) para a realização desse trabalho.

À **Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa e Dra. Maria Isabel Vitorino Maia**, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, pela imensa paciência e empenho em isolar e caracterizar a vitafisalina F, composto aqui estudado.

À **Silvana, Erivanda, Rogéria, Sheilla e Adelânia**, pela imensa ajuda e agradável presença no dia-a-dia de trabalho.

À todos os **amigos do LOE**, sem exceção alguma, pois não serei injusto de citar alguns nomes, correndo o risco de deixar alguém de fora; por todos tenho um enorme carinho e obrigado por tornarem esse laboratório o melhor de todos pra se trabalhar; **amigos prediletos**, todos temos, porém guardo esses só pra mim; obrigado pelas preces, apoio, incentivo e amizade de vocês.

Aos meus **eternos amigos, Daniel, Herbert, Izael, Olirio e Robson**, que sempre estiveram comigo nas mais prazerosas, alegres, tristes e difíceis situações; 18 anos de amizade não é pra qualquer um; amo vocês caramba!!!

Aos meus **verdadeiros amigos, Rita** “minha querida sogra”, **Camila** “minha querida cunhadinha”, **Tia Eva, Tia Ana, Tio Luciano** e toda a família que me receberam e me tratam como um filho; obrigado por essa segunda família; obrigado pelo apoio e incentivo diário; por todas as orações e carinho que de vocês recebo!!!

Aos meus **verdadeiros melhores amigos, Stephanie Damasceno Rocha, Patricia Damasceno Rocha, João Pedro e Gabriel, Veranisia Damasceno Rocha** “minha amável mãezinha” e **Edilberto Rocha Silveira** “el papito dictador”, que nunca me abandonaram e é a quem sempre recorro quando a coisa realmente fica “braba”; por todas as brigas e carões; pelos ensinamentos, apoio, incentivo, beijos e abraços, conforto, compreensão, paciência, amor e carinho; por tudo; obrigado por serem a **minha família**, amo todos vocês!!!

À minha esposa **Carolinne Reinaldo Pontes**, que antes de tudo é minha **única verdadeira melhor amiga de todos os tempos**, que como sempre, é quem me incentiva e apoia em todas as minhas decisões e quem nunca “let me down”, aconteça o que acontecer; e a minha mais nova **única verdadeira futura melhor amiga, Leticia Reinaldo Rocha**, que todo dia me faz ir dormir, o homem mais feliz do mundo, e me faz acordar, o pai mais feliz do universo; por elas eu dou minha vida; pra elas eu dedico a minha vida; se amar é viver, vivo porque amo vocês; obrigado por fazerem parte da minha vida; AMO, AMO, AMO, AMO, AMO, AMO..!!!

À todos que, diretamente e indiretamente, contribuíram para minha formação pessoal e acadêmica, meu muito obrigado!!!

***Tudo posso “com aqueles”  
que me fortalecem!!!***

**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**

## RESUMO

Os vitaesteróides são lactonas esteroidais, estruturalmente baseadas no esqueleto do ergostano, comumente encontradas em plantas da família Solanaceae. A fim de avaliar o potencial antitumoral dessa classe de compostos, a vitaferina A, isolada da planta *Withania somnifera* e a vitafisalina F, isolada da planta *Acnistus arborescens* foram analisadas em diversos modelos experimentais *in vitro*. Vários análogos da vitafisalina F foram gerados a partir de reações químicas de redução, oxidação e hidroxilação. Todos os vitaesteróides analisados, com exceção de KW-120-112-2, apresentaram potente efeito citotóxico em diversas linhagens tumorais. As linhagens de glioblastoma e neuroblastoma foram as duas linhagens mais sensíveis ao tratamento com os vitaesteróides, além disso, a vitafisalina F e vitaferina não apresentaram efeito citotóxico sobre linhagens normais de fibroblasto de pulmão humano. Essa atividade citotóxica está relacionada a indução de apoptose por esses compostos, assim também como parece estar relacionada a indução de proteínas de choque térmico (HSPs), já que os vitaesteróides mais citotóxicos aumentaram a modulação desses tipos de proteínas. Na análise do ciclo celular de células de glioblastoma (SF-268), tratadas com vitaferina A e vitafisalina F, foi observado um acúmulo das células na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular, o que depois pode ser comprovado que esse acúmulo ocorria em mitose. Tanto a vitafisalina F, como a vitaferina A, interferiram na polimerização das subunidades de tubulina em filamentos de microtúbulos, o que pode ser visto também em imagens obtidas no confocal em que os microtúbulos se encontram todos desorganizados. O efeito sobre o ciclo celular de células normais (WI-38), mostrou outra possibilidade de efeito dos vitaesteróides, em que o efeito observado foi o acúmulo de células na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> do ciclo. Depois, esse efeito também pôde ser observado em células tumorais, o que indica que essas drogas podem atuar em diversos alvos moleculares dependendo do tipo de células e do meio onde elas se encontram. Com isso, pode concluir-se que a vitafisalina e os vitaesteróides em geral podem ser consideradas como uma potente classe de novos compostos antitumorais.

**Palavras-chave:** *Acnistus arborescens*. Vitafisalina. Vitaesteróides. Solanaceae. Ciclo Celular.

## ABSTRACT

Whitasteroids are steroidal lactones, structurally based on the ergostane skeleton, commonly found in plants of the family Solanaceae. In order to evaluate the antitumor potential of this class of compounds, Withaferin A, isolated from the plant *Withania somnifera*, and Whithaphysalin F, isolated from the plant *Acnistus arborescens*, were analyzed in several experimental models *in vitro*. Several analogues of Whithaphysalin F were generated from chemical reactions of reduction, oxidation and hydroxylation. All whitasteroids analyzed, except for KW-120-112-2 showed potent cytotoxic effect in several tumor cell lines. The cell lines of glioblastoma and neuroblastoma were the two most sensitive to the treatment with these compounds. Moreover, both withaferin A and withaphysalin F showed no cytotoxic effect on normal lung human fibroblast. This cytotoxic activity is related to induction of apoptosis by these compounds, and it appears to be related to induction of heat shock proteins (HSPs), as the most cytotoxic withasteroids increased modulation of this type of proteins. In the analysis of the cell cycle of glioblastoma cells (SF-268), treated with withaferin A and withaphysalin F, we observed an accumulation of cells in G2 / M phase of the cell cycle, which later was shown to occur in mitosis . Both withasteroids, showed to interfere with the polymerization of tubulin subunits into microtubule filaments, which can also be seen in the confocal images where all the microtubules are disorganized. The effect on cell cycle of normal cells (WI-38), showed another possible effect of withasteroids, where the effect observed was the accumulation of cells in G0/G1 phase of the cell cycle. Then, this effect also was observed in tumor cells, indicating that these drugs can act on several molecular targets depending on cell type and environment where they meet. Thus, it can be concluded that the withaphysalin F and other withasteroids as well can be considered as a new class of potent antitumor compounds.

**Keywords:** *Acnistus arborescens*. Vitaferina. Vitaferina. Solanaceae. Ciclo Celular.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Tipos de câncer mais incidentes no mundo, no ano de 2010.....	18
<b>Figura 2</b>	Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010/2011, exceto pele não melanoma, no Brasil .....	19
<b>Figura 3</b>	Características essenciais das células tumorais. ....	21
<b>Figura 4</b>	Etapas da carcinogênese.....	24
<b>Figura 5</b>	Comparação dos tipos de organismos como fontes de novos compostos nos anos de 2001 (Total de 1142 novos compostos) e 2010 (Total de 1369 novos compostos).....	25
<b>Figura 6</b>	Principais grupos de vitasteróides .....	27
<b>Figura 7</b>	Aspecto geral da planta <i>Acnistus arborescens</i> mostrando no detalhe as flores e os frutos.....	29
<b>Figura 8</b>	Estruturas dos compostos isolados de <i>Acnistus arborescens</i> .....	31
<b>Figura 9</b>	Esquema representativo da biotransformação da Vitafisalina F. A título de ilustração e comparação são mostrados dois análogos da vitaferina A, obtidas por biotransformação, utilizando o fungo <i>Cunninghamella echinulata</i> .....	51
<b>Figura 10</b>	Estrutura molecular da Vitaferina A ( <b>Vit A</b> ), Vitafisalina F ( <b>Vit F</b> ) e os seus análogos KW-120-112-2 ( <b>112-2</b> ), KW-140-107-2 ( <b>107-2</b> ), KW-140-127-2 ( <b>127-2</b> ), KW-120-136-1 ( <b>136-1</b> ), KW-120-142-1 ( <b>142-1</b> ), KW-120-143-1 ( <b>143-1</b> ), KW-120-144-2 ( <b>144-2</b> ), KW-120-145-2 ( <b>145-2</b> ).....	52
<b>Figura 11</b>	Efeito da Vit A, Vit F e análogos (2 $\mu$ M) a externalização da fosfatidilserina em células de glioblastoma (SF-268) determinado por citometria de fluxo utilizando Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação.....	56
<b>Figura 12</b>	Efeito da vitaferina A, vitafisalina F e análogos (1 e 2 $\mu$ M) sobre a indução de proteínas de choque térmico (HSPs), em células repórter de fibroblasto de camundongo (3T3-Y9-B12), após 24 horas de incubação.....	58
<b>Figura 13</b>	Efeito da vitafisalina F e vitaferina A sobre a distribuição do ciclo celular da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma), determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.....	61

<b>Figura 14</b>	Efeito da vitafisalina F e vitaferina A sobre a polimerização de microtúbulos.....63
<b>Figura 15</b>	Efeito da vitafisalina F e vitaferina A sobre a polimerização de microtúbulos. O gráfico representa os valores de Vmax, obtidos através da divisão da densidade óptica (DO) pelo tempo total das fases I e II da polimerização dos microtúbulos.....63
<b>Figura 16</b>	Efeito da vitafisalina F (2 µM) sobre a morfologia da linhagem SF-295 (glioblastoma) após 24 h de incubação. As imagens representam o núcleo (vermelho), microtúbulos (azul) e actina (verde). DMSO (10 µL) foi utilizado como controle negativo; Taxol (50 Nm) foi utilizado como controle positivo.....66
<b>Figura 17</b>	Efeito da vitafisalina A (2 µM) sobre a morfologia da linhagem PC-3M (próstata) após 24 h de incubação. (a; e; f) controle negativo; (b; c) Taxol; (d; g) Vit A. As imagens representam o núcleo (azul), actina (verde) e microtúbulos (magenta).....67
<b>Figura 18</b>	Efeito da vitaferina A sobre a distribuição do ciclo celular da linhagem WI-38 (fibroblasto), determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.....69
<b>Figura 19</b>	Efeito da vitafisalina F e vitaferina A sobre a distribuição do ciclo celular da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma), determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação na ausência de SFB, e em seguida tratada por mais 24 h com os compostos.....71
<b>Figura 20</b>	Efeito da vitafisalina F e vitaferina A sobre a distribuição do ciclo celular (eixo x: intensidade de fluorescência; eixo y: número de células) da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma) incubadas na presença e ausência de soro fetal bovino (SBF), determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação com os compostos.....73
<b>Figura 21</b>	Efeito da vitafisalina F sobre a distribuição do ciclo celular da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma) sincronizada, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação com os compostos.....75

<b>Figura 22</b>	Efeito da vitafisalina F sobre a distribuição do ciclo celular da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma) sincronizada, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação com os compostos.....	78
<b>Figura 23</b>	Efeito da vitafisalina F sobre a distribuição do ciclo celular (eixo x: intensidade de fluorescência; eixo y: número de células) da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma), pré-incubadas na ausência de soro fetal bovino (SBF), determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação com os compostos.....	79
<b>Figura 24</b>	Estrutura química dos vitaesteróides estudados ressaltando as diferenças estruturais.....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> por meio do teste do MTT.....	36
<b>Tabela 2</b>	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da vitaferina A, vitafisalina F e seus derivados em linhagens de células tumorais.....	56
<b>Tabela 3</b>	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da vitaferina A e vitafisalina F na linhagem WI-38 (fibroblasto de pulmão humano).....	59
<b>Tabela 4</b>	Efeito da vitafisalina F e vitaferina A sobre a distribuição do ciclo celular da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma), determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.....	61
<b>Tabela 5</b>	Efeito da vitafisalina F e vitaferina A sobre a distribuição do ciclo celular da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma), determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação na ausência de SFB, e em seguida tratada por mais 24 h com os compostos.....	70

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

®	Marca Registrada
<b>ANOVA</b>	Analisis of Variance (Análise de Variância)
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<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>GTP</b>	Guanosine-5'-triphosphate
<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>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute Medium
<b>TBS</b>	Tris Buffer Solution (Tampão Tris)
<b>NCI</b>	National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
<b>WHO</b>	World Health Organization

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Câncer.....	17
1.2	Produtos Naturais e a Produção de Drogas Anticancer.....	23
1.3	Vitaesteróides.....	26
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	Geral.....	34
2.2	Específicos.....	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1	Cultivo das célula.....	36
3.2	Biotransformação da vitafisalina F.....	37
3.3	Síntese de análogos da vitafisalina F .....	37
3.4	Análise da atividade citotóxica em células tumorais <i>in vitro</i> – MTT.....	39
3.5	Análise da indução de apoptose – Anexina V.....	40
3.6	Análise da indução de proteínas de choque térmico (HSPs).....	41
3.7	Análise da atividade citotóxica em células normais <i>in vitro</i> – Alamar Blue	42
3.8	Análise do ciclo celular em células de glioblastoma (SF-268).....	43
3.9	Análise da polimerização de microtúbulos.....	44
3.10	Análise morfológica – Microscopia confocal.....	45
3.11	Análise do ciclo celular em células de fibroblasto (WI-38).....	46
3.12	Análise do ciclo celular em células de glioblastoma sincronizadas (SF-268).....	47
3.13	Análise do ciclo celular em células de glioblastoma sincronizadas (SF-268), seguida de incubação com taxol.....	48
3.14	Análise do ciclo celular em células de glioblastoma sincronizadas (SF-268), utilizando Tarceva.....	48
4	RESULTADOS.....	50
4.1	Biotransformação da vitafisalina F.....	51

4.2	Síntese de análogos da vitafisalina F.....	52
4.3	Análise da atividade citotóxica em células tumorais <i>in vitro</i> – MTT.....	53
4.4	Análise da indução de apoptose (Anexina V).....	55
4.5	Análise da indução de proteínas de choque térmico (HSPs).....	57
4.6	Análise da atividade citotóxica em células normais <i>in vitro</i> – Alamar Blue.....	59
4.7	Análise do ciclo celular em células de glioblastoma (SF-268).....	59
4.8	Análise da polimerização da microtúbulos.....	62
4.9	Análise morfológica – Microscopia confocal.....	64
4.10	Análise do ciclo celular em células de fibroblasto (WI-38).....	67
4.11	Análise do ciclo celular em células de glioblastoma sincronizadas (SF-268).....	69
4.12	Análise do ciclo celular em células de glioblastoma sincronizadas (SF-268), seguida de incubação com taxol.....	74
4.13	Análise do ciclo celular em células de glioblastoma sincronizadas (SF-268), utilizando Tarceva.....	76
5	DISCUSSÃO.....	79
6	CONCLUSÃO.....	92
	REFERÊNCIAS.....	94
	ANEXOS.....	104

# ***1 Introdução***

## 1.1 Câncer

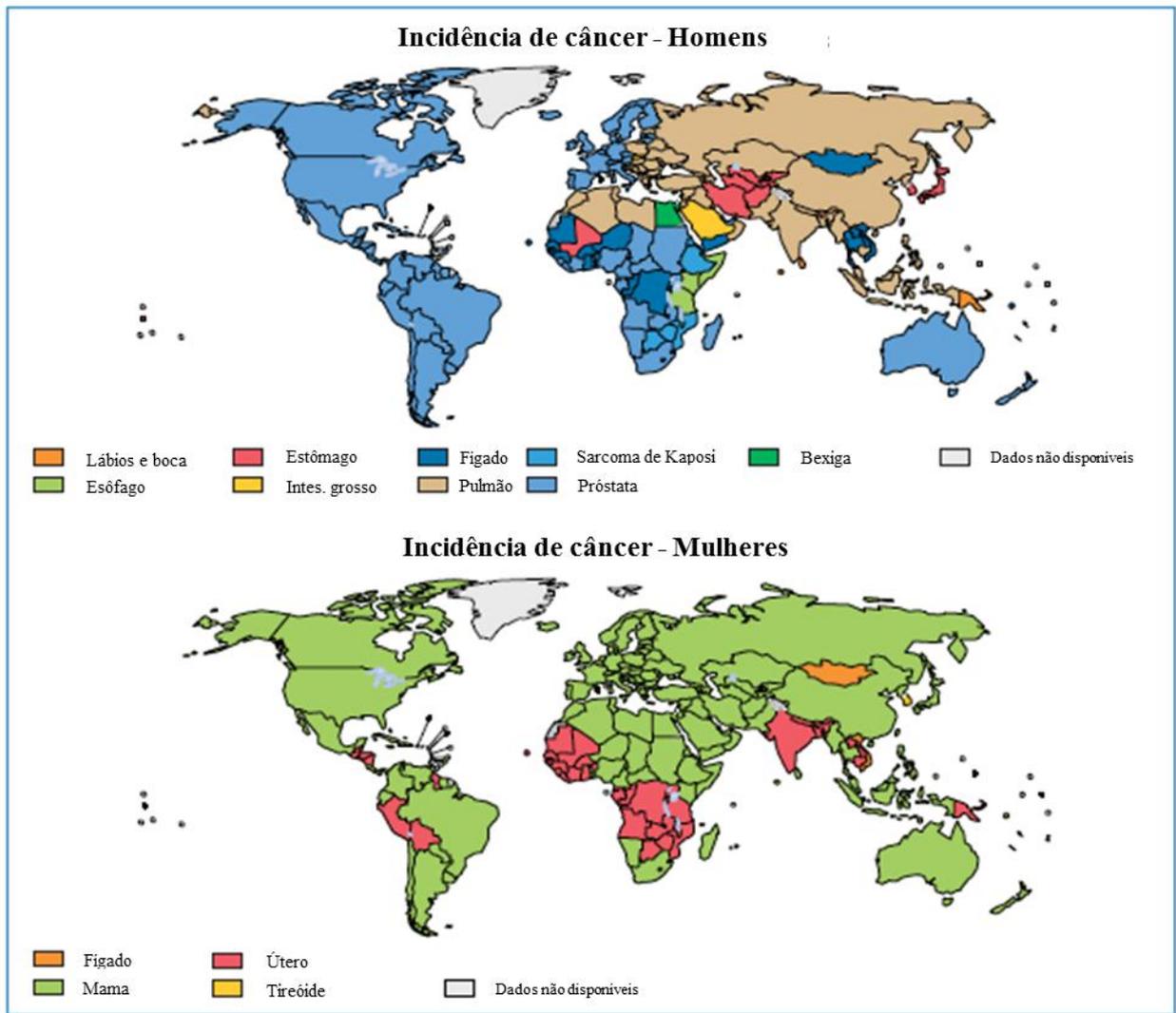
Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças cuja principal característica é o crescimento descontrolado das células. O termo câncer, em latim, deriva da palavra grega *carcinos* que significa caranguejo, isso porque Hipócrates, o criador do termo, comparou a morfologia de tumores, todo circundado por vasos, com as pernas que se ligam ao corpo do caranguejo. O câncer é uma doença que sempre assolou a humanidade, onde os primeiros relatos sobre a doença datam de 3000-1500 a.C. em que vários tumores já foram encontrados em esqueletos de múmias fossilizadas da época do Egito antigo (REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2003)

Atualmente o câncer é a segunda causa de morte por doença no mundo, atrás apenas de mortes causadas por doenças cardiovasculares. Estudos epidemiológicos sobre a incidência de câncer demonstram que o risco de desenvolver a doença varia entre os grupos populacionais, e este risco poderia até ser reduzido em torno de 40 % se houvessem alterações bruscas no estilo de vida e hábitos individuais das pessoas (LEE *et al.*, 2011). No entanto os índices da doença só fazem aumentar mais e mais com o passar dos anos.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), só no ano de 2008 em torno de 7,6 milhões de pessoas morreram de câncer, enquanto mais de 12,6 milhões de novos casos da doença foram diagnosticados. Ainda de acordo com a OMS, mais de 70% dessas mortes ocorrem em países de baixa e média renda e que as chances de alguém ter câncer antes dos 75 anos de idade são de quase 19 %. Além disso, as estimativas indicam que até o ano de 2030 o número de mortes provocadas pelo câncer chegará a 17 milhões em todo o mundo (WHO, 2011).

Na Figura 1 é possível observar os tipos de câncer mais incidentes, em homens e mulheres, nas diferentes regiões do mundo. O câncer de próstata continua o tipo de câncer mais comum entre os homens, sendo diagnosticadas principalmente nas Américas e Europa, seguido pelos casos de câncer no pulmão, mais comuns às regiões da Ásia e Oceania. Já nas mulheres os casos mais incidentes da doença em todo mundo são os de mama e útero. Alguns tipos de câncer são mais comuns em países desenvolvidos, tais como o câncer de próstata, mama e cólon, enquanto o câncer de fígado e estômago são mais comuns em países em desenvolvimento (Figura 1) (WHO, 2011).

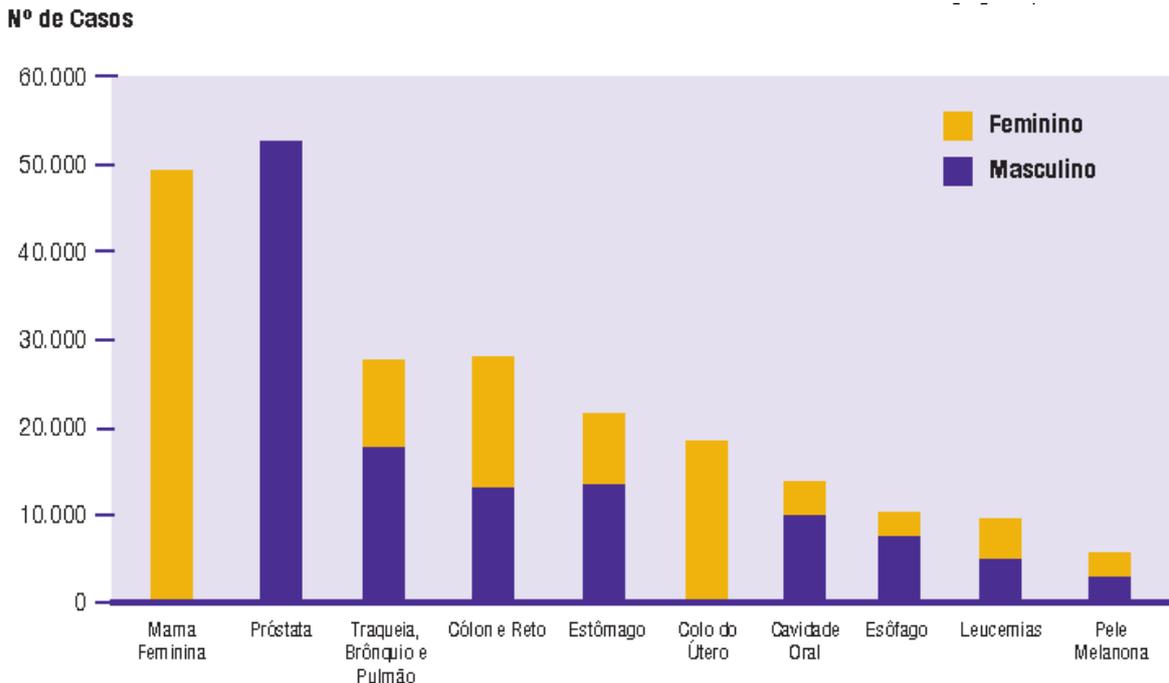
**Figura 1** – Tipos de câncer mais incidentes no mundo, no ano de 2010.



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2011)

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, são válidas também para o ano de 2011, e apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer, sendo 236.240 para o sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil). Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e colo do útero no sexo feminino (Figura 2) (INCA, 2009).

**Figura 2** – Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010/2011, exceto pele não melanoma, no Brasil.



Fonte: Instituto Nacional de Câncer - INCA/MS

Fonte: INCA, 2009.

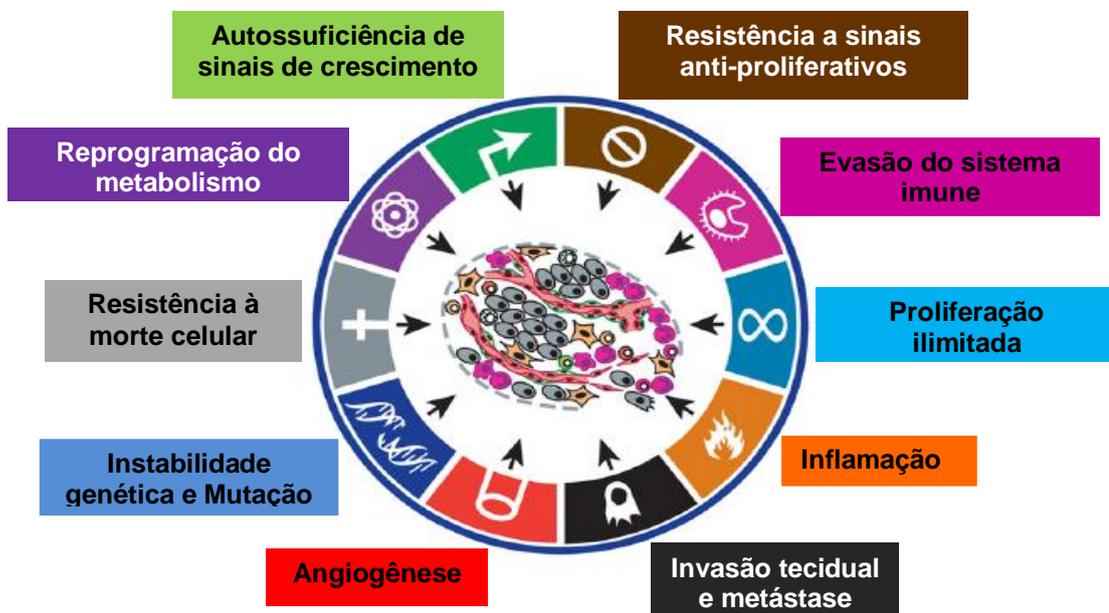
O estudo das bases moleculares no desenvolvimento de tumores (tumorigênese) forneceu suporte para o conceito de que o câncer é uma doença causada pelo acúmulo progressivo de diversas alterações no genoma (BAYLIN; OHM, 2006). Geralmente a maioria dos tumores é formada pela transformação gradativa de células normais em células tumorais através de diversas alterações na fisiologia normal da célula, como a autossuficiência na sinalização de fatores de crescimento e insensibilidade a sinais para inibição do crescimento (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Os tumores são mais do que uma massa de células transformadas em proliferação, eles são definidos por múltiplas características estruturais, moleculares e comportamentais, formando um complexo tecido, cujos diversos tipos celulares, que o integram, participam de interações heterotípicas umas com as outras.

Hanahan e Weinberg (2002) descreveram as principais características que essa diversidade de células tumorais pode adquirir, definido como “Hallmarks of cancer”, dentre

as quais podemos citar: autossuficiência na regulação dos sinais de crescimento celular, resistência a sinais anti-proliferativos, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, indução da angiogênese, invasão tecidual e metástases (Figura 3) (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Mais recentemente outras características foram atribuídas às células tumorais, como a indução de inflamação e a instabilidade genética que essas células apresentam. Além disso, os tumores evoluíram de forma a garantir o seu suporte energético para o crescimento tumoral e também adquiriram estratégias para escapar da detecção imunológica (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

**Figura 3** – Características essenciais das células tumorais



Fonte: Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011.

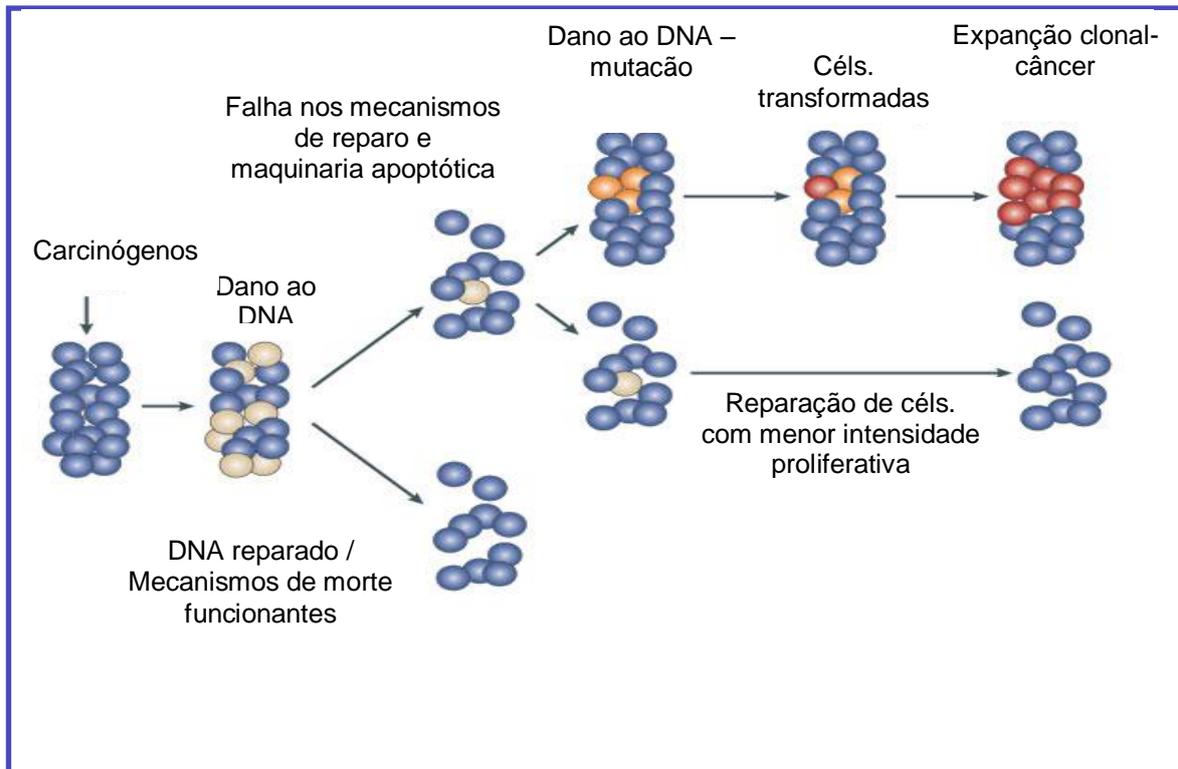
Muitas dessas características podem ser consequências das diversas alterações genéticas que envolvem amplificação funcional, através de mutações e/ou superexpressão de genes chaves, juntamente com mutações que causam perda de função e/ou supressão de silenciadores epigenéticos, importantes na supressão tumoral (MERLO *et al.*, 2006; VINEIS; SCHATZKIN; POTTER, 2010). O acúmulo dessas alterações, que podem ocorrer mais rápido do que os mecanismos celulares de reparo dão origem a um processo denominado de “carcinogênese”, dividida conceitualmente em três etapas: iniciação, promoção e progressão tumoral (Figura 4).

A etapa de iniciação envolve o contato entre o agente carcinógeno e o DNA das células, levando a formação de uma célula transformada. A mutação, por si só, não é capaz de induzir ao câncer, podendo essa permanecer inativa e levar vários anos para se manifestar. No entanto, com o passar do tempo, outras modificações genéticas adicionais podem ocorrer. A segunda etapa da carcinogênese envolve a ação de substâncias promotoras de tumores, que induzem a expressão de genes envolvidos no crescimento celular. Aparentemente, esses promotores só agem em células que já sofreram algum tipo de mutação e exigem um contato por um período longo e contínuo para que essas células se tornem malignas. Na terceira etapa, o de progressão, já começam a aparecer as primeiras manifestações características da doença, caracterizada pelo crescimento descontrolado das células (DONNICI *et al.*, 2005; WEINBERG, 2008).

Os genes envolvidos no controle da proliferação e portanto no processo de carcinogênese podem ser divididos em duas classes principais: os oncogenes e os genes supressores de tumor.

Os oncogenes estão envolvidos na regulação positiva da proliferação celular. Nas células, esses oncogenes são chamados de proto-oncogenes, que ao sofrerem mutação passam a ter sua expressão aumentada. Uma característica dos oncogenes é que eles agem de forma dominante na célula, onde uma mutação em um dos alelos já é suficiente para alterar o funcionamento normal do gene (CORTNER; WOUDE, 1997). Já os genes supressores tumorais, que atuam diminuindo a proliferação celular, necessitam que as duas cópias do gene sofram mutação, levando assim perda de sua função (PERKINS; STERN, 1997).

**Figura 4** - Etapas da carcinogênese.



Fonte: Adaptado de ALLAN e TRAVIS, 2005.

Atualmente, as abordagens terapêuticas mais usadas nos pacientes com câncer, após a cirurgia, são a quimioterapia, a radiação ionizante, a imunoterapia e a terapia gênica (KUMAR *et al.*, 2004). A quimioterapia consiste em um tratamento a base de fármacos, de forma isolada ou combinada (poliquimioterapia), com o objetivo de atingir, apenas, as células transformadas, interferindo no processo de crescimento, disseminação e/ou invasão tecidual (SOUZA *et al.*, 2007). O objetivo primário da quimioterapia seria destruir as células neoplásicas, preservando as células normais (FULDA; DEBATIN, 2004).

No entanto, apesar do considerável arsenal de drogas já existentes para o tratamento do câncer, em muitos casos, o sucesso terapêutico não é alcançado por causa de falhas nos esquemas terapêuticos, altos índices de recidivas, redução da sobrevida dos pacientes e dos efeitos adversos, o que leva a uma contínua busca por novos fármacos (SALGALLER; LODGER, 1998).

## 1.2 Produtos Naturais e a Produção de Drogas Anticâncer

O homem, desde a antiguidade, sempre utilizou a natureza como principal fonte de medicamentos. O uso dos produtos naturais como tratamento das mais diversas doenças, tem sido uma prática comum a milhares de anos entre vários povos e culturas, e ainda hoje, é de extrema importância na atenção à saúde de mais de 80% da população mundial (NAHANISHI *et al.*, 1999).

Apesar dos recentes progressos na área da química medicinal, atualmente os produtos naturais continuam a desempenhar papel fundamental como fonte de novas drogas ou protótipos para o desenvolvimento de fármacos (REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2003).

A diversidade química é certamente um ponto de extrema relevância na pesquisa de produtos naturais como protótipos de medicamentos, já que a natureza produz uma fonte inesgotável de compostos com grande variedade estrutural. Esses compostos podem ser encontrados em milhares de espécies de plantas, animais, organismos marinhos e microrganismos terrestres (BUTLER, 2008). A pressão evolutiva pode ser a responsável por toda essa diversidade estrutural, uma vez que a produção de substâncias bioativas aumenta o sucesso evolutivo das espécies (FIRN; JONES, 2003).

Além da diversidade estrutural, os produtos naturais também apresentam atividades biológicas altamente específicas, em que suas moléculas favorecem a interação com diferentes alvos moleculares. Geralmente os produtos naturais tendem a ter uma composição molecular bem característica, com pouco nitrogênio, halogênio e enxofre em suas estruturas, porém são altamente ricos em moléculas de oxigênio (ORTHOLAND *et al.*, 2004). Os grupos hidroxila desempenham um papel importante na interação droga-receptor, já que na maioria das vezes esse grupamento é o responsável pela formação de pontes de hidrogênio entre os compostos e o seu alvo. Além disso, os compostos de origem natural apresentam estruturas ricas em anéis aromáticos com alto grau de instauração e uma grande quantidade de centros quirais. Os processos biológicos nos quais reagentes estereoespecíficos são mais comuns, frequentemente geram moléculas ativas com grande número de centros quirais e em muitos casos, a presença desses centros, contribui para a seletividade desses compostos com os seus locais de ligação (FEHER; SCHMIDT, 2003).

A importância dos produtos naturais como fonte de novos medicamentos, pode ser comprovada pelo número de novas entidades químicas aprovadas pelo FDA (US Food and Drug Administration), no período de 1981 a 2007, em que 63 % eram produtos naturais, derivados de produtos naturais ou eram moléculas sintéticas com estruturas semelhantes as

dos produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007) e só nos anos de 2001 e 2002, aproximadamente 25 % dos medicamentos mais vendidos no mundo eram produtos naturais ou derivados destes (BUTLER, 2004). Além disso, um estudo que foi realizado, analisando as prescrições dos médicos, mostrou que o uso desses medicamentos são utilizados no tratamento de aproximadamente 87 % de todas as doenças humanas, como agentes antimicrobianos, anticâncer, anticoagulantes, antiparasitários, entre outros (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Na área do câncer, esses compostos tem tido fundamental importância, já que os produtos naturais respondem por aproximadamente 60 % de todas as moléculas desenvolvidas, sejam elas produtos naturais, ou derivados destes (KINGHORN *et al.*, 2011)

De acordo com Dewick (1996), através da bioprospecção de produtos naturais de mais de 114 mil extratos oriundos de aproximadamente 35 mil espécies de vegetais, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI – do inglês National Cancer Institute) tem descoberto uma grande variedade de drogas antitumorais. Além desses, mais de 180 mil derivados de origem microbiana e outras fontes naturais totalizam em torno de 400.000 produtos químicos, sintéticos e naturais testados para a atividade anticâncer (CRAGG; NEWMAN, 1999).

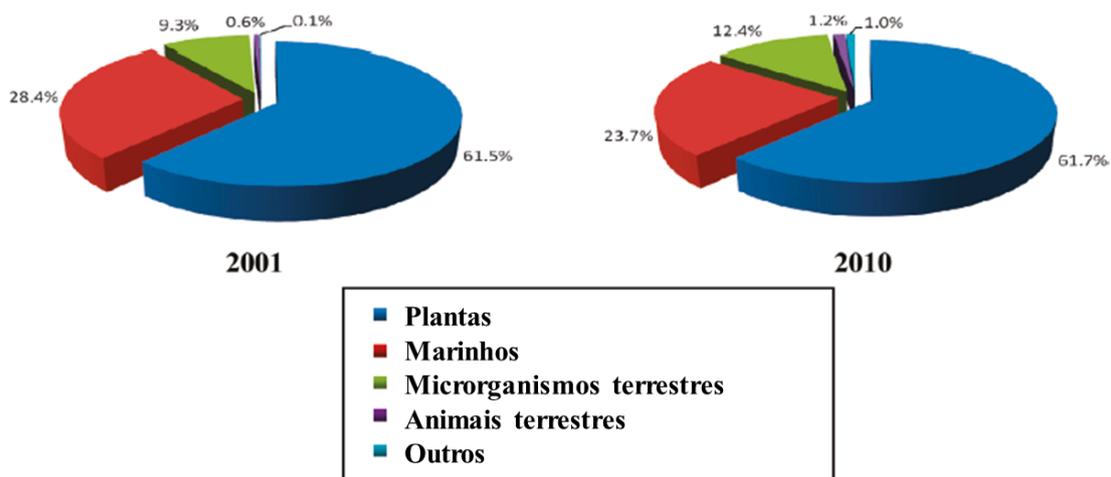
Vários medicamentos vêm sendo atualmente utilizados no tratamento do câncer, incluindo drogas originadas de microrganismos, tais como a doxorubicina, e a dactomicina. Além desses, um grande número de compostos antitumorais, derivados de plantas, também foram aprovados para uso clínico, dos quais podemos citar: paclitaxel, camptotecina, podofilotoxina e os alcaloides da vinca, vincristina e vimblastina.

O sucesso terapêutico dessas substâncias tem estimulado a procura por novos agentes quimioterápicos derivados de produtos naturais, aumentando assim as chances de se encontrar uma droga promissora e ideal no âmbito terapêutico e/ou preventivo do câncer. De fato, nos últimos 50 anos, as pesquisas de novas moléculas levaram a descoberta de mais de 100 novos fármacos que adentraram o arsenal para o tratamento de neoplasias, sendo esses, na sua maioria, derivados ou protótipos de produtos naturais (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009).

Apesar do crescente interesse em compostos provenientes de microrganismos terrestres e marinhos, as plantas continuam sendo a principal fonte de produtos naturais. Em termos de descoberta de novos compostos que podem atingir o mercado no futuro, os produtos naturais obtidos das plantas continuam representando em torno de 60 % de todas

essas moléculas promissoras (Figura 5), o que justifica ainda o enorme esforço em se buscar compostos com relevante atividade biológica entre a grande diversidade de plantas existentes no mundo (KINGHORN *et al.*, 2011).

**Figura 5** - Comparação dos tipos de organismos como fontes de novos compostos nos anos de 2001 (Total de 1142 novos compostos) e 2010 (Total de 1369 novos compostos).



Fonte: Adaptado de KINGHORN *et al.*, 2011.

### 1.3 Vitaesteróides

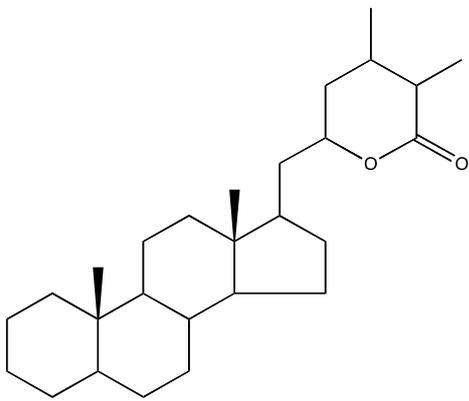
Os vitaesteróides constituem uma classe de lactonas esteroidais, pois possuem uma função lactona em C<sub>26</sub>, com estruturas baseadas no esqueleto de ergostano. Esses compostos apresentam em sua estrutura vários oxigênios, devido a um procedimento enzimático que ocorre nas plantas, capaz de oxidar todos os átomos de carbono do núcleo esteroidal e também das cadeias laterais, o que leva a alterações naturais das cadeias carboxílicas e a formação de novas ligações, resultando em uma grande variedade de compostos com diferenças estruturais bem complexas, características dos vitaesteróides (VERAS *et al.*, 2004a; VERAS *et al.*, 2010).

Devido a grande diversidade estrutural desses compostos, os vitaesteróides foram subdivididos em seis grupos principais: vitanolídeos, vitafisalinas, fisalinas, acnistinas, ixocarpalactonas e perulactonas (Figura 6).

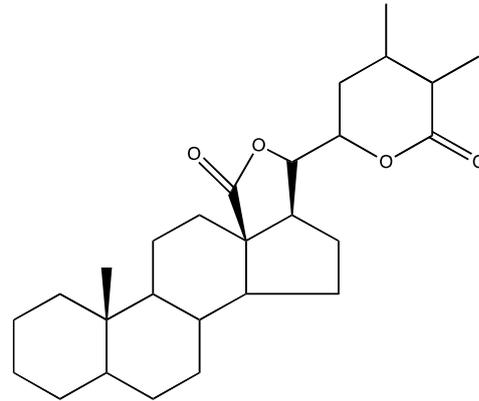
Esses compostos têm sido isolados principalmente de plantas da família Solanaceae, mas também das famílias Taccaceae (CHEN *et al.*, 1987) e Leguminosae (SRISVASTAVA *et al.*, 1992), assim também como de alguns organismos marinhos como a *Minabea* sp. (KSEBATI; SDCHMITZ, 1988). Dentro da família Solanaceae, os vitaesteróides têm sido os principais compostos isolados de uma grande variedade de gêneros pertencentes a essa família, dos quais podemos citar: *Acnistus*, *Brachistus*, *Datura*, *Deprea*, *Discopodium*, *Dunalia*, *Jaborosa*, *Nicandra*, *Physalis*, *Solanum*, *Tubocapsicum*, *Vassobia* e *Withania* (VERAS *et al.*, 2004a; VERAS *et al.*, 2008).

Várias atividades biológicas têm sido atribuídas aos vitaesteróides, como: antiinflamatório (JAYAPRAKASAM; MURALEEDHRAN, 2003; WUBE *et al.*, 2008) imunossupressor (SOARES *et al.*, 2003; 2006), antiparasitário (CARDONA *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2008), anticolinesterásico (RIAZ *et al.*, 2004; CHOUDHARY *et al.*, 2004), antimicrobiano (JANUÁRIO *et al.*, 2002; SHANAZBANU *et al.*, 2006), citotóxica (ROCHA *et al.*, 2006; HSIEH *et al.*, 2007) e antitumoral (DEVI; SHARADA; SOLOMON, 1995; MAGALHÃES *et al.*, 2005).

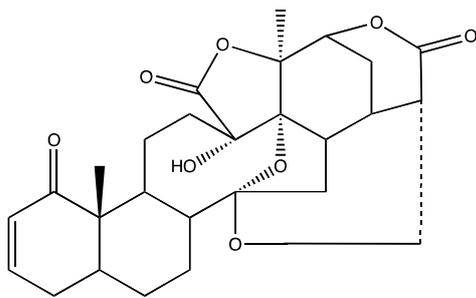
**Figura 6** - Estruturas químicas dos principais grupos de vitaesteróides



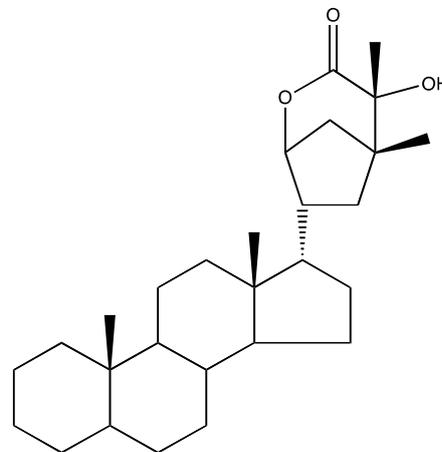
Vitanolídeo



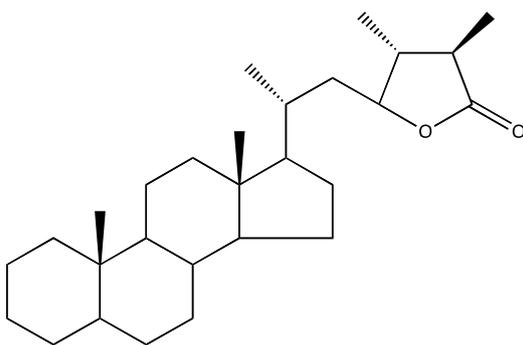
Vitafisalina



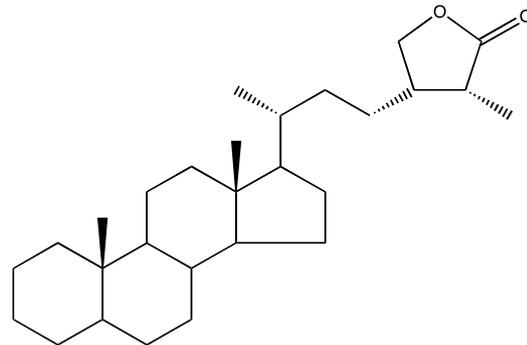
Fisalina



Acnistina



Ixocarpalactona



Perulactona

Fonte: TOMASSINI *et al.*, 2000.

No início da década de 1960, o Nacional Cancer Institute (NCI), dava início a um programa de busca por novos compostos derivados de plantas, com potencial atividade anticâncer, e passou a estudar uma série de extratos etanólicos obtidos dessas plantas. Como era rotina na época, todos os extratos eram testados (*in vitro*) em células de carcinoma de epiderme nasofaríngea de humanos (KB) e (*in vivo*) em sarcoma 180 em camundongos. Um dos extratos testados foi o da planta *Acnistus arborescens*, que mostrou forte atividade em ambos os modelos testados. Em 1969, dois compostos foram isolados desse extrato, a vitaferina A e a vitacnistina, que foram então testados a 20 mg/mL em células de carcinoma de Walker 256 em ratos e apresentaram potente efeito antitumoral, com inibição de 62 % do tamanho do tumor. A partir daí a vitaferina A e outros vitaesteróides despertaram o interesse de vários cientistas em estudar os efeitos antitumorais dessa classe de compostos (KUPCHAN *et al.*, 1969).

*Acnistus arborescens* L. Schlecht [sinonímia: *Acnistus frutescens* Bello, *Atropa arborescens* L., *Cestrum cauliflorum* (Jacq.), *Cestrum macrostemon* Sasse & Moç., e *Dunalia arborescens* (L.) Sleumer)] (Figura 7) é uma planta nativa das Américas do Sul e Central, sendo também encontrada no México e nas Antilhas. No Brasil é encontrada principalmente na flora nordestina, onde também é conhecida pelos nomes de “mariana”, “marianeira” e “esporão de galo de falso” (BARATA *et al.*, 1970).

É uma árvore relativamente rara, ocasionalmente utilizada como planta ornamental e cerca viva, já que, em sua idade adulta, se apresenta tanto na forma de arbusto como de árvore de pequeno porte. As flores são pequenas, de cor branca e tons esverdeados, e possui frutos amarelos semelhantes a pequenos tomates, podendo ser de cor alaranjada. A época de floração e frutificação da *A. arborescens* varia de acordo com o local de origem, mas ocorre geralmente entre os meses de maio e setembro.

A *A. arborescens* é uma planta de importante valor medicinal, sendo popularmente utilizada no tratamento de câncer, hemorróidas e doenças relacionadas ao fígado e baço, assim também como diurético (NITTALA *et al.*, 1981; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2008). A maioria desses efeitos farmacológicos é atribuída à presença dos vitaesteróides.

Minguzzi *et al.* (2002) reportaram o isolamento de três novos vitanolídeos, a partir das folhas de *A. arborescens*, e seus respectivos efeitos citotóxicos em várias linhagens tumorais (BC1 – mama; Lu1 - pulmão; Col2 - cólon; KB - carcinoma nasofaríngeo; LNCaP - próstata), com IC<sub>50</sub> variando de 0,03 a 2,1 µg/mL.

**Figura 7** - Aspecto geral da planta *Acnistus arborescens* mostrando no detalhe, as flores e os frutos



Fonte: Fotografadas por: Prof. Dr Edilberto Rocha Silveira.

Jayaprakasam *et al.* (2003) isolaram 12 vitaesteróides das folhas da planta *Withania somnifera*, e, em seguida, avaliaram o seu potencial citotóxico em um painel de linhagens tumorais (NCI-H460 - pulmão; HCT-116 - cólon; SF-295 - sistema nervoso central; MCF-7 - mama). Neste trabalho, a vitaferina A foi o composto mais ativo, com IC<sub>50</sub> variando entre 0,4 e 0,6 µM. No ano seguinte, Mohan *et al.* (2004) reportaram o potente efeito anti-angiogênico que a vitaferina A apresentava.

Pan, Wang e Hu (2007), isolaram quatro vitametelinas das flores da planta *Datura metel* que também apresentaram potente efeito citotóxico nas linhagens tumorais A549 (pulmão), BGC-823 (gástrico) e K562 (leucemia). Ainda em 2007, quinze novos vitanolídeos foram isolados dos caules, raízes e folhas da planta *Tubocapsicum anomalum*, e mais uma vez todos foram citotóxicos em diversas linhagens tumorais (Hep G2 - fígado; MCF-7 / MDAMB-231 - mama; A-549 - pulmão) (HSIEH *et al.*, 2007). Lee *et al.* (2008) reportaram o efeito citotóxico de mais um vitanolídeo, a vitangulatina A.

Apesar de todos esses achados corroborarem com os efeitos citotóxicos dos vitaesteróides, vários trabalhos tem sido desenvolvidos no sentido de elucidar o exato mecanismo de ação dessas drogas, porém nenhum deles ainda foi conclusivo. Um dos mecanismos propostos para os vitaesteróides seria a sua interação com proteínas do citoesqueleto (FALSEY *et al.*, 2006; BARGAGNA-MOHAN *et al.*, 2007). O citoesqueleto está diretamente envolvido em vários processos celulares como na manutenção da morfologia e locomoção das células, fagocitose, transporte intracelular de organelas e formação do fuso mitótico durante a divisão celular (GRZANKA *et al.*, 2003). Falsey *et al.* (2006) mostraram que a vitaferina A ligava-se a proteína anexina 2, induzindo a condensação dos filamentos de actina. Mais tarde, Bagagna-Mohan *et al.* (2007) mostraram que a vitaferina A também era capaz de se ligar à outra proteína do citoesqueleto, a vimentina. Todas essas alterações no citoesqueleto culminavam com a morte das células por apoptose.

Outro mecanismo proposto para a vitaferina A seria a sua ligação com o proteossoma em células tumorais tanto *in vitro* como *in vivo* (YANG; SHI; DOU, 2007). O proteossoma é um complexo de proteases que fazem parte de um sistema de “controle de qualidade da célula”, cuja função principal é a degradação de proteínas danificadas ou desnecessárias para a célula, além disso, também é responsável pela degradação de várias proteínas como ciclinas, fatores de transcrição, supressores de tumor entre outras (GLICKAN; ADIR, 2004).

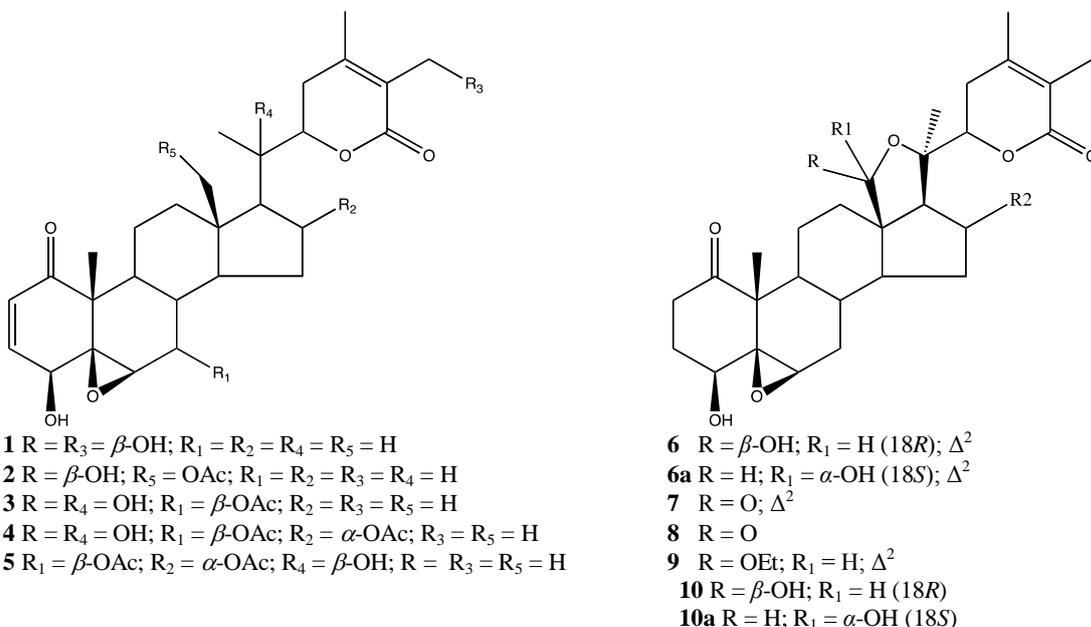
Mais recentemente Yu *et al.* (2010) reportaram que a vitaferina A se ligava a proteínas de choque térmico (HSPs – do inglês Heat Shock Proteins). As HSPs foram primeiramente descobertas em 1962, quando foi observado que, um grupo de proteínas da *Drosophila*

*melanogaster* era rapidamente estimulado após a indução de um estímulo térmico, daí o surgimento do termo proteínas de choque térmico (RITOSSA, 1962). Nos mamíferos, as HSPs são distribuídas, de acordo com o seu peso molecular, em cinco grupos principais: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e a HSP27 que faz parte do grupo de pequenos HSPs, com peso molecular entre 15-30 kDa.

Dados recentes revelaram o papel fundamental que esse grupo de proteínas exerce sobre a formação do tumor, em que o aumento da expressão de certas HSPs, mais especificamente da HSP90, HSP70 e HSP27, tem sido observado em diversos tipos de câncer incluindo mama, ovário, cólon, pulmão e próstata (CIOCCA *et al.*, 2005; GARRIDO *et al.*, 2006), em que elas estariam envolvidas em diversos processos biológicos como a proliferação e sobrevivência celular (NECKERS, 2002).

Veras *et al.* (2004a, 2004b) reportaram o isolamento de outro grupo de vitasteróides das folhas de *A. arborescens*, as vitafisalinas, compostos até então nunca isolados dessa espécie, e que também mostraram-se como potentes drogas citotóxicas em diversas linhagens tumorais (SF-268- sistema nervoso central; K-562 / HL-60 / CEM – leucemia; MCF-7 – mama; HCT-8 - cólon). Todos os compostos já isolados de *A. arborescens* encontram-se apresentados na figura 8.

**Figura 8** - Estruturas dos compostos isolados de *Acnistus arborescens*



Fonte: BARATA *et al.*, 1970; MINGUZZI *et al.*, 2002; VERAS *et al.*, 2004a, 2004b.

Em estudos visando a caracterização da atividade das vitafisalinas, Rocha *et al.* (2006; ROCHA, 2008) reportaram os efeitos citotóxicos das vitafisalinas F, M, N e O em duas linhagens de células leucêmicas, a HL-60 e a K-562, em que essas atuavam inibindo o crescimento celular, através da inibição da síntese de DNA e indução de apoptose pela via mitocondrial. Além do efeito sobre células leucêmicas, também foi avaliado se as vitafisalinas possuíam efeito citotóxico sobre linfócitos isolados de sangue periférico de humanos, no qual não foi observado nenhum efeito citotóxico significativo. A atividade antitumoral da vitafisalina F também foi comprovada em modelos *in vivo* utilizando tumores murinos (ROCHA, 2008). Desta forma, o presente trabalho pretende aprofundar os estudos com a vitafisalina F, isolada de *A. arborescens*, explorando os mecanismos de ação envolvidos na sua atividade em células tumorais.

## ***2 Objetivos***

## 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade citotóxica e antitumoral da vitafisalina F, e de seus derivados semissintéticos, e seus possíveis mecanismos de ação em modelos experimentais *in vitro*.

## 2.2 Objetivos específicos

- Obtenção de análogos da vitafisalina F, através de biotransformação e reações químicas;
- Avaliar e comparar as atividades citotóxicas da vitafisalina F e seus análogos, em células normais e tumorais;
- Avaliar os efeitos da vitafisalina F e seus análogos sobre a modulação das proteínas de choque térmico;
- Avaliar os efeitos da vitafisalina F e vitaferina A sobre a distribuição do ciclo celular de células normais e tumorais;
- Avaliar os efeitos da vitafisalina F e vitaferina A sobre proteínas do citoesqueleto.

## ***3 Materiais e Métodos***

### 3.1 Cultivo das células

Nesse trabalho foram utilizadas várias linhagens tumorais (SF-268, SF-295, NCI-H460, MDA-MB231, MCF-7, PC-3M e CHP-100), todas obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI - Bethesda, MD). As células eram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas.

**Tabela 1** – Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

Linhagem Celular	Tipo Histológico do Câncer/Origem	Concentração de Plaqueamento (cél/mL)
SF-268	Glioblastoma humano	4,0 x 10 <sup>4</sup>
SF-295	Glioblastoma humano	4,0 x 10 <sup>4</sup>
NCI-H460	Câncer de pulmão humano	1,5 x 10 <sup>4</sup>
MDA-MB 231	Carcinoma de mama humano	2,0 x 10 <sup>4</sup>
MCF-7	Carcinoma de mama humano	2,0 x 10 <sup>4</sup>
PC-3M	Carcinoma de próstata metastático humano	2,0 x 10 <sup>4</sup>
CHP-100	Neuroblastoma humano	1,5 x 10 <sup>4</sup>

Além das linhagens tumorais, foi utilizada a linhagem WI-38, um fibroblasto derivado de tecido de pulmão (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961), também foi cedida pelo NCI. Para todos os estudos com a linhagem WI-38, as células foram mantidas em meio e suplementos específicos em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### 3.2 Biotransformação da vitafisalina F

#### *Procedimento experimental*

A fermentação em pequena escala do fungo *Cunninghamella echinulata* (ATCC 10028B) foi realizada em frasco erlenmayer (125 mL), contendo meio de farelo de soja-glicose (25 mL), em um sistema operacional de agitador rotativo a 220 r.p.m. na temperatura de 28° C, por 24 horas.

A fermentação em grande escala foi realizada sob as mesmas condições, sendo que em frascos erlenmayer (3 x 250 mL) contendo 50 mL do meio de farelo de soja-glicose, em que foi inoculado com 15% da cultura do dia anterior. Após 24 h de incubação 5 mg de vitafisalina F (em 0,5 mL de DMF) foi adicionada a cada frasco de cultura. Após 72 h, os meios de fermentação foram combinados, os cepas foram lavadas com H<sub>2</sub>O (100 mL) e filtradas, em seguida foi realizado o processo de extração utilizando AcOEt (3 x 200 mL). Todas as camadas orgânicas foram combinadas e novamente lavadas com H<sub>2</sub>O (2 x 200 mL), que depois foi retirado com adição de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, resultando em 42 mg de extrato AcOEt.

A separação dos compostos foi realizada através de cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3,0 g), seguido por cromatografia de camada delgada em sílica gel e analisados em espectrômetro de massa de baixa resolução para identificação dos compostos.

### 3.3 Síntese de análogos da vitafisalina F

Com o intuito de gerarmos análogos da vitafisalina F algumas reações químicas de acetilação, redução e oxidação foram realizadas.

#### *Procedimento experimental*

##### *Acetilação da Vitafisalina F*

Para uma solução de **vitafisalina F** (5,0 mg) em piridina (0,5 mL) foi adicionado Ac<sub>2</sub>O (0,3 mL) sob agitação a 25°C. Após 16 h, 15 mL de EtOH foi adicionado à mistura da reação e logo após foi evaporado, sob pressão reduzida, dando origem ao diacetato de vitafisalina F **KW-140-107-2** (5,3 mg) como um pó branco amorfo.

*Redução de withaphysalin F, na presença de Et<sub>3</sub>N.*

Para uma solução de **vitafisalina F** (5,0 mg) em EtOH (0,5 mL) foram adicionados Et<sub>3</sub>N (20 µL) e Pd 10% em C (1,0 mg) e agitada sob atmosfera de H<sub>2</sub> por 1h. A mistura da reação foi filtrada, o filtrado foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por TLC (sílica gel), utilizando MeOH 10% em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluente, gerando **KW-120-112-2** (4,5 mg), como um pó branco.

*Oxidação de Vitafisalina F*

Para uma solução de **vitafisalina F** (20 mg) em CHCl<sub>3</sub>/EtOAc (7:5, 2,0 mL) foi adicionado óxido de manganês (100 mg) sob agitação a 25°C. Após 18 h, a reação foi filtrada, e o filtrado foi evaporado sob pressão reduzida dando origem a 4-dehidrovitafisalina F **KW-120-144-2** (19,5 mg), como um pó branco.

*Redução NaBH<sub>4</sub> de 4-dehidrovitafisalina F*

Para uma solução **KW-120-144-2** (5,0 mg) em MeOH (0,35 mL) e THF (0,1 mL) foi adicionado CeCl<sub>3</sub>.7H<sub>2</sub>O (60 mg) e NaBH<sub>4</sub> (pequena quantidade) sob agitação a 25°C por 2 minutos. Pequenos cubos de gelo foram então adicionados à mistura da reação, MeOH e THF foram evaporados sob pressão reduzida e a solução aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 5 mL). A camada AcOEt foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, evaporado sob pressão reduzida e o resíduo separado por TLC utilizando MeOH 10% em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluente dando origem a epi-vitafisalina F **KW-120-143-1** (2,5 mg) como um sólido branco.

*Acetilação da epi-withaphysalin F*

Para uma solução de **KW-120143-1** (0,75 mg) em piridina (0,1 mL) foi adicionado Ac<sub>2</sub>O (0,1 mL) sob agitação a 25°C. Após 4 h, foi adicionado EtOH (10mL) à mistura de reação, evaporado sob pressão reduzida e o resíduo separado por TLC (sílica gel), utilizando MeOH 4% em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluente para dar **KW-120-142-1** (0,5 mg) como um sólido branco.

#### *Acetilação de 4-dehidrovitafisalina F*

Para uma solução de **KW-120-143-1** (5,0 mg) em piridina (0,1 mL) foi adicionado Ac<sub>2</sub>O (0,2 mL) sob agitação a 25°C por 16 h. A mistura da reação foi evaporada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por TLC (sílica gel), utilizando MeOH 4% em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluente gerando 17-O-acetil-4-dehidrovitafisalina F **KW-120-144-2** (5,0 mg) como um sólido branco.

#### *Redução NaBH<sub>4</sub> de 17-O-acetil-4-dehidrovitafisalina F*

Para uma solução **KW-120-144-2** (2,0 mg) em MeOH (0,35 mL) e THF (0,1 mL), foram adicionados CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O (25 mg) e NaBH<sub>4</sub> (pequena quantidade) sob agitação a 0°C, por 2 minutos. Pequenos cubos de gelo foram então adicionados à mistura da reação, MeOH e THF foram evaporados sob pressão reduzida e a solução aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 5 mL). A camada AcOEt foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, evaporado sob pressão reduzida e o resíduo foi separado TLC utilizando MeOH 8% em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluente para dar 17-O-acetil-epi-vitafisalina F **KW-120-145-2** (1,2 mg), como um branco sólido.

#### *Reação de vitafisalina F com carbonildiimidazol*

Para uma solução de **vitafisalina F** (20 mg) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,5 mL) foram adicionados carbonildiimidazol (10,0 mg) e imidazol (0,2 mg) sob agitação a 0 °C. Em seguida o banho de gelo foi removido e a mistura de reação agitada a 25° C. Após 2 h, a mistura de reação foi separada em TLC utilizando Et<sub>2</sub>O como eluente. As frações seguintes foram eluídas com Et<sub>2</sub>O e em seguida separadas em TLC (sílica gel), utilizando MeOH 10% em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluente, gerando **KW-140-127-2** (10,5 mg) como um pó branco amorfo.

### **3.4 Análise da atividade citotóxica em células tumorais *in vitro* – MTT**

A citotoxicidade da vitaferina A, vitafisalina F e seus análogos foram avaliados através do método do MTT (MOSMANN, 1983) utilizando as seguintes linhagens: SF-268, CHP-100, MDA-MB231, MCF-7, PC-3M e NCI-H460.

O método consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT), de cor amarela, para o formazan,

composto de cor azul. Essa conversão do MTT em formazan só ocorre em células viáveis e metabolicamente ativas, através da ação da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias, o que permite desta forma a quantificação indireta da porcentagem de células vivas.

### ***Procedimento experimental***

As células foram plaqueadas numa densidade variando de  $1,5 \times 10^4$  a  $4,0 \times 10^4$  células/mL em placas de 96 poços. A vitaferina A, vitafisalina F e seus análogos foram incubadas juntamente com as células durante 72 horas, em concentrações variando de 0,05 a 25  $\mu$ M, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade.

Após 69 h de incubação o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 200  $\mu$ L da solução de MTT (2 mg/ml, em meio RPMI1640) em cada poço e novamente incubada por mais 3 horas até completar o período de 72 h de incubação. Após esse período o sobrenadante foi novamente descartado, permanecendo somente o precipitado azul de formazan e este foi então ressuscitado em 200  $\mu$ L de DMSO e agitado por cerca de 10 minutos até sua completa dissolução. Para a quantificação do sal de MTT reduzido, as absorbâncias foram medidas no espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 570nm.

### ***Análise dos dados***

Os compostos foram testados em diluição seriada, em duplicata ou triplicata, e suas CI<sub>50</sub> (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 Análise da indução de apoptose – Anexina V**

Um dos principais processos que ocorrem na apoptose é a translocação da fosfatidilserina da membrana interna da bicamada lipídica para a superfície celular. A externalização da fosfatidilserina ainda continua como um processo não totalmente conhecido, mas sabe-se que esse processo funciona como um sinal da célula para que os macrófagos e outros fagócitos eliminem as células em processo de morte (VERMES *et al.*, 1995).

### ***Procedimento experimental***

Células da linhagem SF-268 foram plaqueadas numa densidade de  $4,0 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 poços. A vitaferina A, vitafisalina F e seus análogos foram incubadas juntamente com as células durante 24 horas, na concentração de variando  $2 \mu\text{M}$ , em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95 % de umidade. A doxorubicina ( $2 \mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo.

Após o período de incubação o sobrenadante foi retirado e mantido em eppendorf, enquanto as células que permaneceram aderidas na placa foram lavadas com PBS e tripsinizadas até que todas as células estivessem em suspensão. As células do sobrenadante foram centrifugadas a 2000 r.p.m. e após remoção do meio foram lavadas com PBS e recolocadas junto com as demais células na placa. Uma alíquota de  $100 \mu\text{L}$  da suspensão de células foi transferida para outra placa de 96 poços e  $50 \mu\text{L}$  de uma solução de anexina V (Annexin V - Guava Kit) foi adicionada e incubada por mais 30 minutos. Em seguida as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte / Guava Technologies) utilizando o software Guava Nexin.

### ***Análise dos Dados***

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados com o controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### **3.6 Análise da indução de proteínas de choque térmico (HSPs)**

Para esse estudo foi utilizado uma linhagem de fibroblasto de camundongo (3T3-Y9-B12) transfectada com um gene reporter (EGFP – Enhanced Green Fluorescent Protein) ligada à região promotora do gene Hsp70B, o que leva a produção de uma proteína fluorescente cada vez que esse gene for ativado.

### ***Procedimento experimental***

Células 3T3-Y9-B12 foram plaqueadas numa densidade de  $2 \times 10^4$  células / poço em uma placa de 96 poços opaca. A vitaferina A, vitafisalina F e seus análogos foram incubadas juntamente com as células durante 24 horas, nas concentrações de 1 e 2  $\mu\text{M}$ , em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95 % de umidade. Como controle negativo as células foram tratadas com um volume igual ao do veículo (DMSO) e a monocilina (2  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo.

Após o período de incubação as células foram lavadas duas vezes com PBS e a fluorescência quantificada através de um leitor de placas AD Analyst (LJL Biosystems) utilizando os filtros de comprimento de onda 485 nm (excitação) e 530 nm (emissão).

### ***Análise dos dados***

Os dados são expressos em porcentagem e correspondem a taxa de indução de HSPs em relação ao controle negativo. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### **3.7 Análise da atividade citotóxica em células normais *in vitro* – Alamar Blue**

A citotoxicidade da vitaferina A e vitafisalina F foi avaliada em células humanas normais através do método de Alamar Blue utilizando a linhagem WI-38.

O alamar blue, recentemente identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.*, 2000), 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 vivas, e assim pode ser quantificado e utilizado para avaliar a viabilidade celular.

### ***Procedimento experimental***

As células foram plaqueadas numa densidade variando de  $2,0 \times 10^4$  a  $4,0 \times 10^4$  células/mL em placas de 96 poços. A vitaferina A e vitafisalina F foram incubadas juntamente

com as células durante 72 horas, em concentrações variando de 0,05 a 25  $\mu\text{M}$ , em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95 % de umidade.

Após 69 h de incubação 20  $\mu\text{L}$  da solução alamar blue (AbD Serotec) foi adicionado em cada poço e novamente incubada por mais 3 horas até completar o período total de 72 h de incubação. Logo após as fluorescências foram analisadas no leitor de placas Analyst AD (LJL Biosystems) utilizando os filtros de comprimentos de onda 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão).

### ***Análise dos dados***

Os compostos foram testados em diluição seriada, em duplicata ou triplicata, e suas  $\text{CI}_{50}$  (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).

### **3.8 Análise do ciclo celular em células de glioblastoma (SF-268)**

Este ensaio foi realizado com o intuito de determinar o conteúdo de DNA nuclear das células. O teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo (IP) em se ligar ao DNA 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 da quantidade de DNA. Quando a célula apresenta cromatina condensada e/ou DNA fragmentado (sub- $G_1$ ), a quantidade de IP incorporada é menor, e, portanto emitirá baixa fluorescência.

### ***Procedimento Experimental***

Células da linhagem SF-268 foram plaqueadas numa densidade de  $4,0 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 poços. A vitaferina A e vitafisalina F foram incubadas juntamente com as células durante 24 horas, nas concentrações de 1, 2 e 4  $\mu\text{M}$ , em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95 % de umidade. O paclitaxel (50 nM) foi utilizada como controle positivo.

Após o período de incubação o sobrenadante foi retirado e mantido em eppendorf, enquanto as células que permaneceram aderidas na placa foram lavadas com PBS e

tripsinizadas até que todas as células estivessem em suspensão. As células do sobrenadante foram centrifugadas a 2000 r.p.m. e após remoção do meio foram lavadas com PBS e recolocadas junto com as demais células na placa. Uma alíquota de 100  $\mu$ L da suspensão de células foi transferida para outro tubo eppendorf e 100  $\mu$ L de etanol gelado (70 %) foi adicionado lentamente e incubados no mínimo por mais 2 h em geladeira. A partir daí uma alíquota de 100  $\mu$ L da suspensão de células foi transferida para outra placa de 96 poços e 50  $\mu$ L de uma solução de PI (40  $\mu$ g/mL) e 10  $\mu$ L de RNase (10 mg/mL) foram adicionados e incubados por mais 30 minutos. Em seguida as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte / Guava Technologies) utilizando o software Guava Cell cycle.

### ***Análise de dados***

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados com o controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### **3.9 Análise da polimerização de microtúbulos**

Esse experimento foi baseado no método criado por Shelanski *et al.* (1973), que mostra a relação entre a absorvância óptica e a concentração de polímeros de microtúbulos formados *in vitro*.

### ***Procedimento Experimental***

A tubulina extraída de cérebro bovino (TL238 - Cytoskeleton®) foi ressuspendida no tampão de incubação. Todos os reagentes foram mantidos em gelo até o início do ensaio. Enquanto isso uma placa de 96 poços foi colocada em estufa a 37°C, temperatura em que deve ocorrer o experimento. Em cada poço foi preparado uma solução de tubulina a 5mg/mL em Tampão Geral de Tubulina (BST01 – Cytoskeleton®), adicionado de 5% de glicerol (BST05) e 1mM de GTP (BST06). Logo em seguida a Vit F, Vit A, paclitaxel e nocodazol foram adicionados. Os poços foram analisados para ser lida numa absorvância de 340 nm, numa leitura entre 0,75 – 1,1 dentro de 40 minutos, na temperatura de 37°C. O volume dentro do

poço deve ser de 180  $\mu$ L e assume um comprimento de onda de 0,8 cm. Cada reação contém 180  $\mu$ L de 5 mg /mL de TL238 (tubulina) em 80 mM PIPES pH 6,9, 0,5 mM de EGTA, 2 mM  $MgCl_2$ , 5% de glicerole 1 mM de GTP.

### ***Análise de dados***

Os dados são mostrados em curvas, relacionados a formação de polímeros de microtúbulos; densidade óptica (eixo y), em relação ao tempo (eixo x). As três fases da polimerização, para o controle negativo, são demonstradas: I (nucleação); II (crescimento); III (equilíbrio). Os valores de  $V_{max}$  foram obtidos através da divisão da densidade óptica (DO) pelo tempo total das fases I e II da polimerização dos microtúbulos.

### **3.10 Análise morfológica – Microscopia confocal**

O microscópio confocal de fluorescência por varredura a laser utiliza fluorescência para a aquisição das imagens. A fluorescência é um tipo de luminescência (emissão de luz) em que um corpo absorve luz e após um curto intervalo de tempo reemite essa luz. Esse é o princípio da microscopia de fluorescência, na qual compostos químicos chamados fluoróforos ou fluorocromos são usados para produzir a fluorescência do material em estudo.

A grande vantagem da microscopia confocal é a possibilidade de se obter luz exclusivamente a partir de um único plano, onde um orifício, chamado de “pinhole”, consegue separar apenas a luz proveniente do ponto focado, impedindo assim que a luz refletida/emitida por outros pontos fora de foco chegue até o detector.

O microscópio de varredura a laser varre a amostra sequencialmente ponto a ponto e linha a linha em diferentes planos focais da amostra, gerando imagens com alto contraste e alta resolução nos eixos X, Y e Z. Todas essas informações são então processadas por um computador e assim imagens tridimensionais podem ser geradas e manipuladas digitalmente.

### ***Procedimento experimental***

Células da linhagem SF-295 (glioblastoma) e PC-3M (carcinoma de próstata metastático humano) foram plaqueadas sobre lamínulas, em placas de 6 poços na densidade de  $7,0 \times 10^5$  células/mL. A vitafisalina F e vitaferina A foram incubadas junto com as células

durante 24 h, na concentração de 2  $\mu\text{M}$ , em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95 % de umidade. O paclitaxel (50 nM) foi utilizada como controle positivo.

Após o período de incubação o meio foi retirado e as células lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído (4,7 % em PBS) e em seguida permeabilizadas com Triton X-100 (0,25 % em PBS). Uma solução de RNase foi utilizada, a fim de eliminar possíveis interferências de fragmentos de RNA e ribossomos. Em seguida as células foram incubadas com anticorpos específicos para actina (phalloidin / Alexa Fluor® 488) e tubulina (Anti  $\alpha$ -Tubulin / Alexa Fluor® 643) conjugados a corantes da Alexa-Fluor (Molecular Probes). O núcleo foi corado com DAPI ou IP (Iodeto de Propídeo) e após extensas lavagens com PBS foram montadas sobre lamina utilizando VectaShield e analisadas e analisadas em microscópio confocal LSM 710 (Carl Zeiss).

### **3.11 Análise do ciclo celular em células de fibroblasto (WI-38)**

Este ensaio foi realizado com o intuito de determinar o conteúdo de DNA nuclear das células. O teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo (IP) em se ligar ao DNA 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 da quantidade de DNA. Quando a célula apresenta cromatina condensada e/ou DNA fragmentado (sub- $G_1$ ), a quantidade de IP incorporada é menor, e, portanto emitirá baixa fluorescência.

#### ***Procedimento Experimental***

Células da linhagem WI-38 foram plaqueadas numa densidade de  $5,0 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 poços. A vitaferina A foi incubada juntamente com as células durante 24 horas, nas concentrações de 2 e 4  $\mu\text{M}$ , em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95 % de umidade. O paclitaxel (50 nM) foi utilizada como controle positivo.

Após o período de incubação o sobrenadante foi retirado e mantido em eppendorf, enquanto as células que permaneceram aderidas na placa foram lavadas com PBS e tripsinizadas até que todas as células estivessem em suspensão. As células do sobrenadante foram centrifugadas a 2000 r.p.m. e após remoção do meio foram lavadas com PBS e recolocadas junto com as demais células na placa. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foi transferida para outro tubo eppendorf e 100  $\mu\text{L}$  de etanol gelado (70 %) foi

adicionado lentamente e incubados no mínimo por mais 2 h em geladeira. A partir daí uma alíquota de 100 µL da suspensão de células foi transferida para outra placa de 96 poços e 50 µL de uma solução de PI (40 µg/mL) e 10 µL de RNase (10 mg/mL) foram adicionados e incubados por mais 30 minutos. Em seguida as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte / Guava Technologies) utilizando o software Guava Cell cycle.

### ***Procedimento Experimental de Sincronização Celular***

Células da linhagem WI-38 foram previamente plaqueadas, na ausência de soro fetal bovino, numa densidade de  $5,0 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 poços. Após 24 h de incubação o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura (RPMI), contendo soro fetal bovino foi adicionado. A vitaferina A foi incubada juntamente com as células durante 24 horas, nas concentrações de 2 e 4 µM, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade.

\* O restante do processo é semelhante ao procedimento descrito acima.

### ***Análise de dados***

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados com o controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **3.12 Análise do ciclo celular em células de glioblastoma sincronizadas (SF-268)**

### ***Procedimento Experimental de Sincronização Celular***

Células da linhagem SF-268 foram previamente plaqueadas, na ausência de soro fetal bovino, numa densidade de  $4,0 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 poços. Após 24 h de incubação o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura (RPMI), contendo soro fetal bovino foi adicionado. A vitafisalina F e a vitaferina A foram incubadas juntamente com as células durante 24 horas, nas concentrações de 1, 2 e 4

$\mu\text{M}$ , em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95 % de umidade. O paclitaxel (50 nM) foi utilizada como controle positivo.

\* O restante do processo é semelhante ao procedimento descrito no item **3.8**

### **3.13 Análise do ciclo celular em células de glioblastoma sincronizadas (SF-268), seguida de incubação com paclitaxel.**

#### ***Procedimento Experimental de Sincronização Celular***

Células da linhagem SF-268 foram previamente plaqueadas, na ausência de soro fetal bovino, numa densidade de  $4,0 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 poços. Após 24 h de incubação o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura (RPMI), contendo soro fetal bovino foi adicionado. A vitafisalina F e a vitaferina A foram incubadas juntamente com as células durante 24 horas, nas concentrações de 1, 2 e 4  $\mu\text{M}$ , em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95 % de umidade.

Após o período de incubação, paclitaxel (50 nM) foi adicionado a todos os poços (somente um dos dois grupos de controle negativo foi tratado com paclitaxel) e a placa foi novamente incubados por mais 24 h.

\* O restante do processo é semelhante ao procedimento descrito no item **3.8**

### **3.14 Análise do ciclo celular em células de glioblastoma sincronizadas (SF-268), utilizando Tarceva**

#### ***Procedimento Experimental de Sincronização Celular***

Células da linhagem SF-268 foram previamente plaqueadas, na ausência de soro fetal bovino, numa densidade de  $4,0 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 poços. Após 24 h de incubação o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura (RPMI), contendo soro fetal bovino foi adicionado. A vitafisalina F foi incubada juntamente com as células durante 24 horas, nas concentrações de 2 e 4  $\mu\text{M}$ , em estufa a  $37^\circ\text{C}$

com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade. Paclitaxel (50 nM) e Tarceva (10 µM) foram utilizados como controle positivo.

Também foram utilizadas as combinações entre paclitaxel (50 nM) e Tarceva (10 µM); Vit F (2 µM) e Tarceva (10 µM); Vit F (2 µM) e Tarceva (10 µM)

\* O restante do processo é semelhante ao procedimento descrito no item **3.8**

### ***Análise de dados***

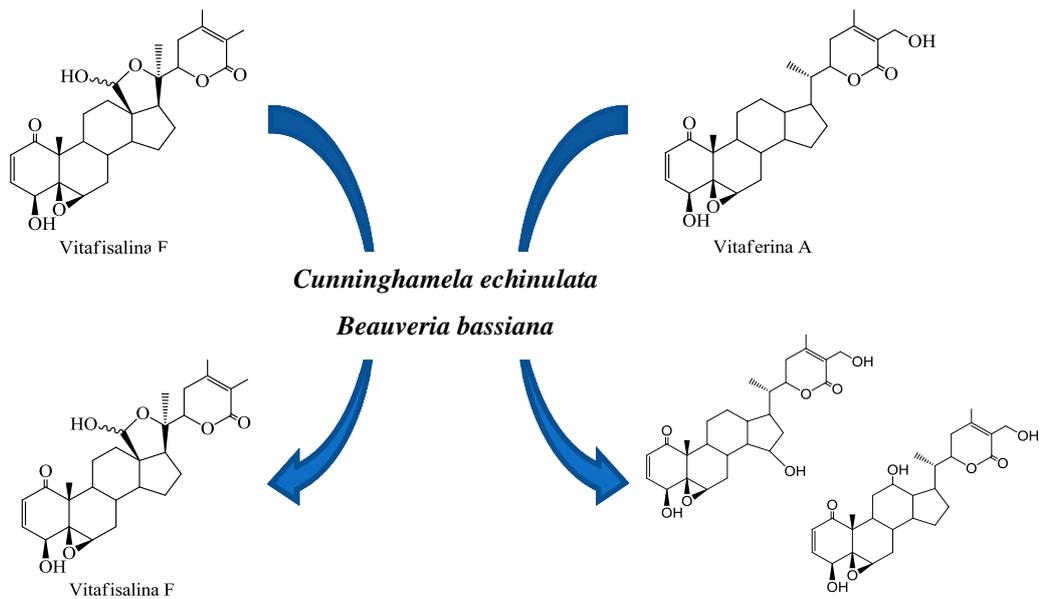
Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados com o controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## ***4 Resultados***

#### 4.1 Biotransformação da vitafisalina F

O ensaio de biotransformação da vitafisalina F foi realizado com duas linhagens de fungo, a *Cunninghamella echinulata* e a *Beauveria bassiana* seguindo o protocolo previamente utilizado com a vitaferina A (FUSKA *et al.*, 1982; 1984). Interessantemente nenhum dos fungos utilizados foi capaz de modificar a molécula da vitafisalina F, ao contrário do que anteriormente observado para a vitaferina A (Figura 9).

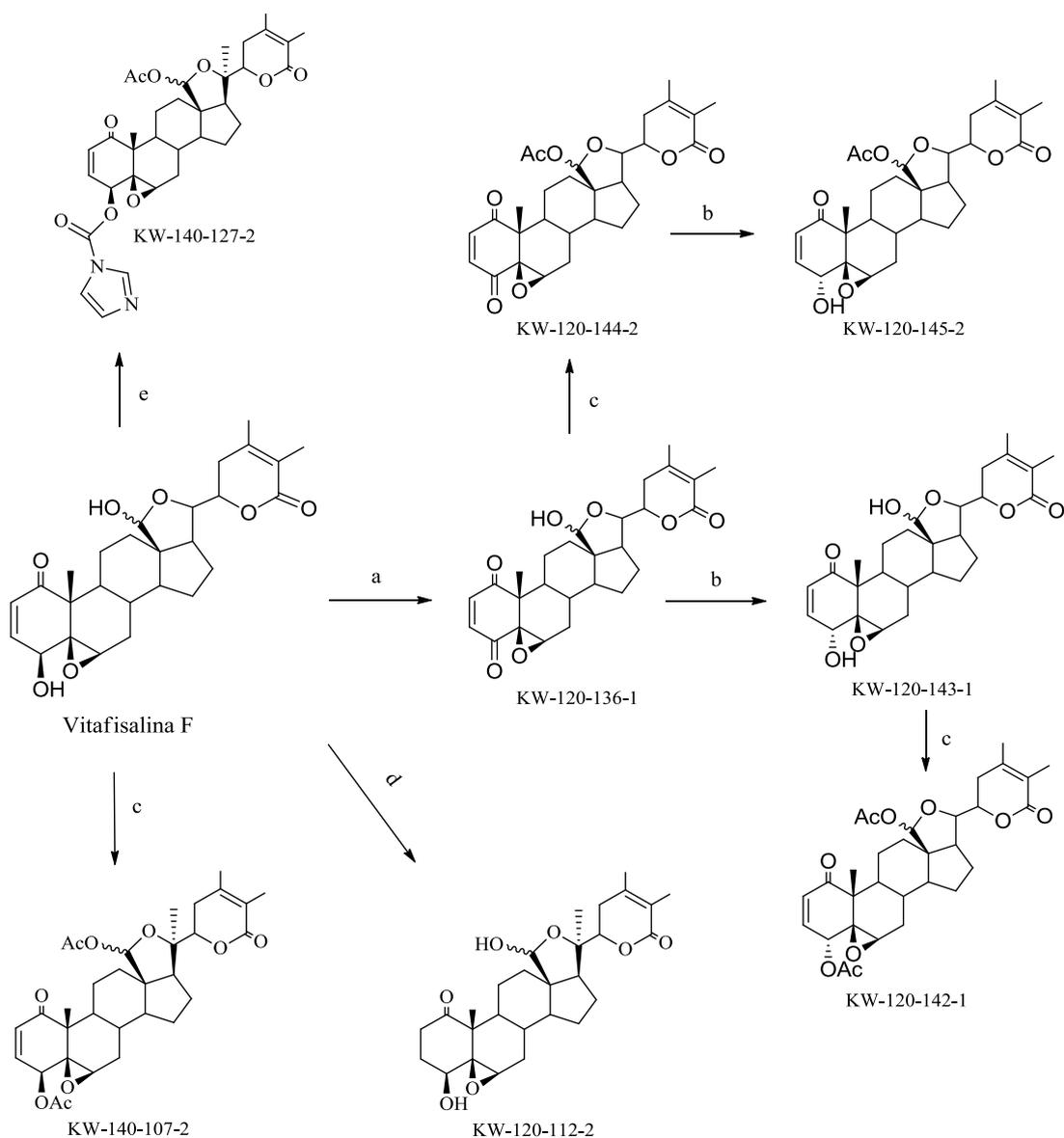
**Figura 9** – Esquema representativo da biotransformação da Vitafisalina F. A título de ilustração e comparação são mostrados dois análogos da vitaferina A, obtidas por biotransformação, utilizando o fungo *Cunninghamella echinulata*.



## 4.2 Síntese de análogos da vitafisalina F

Pelo fato da biotransformação da vitafisalina F não ter gerado nenhum composto, algumas reações químicas foram realizadas a fim de que novos compostos, análogos da vitafisalina F, pudessem ser gerados e testados nos ensaios seguintes (Figura 10).

**Figura 10** - Estrutura molecular da Vitafisalina F (**Vit F**) e os seus análogos KW-120-112-2 (**112-2**), KW-140-107-2 (**107-2**), KW-140-127-2 (**127-2**), KW-120-136-1 (**136-1**), KW-120-142-1 (**142-1**), KW-120-143-1 (**143-1**), KW-120-144-2 (**144-2**), KW-120-145-2 (**145-2**).



Reagentes e condições de reação: **(a)**  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{EtOAc}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ; **(b)**  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $\text{THF}$ ,  $0^\circ\text{C}$ ; **(c)**  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{pyridine}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ; **(d)**  $\text{EtOH}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ; **(e)**  $(\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2)_2\text{CO}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ .

### 4.3 Análise da atividade citotóxica em células tumorais *in vitro* – MTT

A avaliação da atividade citotóxica das vitafisalinas foi realizada pelo método do MTT em sete linhagens de células tumorais (PC-3M - próstata, NCI-H460 - pulmão, SF-268 - glioblastoma, CHP-100 - neuroblastoma, MDA-MB 231 - mama, MCF-7 - mama, MiaPaCa - pâncreas) após 72 horas de incubação. A tabela 2 apresenta os valores de  $CI_{50}$  obtidos no ensaio.

Todas as vitafisalinas e a vitaferina A, com exceção da **112-2**, apresentaram efeitos citotóxicos nas sete linhagens testadas, com  $CI_{50}$  variando de 0,1 a 4,9  $\mu\text{M}$ . A vitafisalina **127-2** foi a que apresentou maior efeito citotóxico, com valores de  $CI_{50}$  menores que 0,3  $\mu\text{M}$  em quatro das cinco linhagens testadas, sendo mais ativa nas linhagens SF-268 e CHP-100, com  $CI_{50}$  de 0,1  $\mu\text{M}$  em ambas as linhagens, e menos ativa na linhagem MCF-7 ( $CI_{50} = 1,1 \mu\text{M}$ .) Já o composto menos ativo, entre todos os testados, foi a vitafisalina **112-2**, com valores de  $CI_{50}$  variando entre 9,7 e 16,9  $\mu\text{M}$ .

No geral, quando comparadas as  $CI_{50}$  da **Vit F** e **Vit A**, é possível notar que todas as linhagens parecem ser mais sensíveis a vitaferina A, já que em cinco das sete linhagens a  $CI_{50}$  desta última foi pelo menos duas vezes menor que a da vitafisalina F (tabela 2).

As linhagens mais sensíveis a **Vit F** foram as de neuroblastoma (CHP-100), glioblastoma (SF-268) e pâncreas (MiaPaCa), com valores de  $CI_{50}$  de 0,3, 0,4 e 0,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Interessantemente, as linhagens PC-3M e MCF-7 apresentaram valores de  $CI_{50}$  em torno de 4 vezes menor para **Vit F** (0,9 e 2,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente) quando comparadas com a **Vit A** (0,2 e 0,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente), o que mostra que a vitafisalina F parece ser mais seletiva a certos tipos de tumores, ao passo que a vitaferina A seria citotóxica a todos ou à grande maioria deles.

Para este ensaio, foram consideradas ativas as substâncias que apresentaram valores de  $CI_{50} < 8 \mu\text{M}$  (BOIK, 2001).

**Tabela 2** - Atividade citotóxica *in vitro* da vitaferina A (Vit A), vitafisalina F (Vit F) e seus análogos em linhagens de células tumorais.

	Vitaesteróides									
	CI <sub>50</sub> µM									
	VitF	VitA	112-2	107-2	127-2	136-1	142-1	143-1	144-2	145-2
<b>PC-3M</b>	0.9 <sup>b</sup>	0.2 <sup>a</sup>	17.8 <sup>a,b</sup>	0.5 <sup>a,b</sup>	0.3 <sup>a</sup>	2.4 <sup>a,b</sup>	1.5 <sup>a,b</sup>	1.3 <sup>a,b</sup>	1.6 <sup>a,b</sup>	1.1 <sup>b</sup>
<b>NCI-H460</b>	0.7 <sup>b</sup>	0.4 <sup>a</sup>	-	0.3 <sup>a</sup>	-	4.9 <sup>a,b</sup>	1.2 <sup>a,b</sup>	0.6	4.3 <sup>a,b</sup>	1.0 <sup>a,b</sup>
<b>SF-268</b>	0.4 <sup>b</sup>	0.2 <sup>a</sup>	9.7 <sup>a,b</sup>	0.2 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a,b</sup>	2.0 <sup>a,b</sup>	0.7 <sup>a,b</sup>	0.6 <sup>a,b</sup>	2.1 <sup>a,b</sup>	0.8 <sup>a,b</sup>
<b>CHP-100</b>	0.3	0.3	15.5 <sup>a,b</sup>	0.3	0.1 <sup>a,b</sup>	1.4 <sup>a,b</sup>	0.6 <sup>a,b</sup>	0.5 <sup>a,b</sup>	0.9 <sup>a,b</sup>	0.5 <sup>a,b</sup>
<b>MDA-MB231</b>	0.9 <sup>b</sup>	0.3 <sup>a</sup>	12.7 <sup>a,b</sup>	0.4 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	2.4 <sup>a,b</sup>	0.9 <sup>b</sup>	1.1 <sup>b</sup>	1.5 <sup>a,b</sup>	1.1 <sup>b</sup>
<b>MCF-7</b>	2.0 <sup>b</sup>	0.5 <sup>a</sup>	16.9 <sup>a,b</sup>	0.8 <sup>a,b</sup>	1.1 <sup>a,b</sup>	4.2 <sup>a,b</sup>	2.2 <sup>b</sup>	1.6 <sup>a,b</sup>	3.8 <sup>a,b</sup>	2.2 <sup>b</sup>
<b>MiaPaCa</b>	0.5	0.6	-	0.3 <sup>a,b</sup>	-	2.9 <sup>a,b</sup>	1.3 <sup>a,b</sup>	0.7	3.0 <sup>a,b</sup>	0.7

Os dados são apresentados em valores de CI<sub>50</sub> µM, média de dois experimentos independentes realizado em triplicata pelo método do MTT após 72 horas de incubação para as linhagens MDA-MB231 (mama), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão), SF-268 (glioblastoma), CHP-100 (neuroblastoma), MiaPaCa (pancreas) e PC-3M (próstata). <sup>a</sup> p < 0,05 comparado com a Vit F por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. <sup>b</sup> p < 0,05 comparado com o Vit A por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

#### 4.4 Análise da indução de apoptose (Anexina V)

A externalização da fosfatidilserina (PS) é considerada um marco importante nas fases iniciais da ativação do processo apoptótico (MARTIN *et al.*, 1995), dessa forma, células da linhagem SF-268 foram tratadas com 2  $\mu$ M de Vit A, Vit F e análogos, por 24 horas e em seguida incubadas com anexina V (proteína com alta afinidade por PS) para avaliar a porcentagem de células com PS externalizada sobre a superfície da membrana celular.

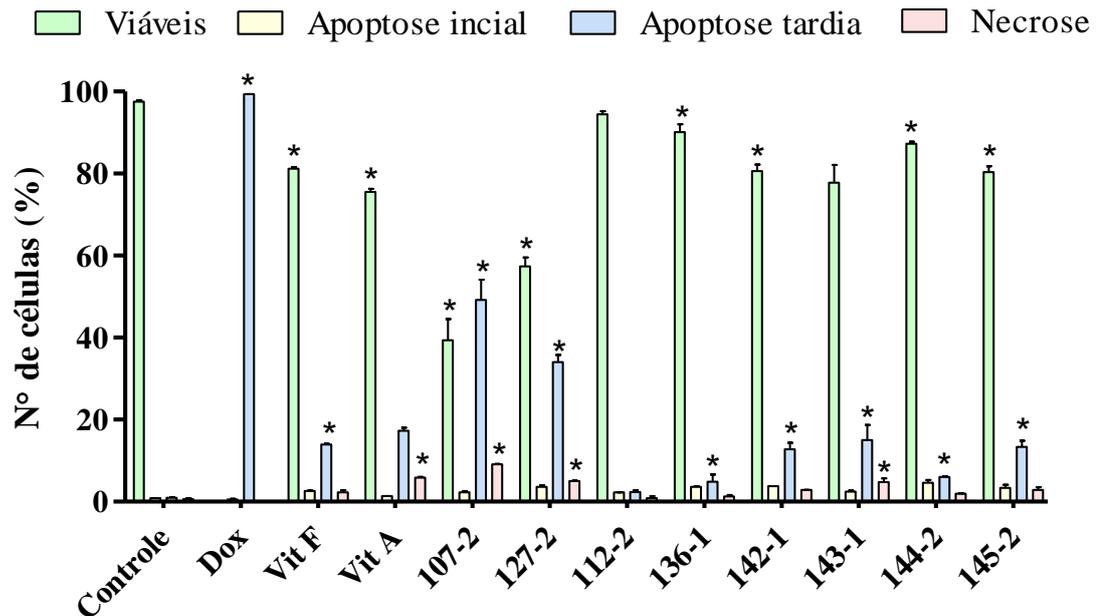
A análise da figura 11 mostra que a média da porcentagem de células viáveis no controle negativo foi de 97,55 %. Já quando tratadas com a doxorrubicina, 99,35 % das células encontravam-se em apoptose.

Assim como no ensaio do MTT, os vitaesteóides **107-2** e **127-2** foram os mais ativos, induzindo a morte de 60,6 e 42,6 % das células SF-268, respectivamente. Já o composto **112-2** induziu somente 4,6 % de apoptose nas células de glioblastoma, corroborando com os dados do MTT em que ele foi o vitaesteróide menos ativo.

Nas células tratadas com a **Vit F**, 81,2 % das células eram viáveis, 16,6 % se encontravam em apoptose e 2,2 % em necrose. Já no tratamento com a **Vit A**, a porcentagem de células viáveis foi de 75,5 %, enquanto que 18,6 e 5,8 % estavam em apoptose e necrose, respectivamente.

Os demais análogos da vitafisalina F testados, induziram entre 4,9 e 15 % de apoptose nas células tratadas.

**Figura 11** - Efeito da Vitaferina A (Vit A), Vitafisalina F (Vit F) e análogos (2  $\mu$ M) na externalização da fosfatidilserina em células de glioblastoma (SF-268) determinado por citometria de fluxo utilizando Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação.



DMSO (4  $\mu$ L) foi utilizado como controle negativo; Doxorubicina (0,5  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo (Dox). 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.

#### 4.5 Análise da indução de proteínas de choque térmico (HSPs)

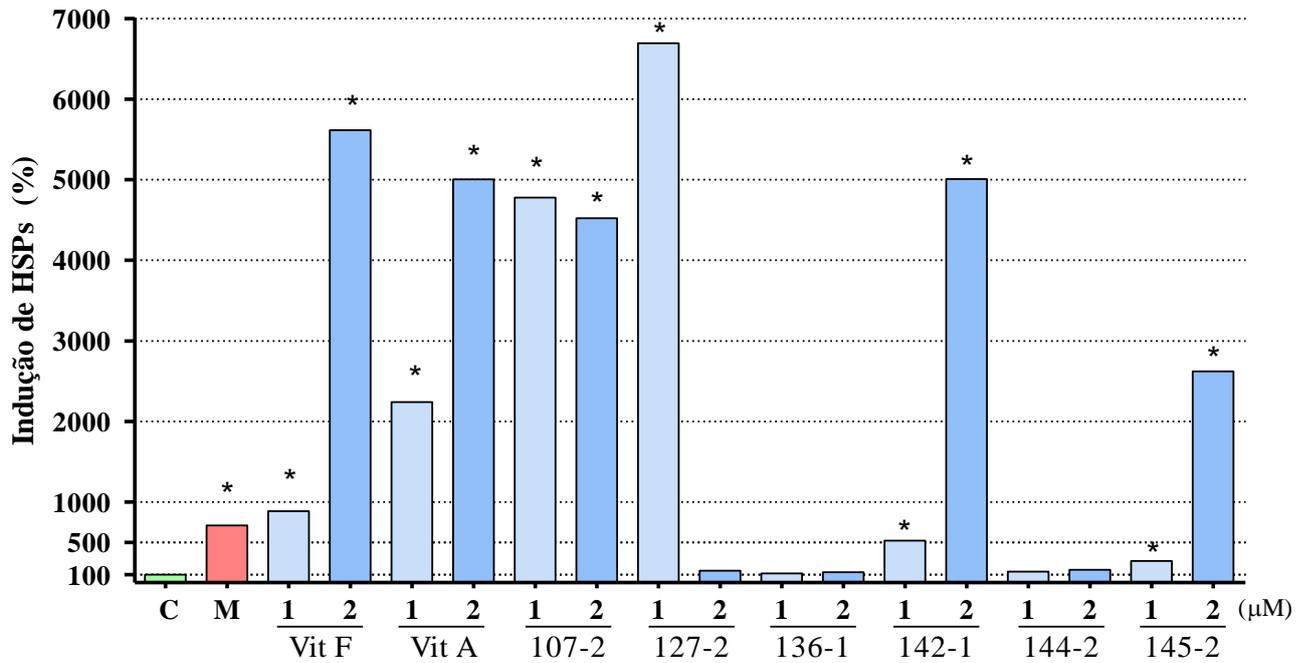
A fim de avaliar se o efeito citotóxico desses vitaesteróides envolvia também a indução de proteínas de choque térmico (HSPs), células repórter de fibroblasto de camundongo (3T3-Y9-B12) foram tratadas com 1 e 2  $\mu\text{M}$  de **Vit A**, **Vit F** e análogos, por 24 horas.

Novamente, o vitaesteróide **127-2** foi o mais ativo quanto à indução de HSPs, com um efeito 67 vezes maior do que o controle negativo, na concentração de 1  $\mu\text{M}$  (Figura 12). Já na concentração de 2  $\mu\text{M}$  do **127-2**, nenhum efeito foi observado. Esta ausência de efeito na maior concentração testada pode estar relacionada a alta citotoxicidade do composto, o que levaria a morte celular, diminuindo a densidade celular e conseqüentemente a indução de proteínas de choque térmico. O análogo **107-2** também mostrou alta atividade, quanto a indução de HSPs, com taxas de indução 48 (1  $\mu\text{M}$ ) e 45 (2  $\mu\text{M}$ ) vezes maiores em relação ao controle.

Comparando-se os resultados da **Vit F** e **Vit A**, é possível notar que ambos vitaesteróides agiram sobre a indução de HSPs, nas duas concentrações testadas. A **Vit F**, na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , exerceu efeito muito semelhante ao do controle positivo (Monocilin), com uma indução aproximadamente 8 vezes maior que o controle negativo, enquanto que a **Vit A** mostrou efeito 22 vezes maior, nessa mesma concentração. Já na concentração de 2  $\mu\text{M}$ , os efeitos da **Vit F** e **Vit A** foram bem maiores, causando uma indução de 56 e 50 vezes mais HSPs, respectivamente, do que em células tratadas apenas com DMSO.

Com isso, o efeito sobre a modulação de proteínas de choque térmico, parece sim estar relacionado ao efeito citotóxico desses compostos, onde os vitaesteróides mais ativos (MTT – Tabela 2) foram também os que mais induziram a expressão de HSPs. Vale ressaltar que, os compostos **136-1** e **144-2**, que foram relativamente menos citotóxicos do que os demais vitaesteróides testados, não causaram nenhum efeito significativo sobre a indução desses tipos de proteína.

**Figura 12** - Efeito da vitaferina A (Vit A), vitafisalina F (Vit F) e análogos (1 e 2  $\mu\text{M}$ ) sobre a indução de proteínas de choque térmico (HSPs), em células repórter de fibroblasto de camundongo (3T3-Y9-B12), após 24 horas de incubação. (C) DMSO (4  $\mu\text{L}$ ) foi utilizado como controle negativo; (M) Monocilin (2  $\mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo.



Os dados correspondem a taxa de indução de HSPs em relação ao controle negativo. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

#### 4.6 Análise da atividade citotóxica em células normais *in vitro* – Alamar Blue

Para avaliar se o efeito desses vitaesteróides seria de algum modo seletivo para células tumorais, a atividade citotóxica da vitaferina A e vitafisalina F foi avaliada em células de fibroblasto de camundongo (WI-38), através do método do alamar blue após 72 horas de incubação. A tabela 3 apresenta os valores de  $CI_{50}$  obtidos no ensaio.

A vitaferina A (**Vit A**) foi a mais citotóxica, entre os dois vitaesteróides testados, com  $CI_{50}$  de 7,0  $\mu\text{M}$ . Já a concentração de vitafisalina F (**Vit F**), necessária para matar 50 % das células normais de fibroblasto, foi mais que o dobro da concentração de **Vit A**, com valor de  $CI_{50}$  de 16,0  $\mu\text{M}$ .

**Tabela 3** - Atividade citotóxica *in vitro* da vitaferina A (Vit A) e vitafisalina F (Vit F) na linhagem WI-38 (fibroblasto de camundongo).

	Vitaesteróides	
	$CI_{50}$ $\mu\text{M}$	
	Vit F	Vit A
WI-38	16,0	7,0

Os dados são apresentados em valores de  $CI_{50}$   $\mu\text{M}$  e o intervalo de confiança de 95% de dois experimentos independentes realizado em triplicata pelo método do Alamar Blue após 72 horas de incubação.

#### 4.7 Análise do ciclo celular em células de glioblastoma (SF-268)

A análise do ciclo celular das células de SF-268, tratadas com Vit F e Vit A, mostraram que ambos vitaesteróides atuam acumulando células na fase  $G_2/M$  do ciclo celular, quando comparadas com o controle negativo (Tabela 4). Na figura 12 é possível notar o efeito da vitafisalina F a partir da menor concentração testada (1  $\mu\text{M}$ ), em que 42,7 % das células se encontram acumuladas na fase  $G_2/M$  do ciclo, enquanto no controle negativo 27,6 % das células se encontram nesta mesma fase. Já na maior concentração testada (2  $\mu\text{M}$ ), o efeito da Vit F assemelha-se ao da Vit A na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , com 53,3 e 52,7 % das células acumuladas na fase  $G_2/M$ , respectivamente. Nas concentrações de 2 e 4  $\mu\text{M}$  da Vit A, assim como na concentração de 4  $\mu\text{M}$  da Vit F, é possível notar uma diminuição nesse acúmulo de células da fase  $G_2/M$ , o que provavelmente deve-se ao fato das células, que se encontravam

acumuladas nessa fase, estarem morrendo por apoptose, o que levaria a uma diminuição no total de células viáveis. Consequentemente a esse acúmulo em G<sub>2</sub>/M, houve uma diminuição de células na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, assim como, também é possível observar um leve aumento de células na fase S, quando tratadas com ambos vitaesteróides.

Em células tratadas com o paclitaxel, que foi utilizado como controle positivo, é possível notar uma diminuição de aproximadamente 40% de células na fase G<sub>1</sub>, em relação ao controle negativo, e consequente aumento das fases G<sub>2</sub>/M (56,4%) e Sub-G<sub>1</sub> (14,1%).

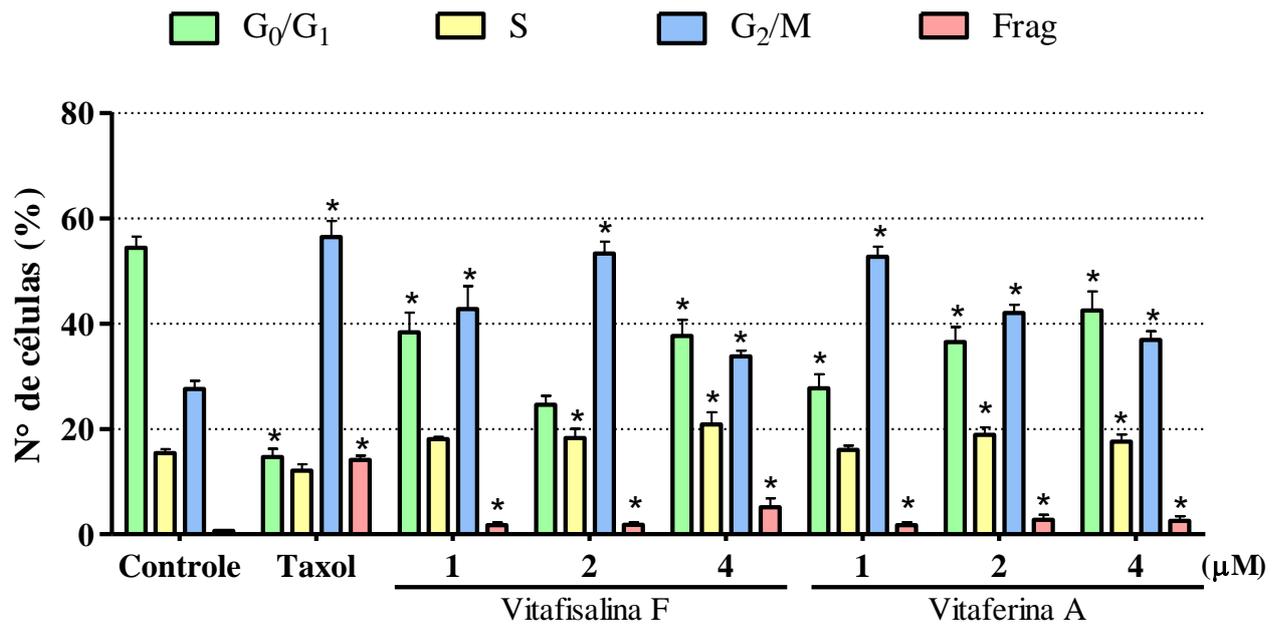
Na figura 13, cada fase do ciclo celular está representada sob a forma de barras, onde é possível se observar o acúmulo em G<sub>2</sub>/M de células tratadas com o paclitaxel e os vitaesteróides Vit F e Vit A.

**Tabela 4** - Efeito da vitafisalina F (Vit F) e vitaferina A (Vit A) sobre a distribuição do ciclo celular da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma), determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação com os compostos.

Substâncias	Concentração	Fase do ciclo celular (%)			
		Média ± E.P.M.			
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	Frag
<b>Controle</b>	-	54.3	15.4	27.6	0.6
		2.1	0.7	1.6	0.1
<b>Paclitaxel</b>	50 nM	14.7*	12.0*	56.4*	14.1*
		1.5	1.3	3.0	0.8
<b>Vit F</b>	1 µM	38.3*	18.1	42.7*	1.8*
		3.7	0.4	4.3	0.5
	2 µM	24.6	18.2*	53.3*	1.8*
		1.7	1.8	2.2	0.5
4 µM	37.6*	20.8*	33.8*	5.1*	
	3.0	2.3	1.1	1.7	
<b>Vit A</b>	1 µM	27.7*	16.0*	52.7*	1.7*
		2.6	0.8	1.9	0.5
	2 µM	36.5*	18.9*	42.0*	2.7*
		2.8	1.4	1.6	0.9
4 µM	42.5*	17.6*	36.9*	2.5*	
	3.6	1.3	1.6	0.9	

DMSO (4 µL) foi utilizado como controle negativo; paclitaxel (50 nM) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentes independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento.

**Figura 13** – Efeito da vitafisalina F e vitaferina A sobre a distribuição do ciclo celular da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma), determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação com os compostos.



DMSO (4  $\mu$ L) foi utilizado como controle negativo; paclitaxel (50 nM) foi utilizado 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.

#### 4.8 Análise da polimerização da microtúbulos

Pra avaliar se o acúmulo de células SF-268 na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular, pela **Vit F** e **Vit A**, envolvia alguma alteração sobre a formação dos microtúbulos, foi realizado um ensaio para avaliar a polimerização de tubulina *in vitro*.

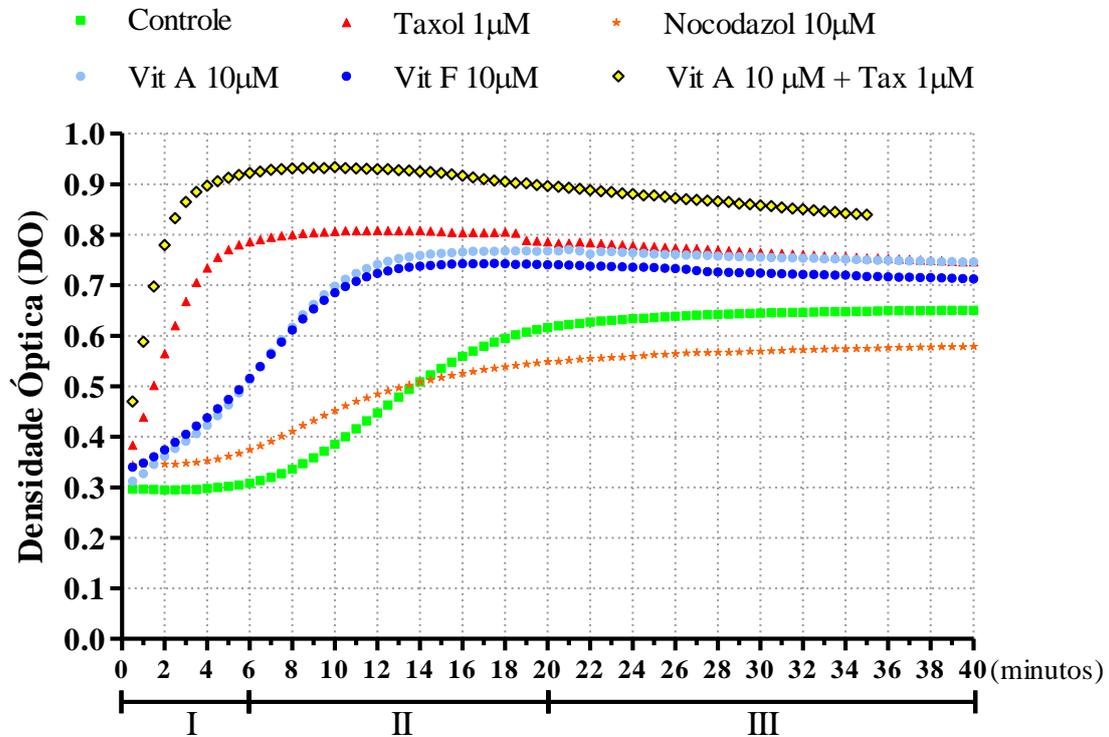
De acordo com a figura 14, no controle negativo (curva verde), é possível notar as três fases que envolvem a polimerização dos microtúbulos, a fase de nucleação (0-6 minutos), a fase de crescimento (6-20 minutos) e a fase de estabilização (20-40 minutos).

Quando as subunidades de tubulina são incubadas com 1  $\mu$ M de paclitaxel, este composto atua induzindo e estabilizando a formação dos microtúbulos, em que ele não apresenta a fase de nucleação e atinge seu efeito máximo sobre a polimerização em 6 minutos ( $V_{max}$ = 130 mDO/min) (Figura 15). Já no controle negativo são precisos em torno de 20 minutos para que os microtúbulos cheguem ao estado de estabilização. No tratamento com nocodazol (curva laranja) a fase de nucleação existe, porém de maneira mais curta (0-4 min), assim também como a fase de crescimento, que termina por volta dos 14 minutos, além de que a densidade óptica máxima atingida foi de 0,56 ( $V_{max}$ = 27 mDO/min), o que indica uma menor formação de microtúbulos em relação o controle negativo ( $V_{max}$ = 30 mDO/min).

No tratamento com os vitaesteróides, tanto a vitaferina A quanto a vitafisalina F, na concentração de 10  $\mu$ M, atuam de forma semelhante ao paclitaxel, induzindo e estabilizando a formação de microtúbulos (curvas azuis). A fase de nucleação também é abolida, porém a fase de crescimento só termina após 12 minutos de incubação, mas ainda 8 min antes do tempo necessário para a completa polimerização dos microtúbulos no controle negativo (20 min). É possível perceber também que a quantidade de microtúbulos formada, no tratamento com **Vit F** e **Vit A** é maior do que no controle com o valor de  $V_{max}$  de 60 mDO/min, o dobro do  $V_{max}$  do controle negativo.

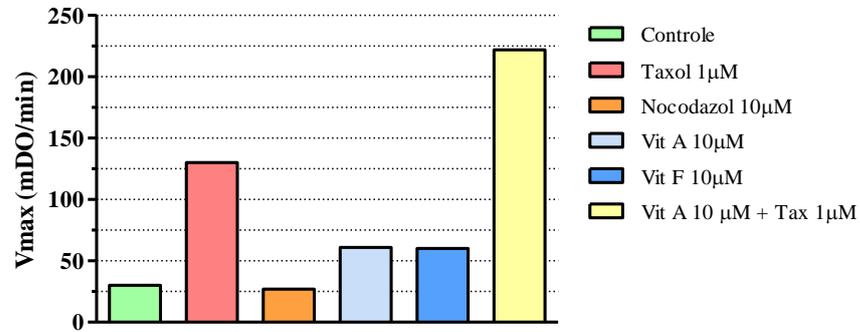
Interessantemente, quando a **Vit A** (10  $\mu$ M) é incubada em conjunto com o paclitaxel (1  $\mu$ M), o efeito sobre a polimerização de microtúbulos é ainda maior em relação ao tratamento somente com o paclitaxel, em que apenas 4 minutos de incubação são necessários para a fase de crescimento ser completada (paclitaxel: 6 min). A quantidade de microtúbulos formada com Vit A/ paclitaxel ( $V_{max}$ = 222 mDO/min) também é maior do que o paclitaxel somente, assim como é quase quatro vezes mais rápida do que a **Vit A** e mais que sete vezes maior que no controle negativo ( $V_{max}$ = 30 mDO/min).

**Figura 14** - Efeito da vitafisalina F e vitaferina A sobre a polimerização de microtúbulos. A figura mostra a polimerização dos microtúbulos através do aumento na densidade óptica (eixo y), em relação ao tempo (eixo x).



DMSO (6  $\mu$ L) foi utilizado como controle negativo; paclitaxel (1  $\mu$ M) e nocodazol (10  $\mu$ M) foram utilizados como controles positivos. As três fases da polimerização, para o controle negativo, são demonstradas: I (nucleação); II (crescimento); III (equilíbrio).

**Figura 15** - Efeito da vitafisalina F e vitaferina A sobre a polimerização de microtúbulos. O gráfico representa os valores de  $V_{max}$ , obtidos através da divisão da densidade óptica (DO) pelo tempo total das fases I e II da polimerização dos microtúbulos.



DMSO (6  $\mu$ L) foi utilizado como controle negativo; paclitaxel (1  $\mu$ M) e nocodazol (10  $\mu$ M) foram utilizados como controles positivos.

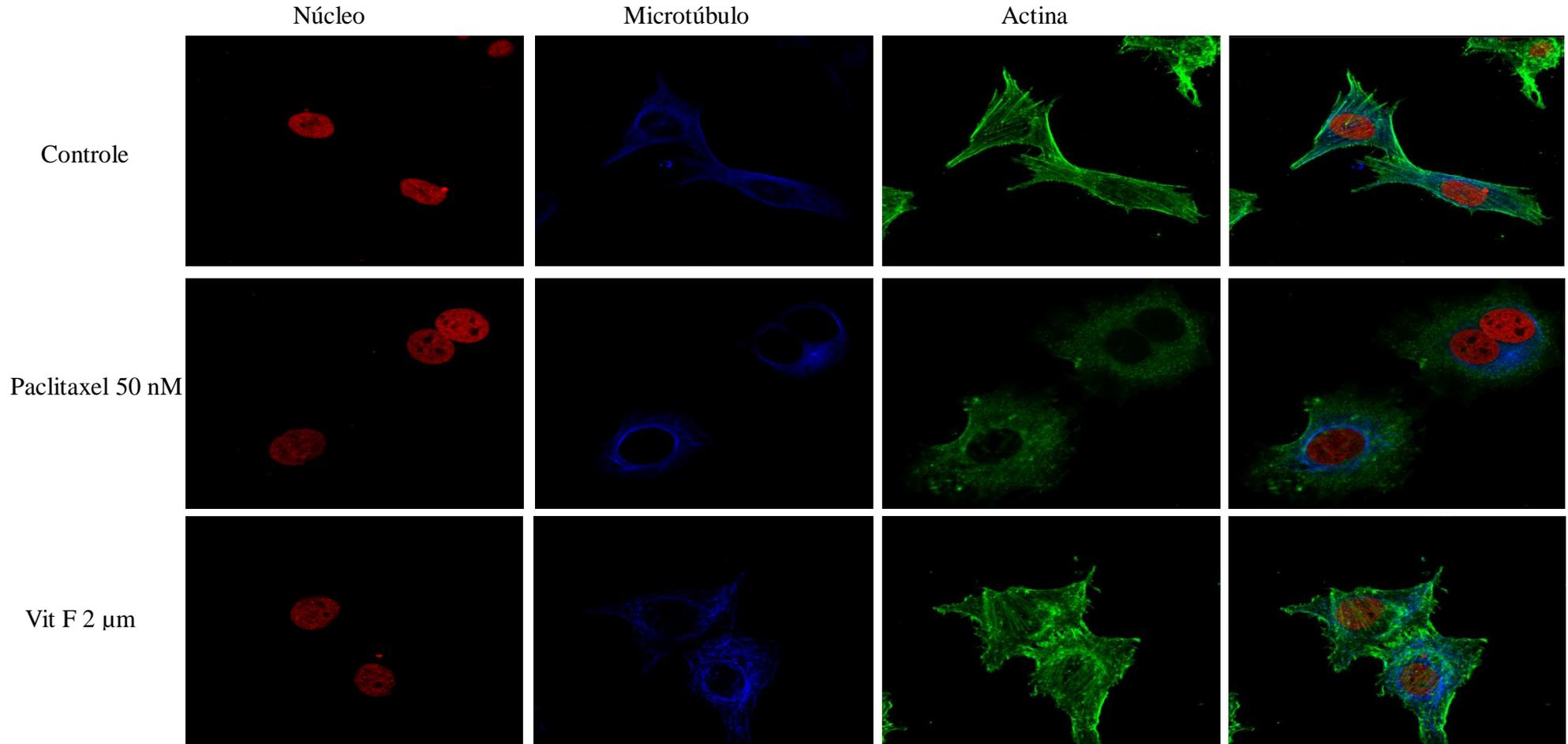
#### 4.9 Análise morfológica - microscopia confocal

Pra comprovar que o acúmulo induzido pela **Vit F** e **Vit A** nas células SF-268 na fase G2/M do ciclo celular, envolvia alguma alteração sobre a formação dos microtúbulos, imagens da morfologia de células SF-295 (glioblastoma) e PC-3M (próstata) foram adquiridas utilizando microscópio confocal (**Figuras 16 e 17**).

De acordo com a figura 15 é possível observar a alteração na distribuição dos microtúbulos em células tratadas com o paclitaxel e a Vit F. No controle negativo os filamentos de microtúbulos se encontram uniformemente distribuídos por toda a célula, enquanto que nas células tratadas os microtúbulos parecem estar condensados e distribuídos principalmente ao redor do núcleo. Nas células tratadas com Vit F, também é possível observar pontos de actina agregados, assim como havia sido observado anteriormente em Falsey *et al.* (2006).

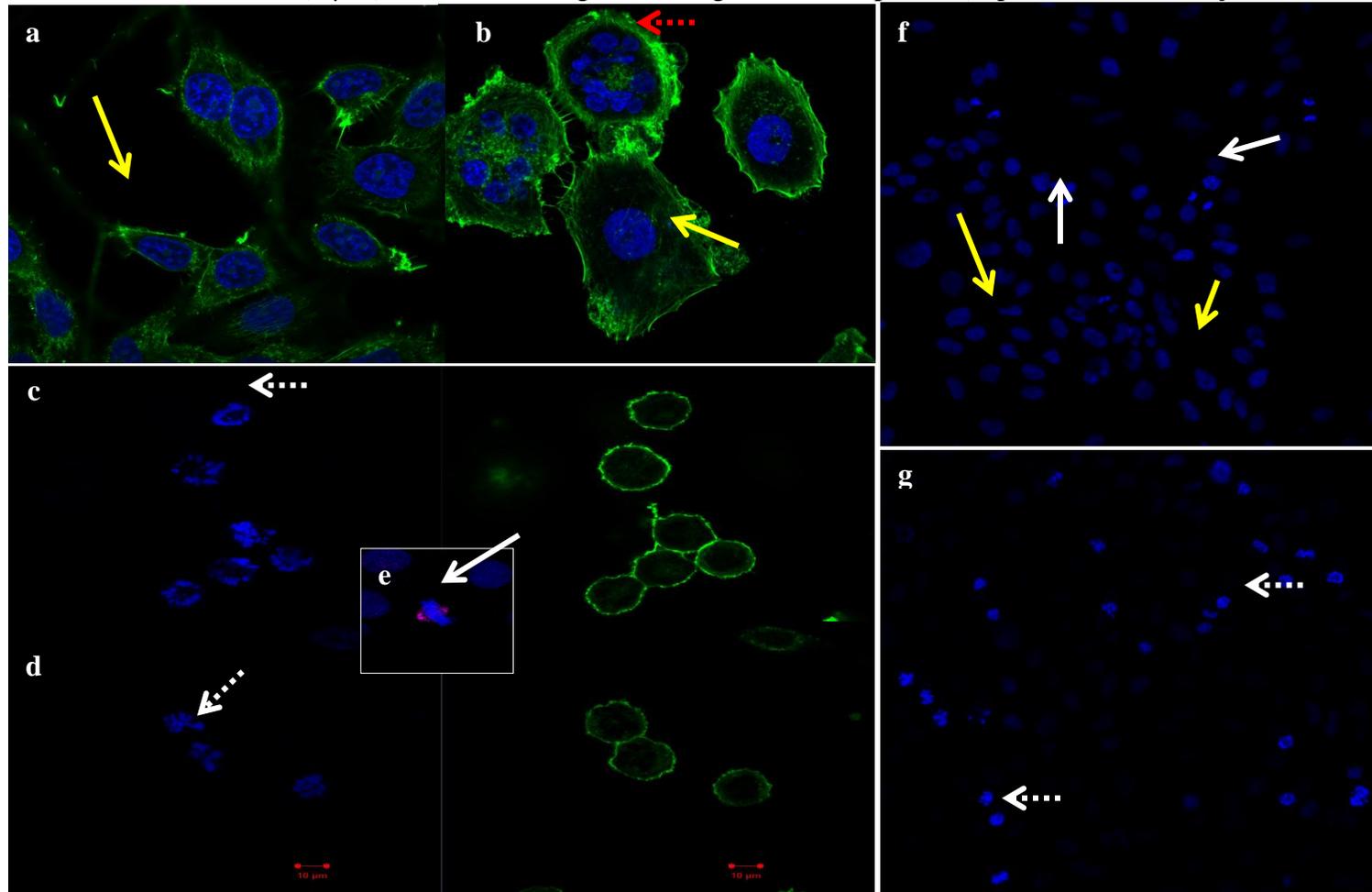
Já na figura 16, é possível observar o formato que os cromossomos adquirem, quando as células são tratadas com paclitaxel e Vit A, característicos de uma mitose atípica (Figura **17 c e d**). Células em interfase podem ser observadas na Figura **17 a e f**, e em **g** a quantidade aumentada de mitoses atípicas em relação ao controle negativo. Em **e** pode ser observado uma célula em metáfase com todos os cromossomos ligados ao microtúbulos e alinhados na placa equatorial.

**Figura 16** – Efeito da vitafisalina F (2 $\mu$ M) sobre a morfologia da linhagem SF-295 (glioblastoma) após 24 h de incubação



As imagens representam o núcleo (vermelho), microtúbulos (azul) e actina (verde). DMSO (10  $\mu$ L) foi utilizado como controle negativo; paclitaxel (50 nM) foi utilizado como controle positivo.

**Figura 17** - Efeito da vitafisalina A ( $2 \mu\text{M}$ ) sobre a morfologia da linhagem PC-3M (próstata) após 24 h de incubação.



(a; e; f) controle negativo; (b; c) paclitaxel; (d; g) Vit A. As imagens representam o núcleo (azul), actina (verde) e microtúbulos (magenta). As setas representam: Seta branca- mitose; Seta branca pontilhada- mitose atípica; Seta amarela- Interfase ; Seta vermelha- DNA fragmentado. DMSO ( $10 \mu\text{L}$ ) foi utilizado como controle negativo; paclitaxel ( $50 \text{ nM}$ ) foi utilizado como controle positivo.

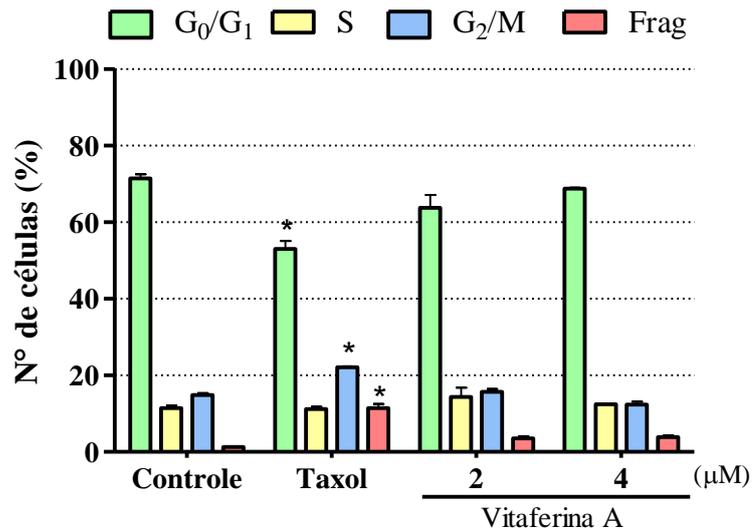
#### 4.10 Análise do ciclo celular em células de fibroblasto (WI-38)

Assim como para a linhagem SF-268, a análise do ciclo celular de células de fibroblasto (WI-38) tratadas com vitaferina A foi avaliada (Figura 18). No entanto, nenhuma alteração na distribuição das fases do ciclo celular de células tratadas com a **Vit A** foi percebida. Como esperado, as células tratadas com 50 nM de paclitaxel causam um aumento de 7,2 % de células na fase G<sub>2</sub>/M em relação ao controle negativo (paclitaxel: 22,1 %; DMSO: 14,9 %).

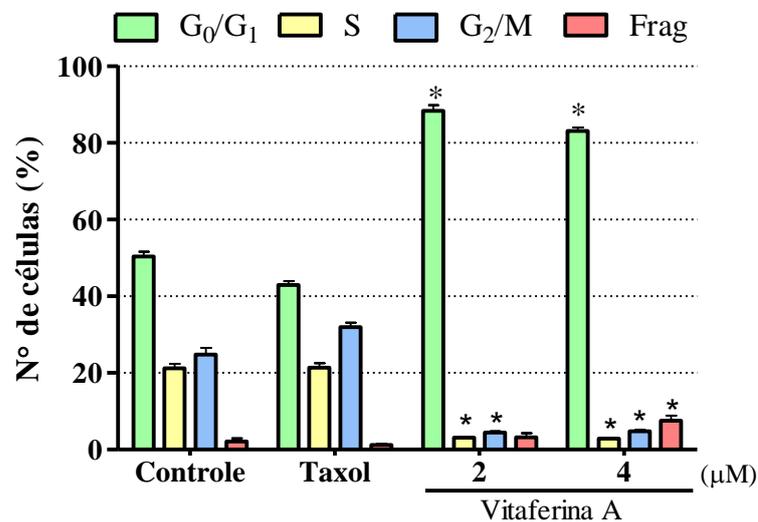
Interessantemente, quando as células de WI-38 foram sincronizadas, ou seja, incubadas na ausência de soro fetal bovino (SFB) por 24 h para sincronização das células, a vitaferina A age acumulando as células na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> do ciclo celular, nas duas concentrações testadas. Na concentração de 2 µM o número de células na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> é de 88,4 %, enquanto que no controle negativo 50,3 % das células se encontram nessa mesma fase. As fases S e G<sub>2</sub>/M, também sofreram alteração, onde a quantidade de células nessas duas fases foram reduzidas para 3,1 e 4,4 %, respectivamente, em relação as células incubadas com SFB (14,4 e 15,7 %, respectivamente).

**Figura 18** – Efeito da vitaferina A sobre a distribuição do ciclo celular da linhagem WI-38 (fibroblasto), determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação com os compostos (A).

A



B



As células também foram sincronizadas, seguido do tratamento com os compostos por mais 24 h (B). DMSO (4 μL) foi utilizado como controle negativo; paclitaxel (50 nM) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem à média ± E.P.M. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*, p < 0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

#### 4.11 Análise do ciclo celular em células de glioblastoma sincronizadas (SF-268)

Assim como a linhagem WI-38, as células de SF-268 também foram incubadas na ausência de soro fetal bovino, para sincronização, e em seguida tratadas com Vit A e Vit F por 24 h. A distribuição das fases do ciclo celular é mostrada na figura 19.

O efeito do paclitaxel foi semelhante ao das células incubadas na presença de SFB, com aproximadamente o dobro de células (68,4 %) acumuladas na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular, em relação o controle negativo (35,4 %) (Tabela 5). Já nas células tratadas com ambos vitaesteróides o efeito observado foi exatamente o oposto, em que as células incubadas na ausência de SFB e tratadas com a Vit F e Vit A apresentaram um acúmulo na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, ao passo que, quando incubadas com SFB esse acúmulo de células foi observado na fase G<sub>2</sub>/M.

A vitafisalina F, na concentração de 4 µM, induziu o maior acúmulo de células em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, com 62,8 % das células nessa mesma fase. Já a vitaferina A induziu um acúmulo de 59,2 % das células na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> na concentração de 2 µM. A fase S quase não sofreu nenhuma alteração, enquanto que na fase G<sub>2</sub>/M foi observado uma diminuição de até 13,7 %, no tratamento com **Vit A** (21,7 %), na concentração de 4 µM, quando comparado com o controle negativo (35,4 %).

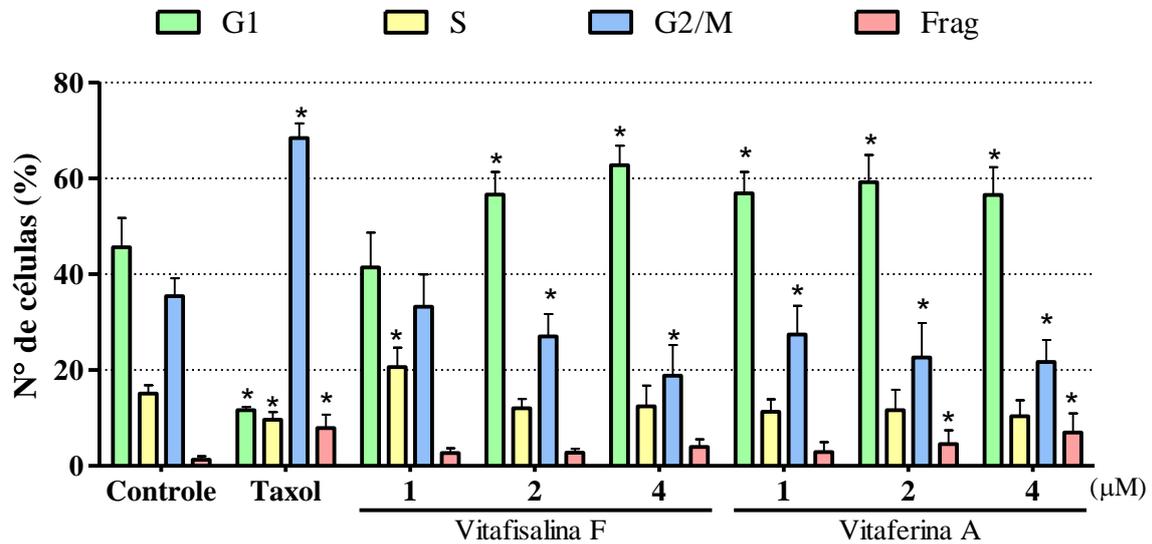
Na figura 20, os histogramas representativos as fases do ciclo celular das células incubadas na presença e ausência de SFB tratadas com a vitafisalina F e vitaferina A são comparados ao do controle negativo (FBS+). É possível observar a semelhança dos histogramas, nas células do controle negativo e nas células tratadas com 50 nM de paclitaxel, nas duas situações. Já nos histogramas das células tratadas com os vitaesteróides **Vit F** e **Vit A**, é possível notar que a fase S e G<sub>2</sub>/M está diminuída, e o número de células em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> está aumentado, nas células incubadas na ausência de SFB em comparação com SFB +.

**Tabela 5** - Efeito da vitafisalina F e vitaferina A sobre a distribuição do ciclo celular da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma), determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação na ausência de SFB, e em seguida tratada por mais 24 h com os compostos.

Substâncias	Concentração	Fase do ciclo celular (%)			
		± E.P.M.			
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	Frag
Controle	-	45,6	15,1	35,4	1,3
		6,2	1,7	3,7	0,7
Paclitaxel	50 nM	11,6	9,7	68,4	7,9
		0,7	1,6	3,1	2,8
Vit F	1 µM	41,4	20,7	33,3	2,7
		7,3	4,1	6,7	1,0
	2 µM	56,6	12,1	27,1	2,8
		4,8	1,9	4,6	0,8
	4 µM	62,8	12,5	27,4	4,0
		4,1	4,3	6,0	1,6
Vit A	1 µM	56,9	11,3	27,4	2,9
		4,5	2,6	6,0	2,1
	2 µM	59,2	11,7	22,6	4,6
		5,6	4,3	7,2	2,8
	4 µM	56,6	10,4	21,7	7,0
		5,8	3,3	4,6	3,9

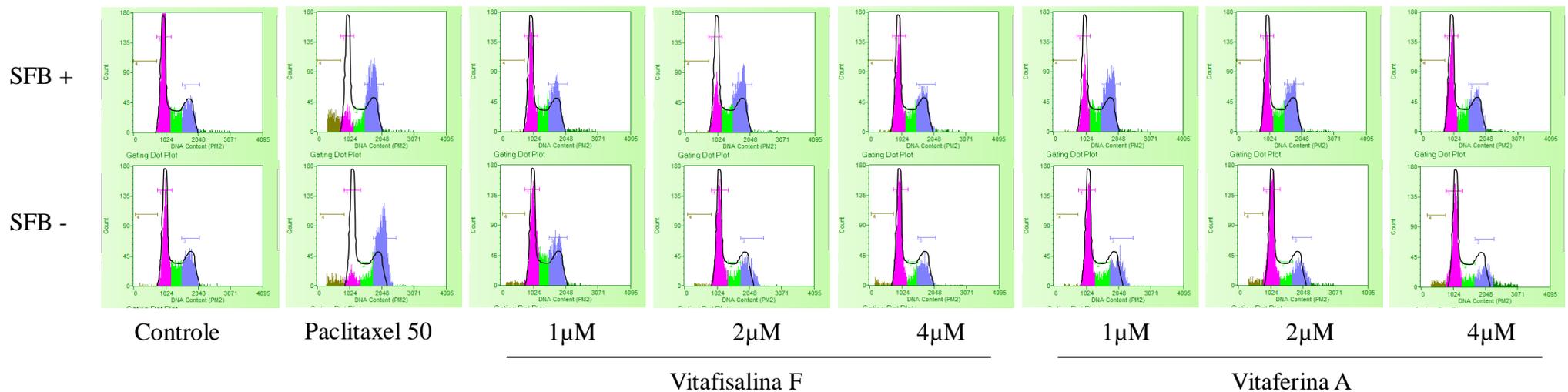
DMSO (4 µL) foi utilizado como controle negativo; Paclitaxel (50 nM) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento.

**Figura 19** – Efeito da vitafisalina F e vitaferina A sobre a distribuição do ciclo celular da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma) sincronizada, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação com os compostos.



DMSO (4  $\mu$ L) foi utilizado como controle negativo; paclitaxel (50 nM) foi utilizado 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.

**Figura 20** – Efeito da vitafisalina F e vitaferina A sobre a distribuição do ciclo celular (eixo x: intensidade de fluorescência; eixo y: número de células) da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma) incubadas na presença e ausência de soro fetal bovino (SBF), determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação com os compostos.



DMSO (4 μL) foi utilizado como controle negativo; paclitaxel (50 nM) foi utilizado como controle positivo. Um contorno foi realizado sobre o histograma do controle (SFB+) e plotado sobre os demais histogramas para comparação. Os histogramas foram obtidos do programa Cytosoft Guava Cell Cycle e representam a média de três experimentos independentes.

#### 4.12 Análise do ciclo celular em células de glioblastoma sincronizadas (SF-268), seguida de incubação com paclitaxel

Com o intuito de avaliar se as células de SF-268 sincronizadas estavam mesmo acumuladas na fase  $G_0/G_1$  do ciclo celular, células foram incubadas na ausência de SFB e em seguida incubadas por 24 h com diferentes concentrações de **Vit A**. Logo após, as células foram então lavadas com PBS e novamente incubadas por mais 24 h, agora na presença de 50 nM de paclitaxel. Nesse experimento foram utilizados dois grupos como controle negativo, em que em um dos grupos controle foi adicionado 50 nM de paclitaxel na segunda parte do experimento. Como controle positivo, nesse experimento, foi utilizado 10  $\mu$ M de Tarceva® (erlotinibe).

Como esperado para células sincronizadas, nas concentrações de 2 e 4  $\mu$ M, a vitaferina A induziu um acúmulo de células na fase  $G_0/G_1$  do ciclo celular, quando comparado com o controle negativo (Figura 21A). Quando tratadas com 4  $\mu$ M de **Vit A**, 70,3 % das células se apresentavam na fase inicial do ciclo celular, 16,4 % a mais do que no controle negativo (53,9 %). Interessantemente a **Vit A**, na concentração de 0,5  $\mu$ M, induziu de modo significativo um acúmulo de células na fase  $G_2/M$ , quando nos ensaios anteriores esse efeito só era observado em células incubadas na presença de soro fetal bovino e em concentrações mais elevadas de 1, 2 e 4  $\mu$ M. Conseqüentemente, é possível observar também uma leve redução e aumento significativo, respectivamente nas fases  $G_0/G_1$  e S, das células incubadas com 0,2 e 0,5  $\mu$ M de vitaferina A.

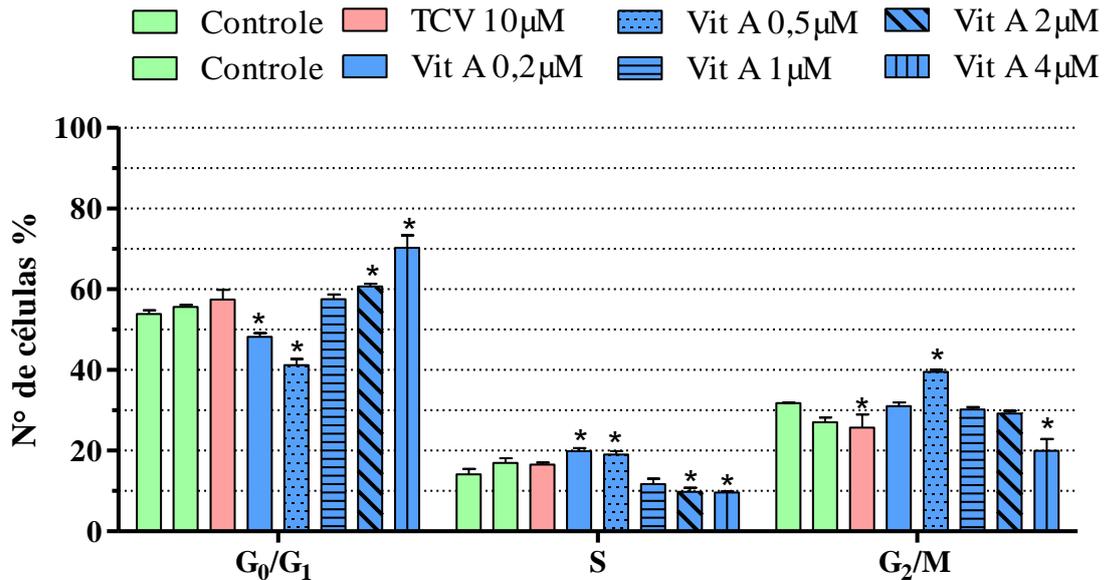
Em seguida, após a incubação extra com 50 nM de paclitaxel, o que se observa é que no tratamento com 0,2 e 0,5  $\mu$ M de **Vit A**, o acúmulo de células em  $G_2/M$  aumenta drasticamente em relação ao controle negativo (Figura 21B). Nessas duas concentrações (0,2 e 0,5  $\mu$ M) o efeito da vitaferina A se assemelha muito ao do paclitaxel, em que aproximadamente 80 % das células se encontram na fase  $G_2/M$  do ciclo celular, valor 2,5 vezes maior que no controle negativo (30,1 %). Em células pré-tratadas com 10  $\mu$ M de Tarceva, o efeito conseqüente a incubação do paclitaxel também pode ser observado, onde há um acúmulo de células na fase  $G_2/M$  (16 %) e uma diminuição da fase  $G_0/G_1$  (65,1 %) do ciclo celular.

Já nas células pré-incubadas com 1, 2 e 4  $\mu$ M de **Vit A**, a adição do paclitaxel parece não interferir no acúmulo das células em  $G_0/G_1$ , causado pela vitaferina A. Na figura 20B, é possível observar que, nas concentrações de 2 e 4  $\mu$ M de **Vit A**, mesmo após a adição de 50 nM de paclitaxel, a porcentagem de células na fase  $G_0/G_1$  (62,9 e 54,1 %, respectivamente) é

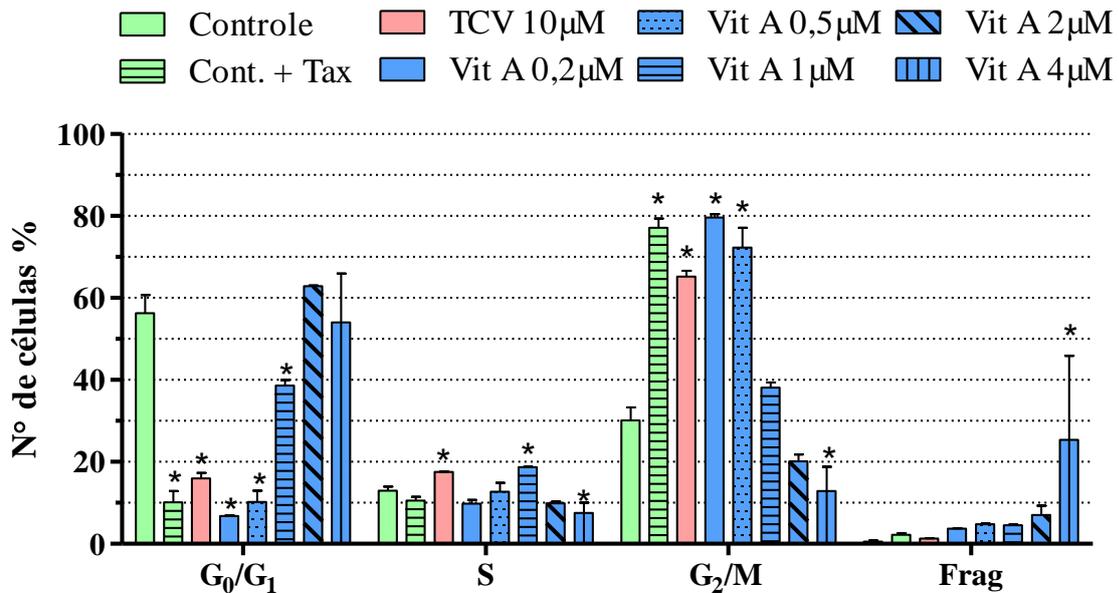
semelhante ao do controle negativo que não foi incubada com paclitaxel, o que realmente comprova o acúmulo das células na fase  $G_0/G_1$  do ciclo celular.

**Figura 21** – Efeito da vitafisalina F sobre a distribuição do ciclo celular da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma) sincronizada, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação com os compostos (A).

A



B



Após tratamento com Tarceva e Vit F as células foram então reincubadas por mais 24 horas na presença de paclitaxel (50 nM) (B). DMSO (4 µL) foi utilizado como controle negativo; (TCV) Tarceva (10 nM) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem à média ± E.P.M. de dois 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.

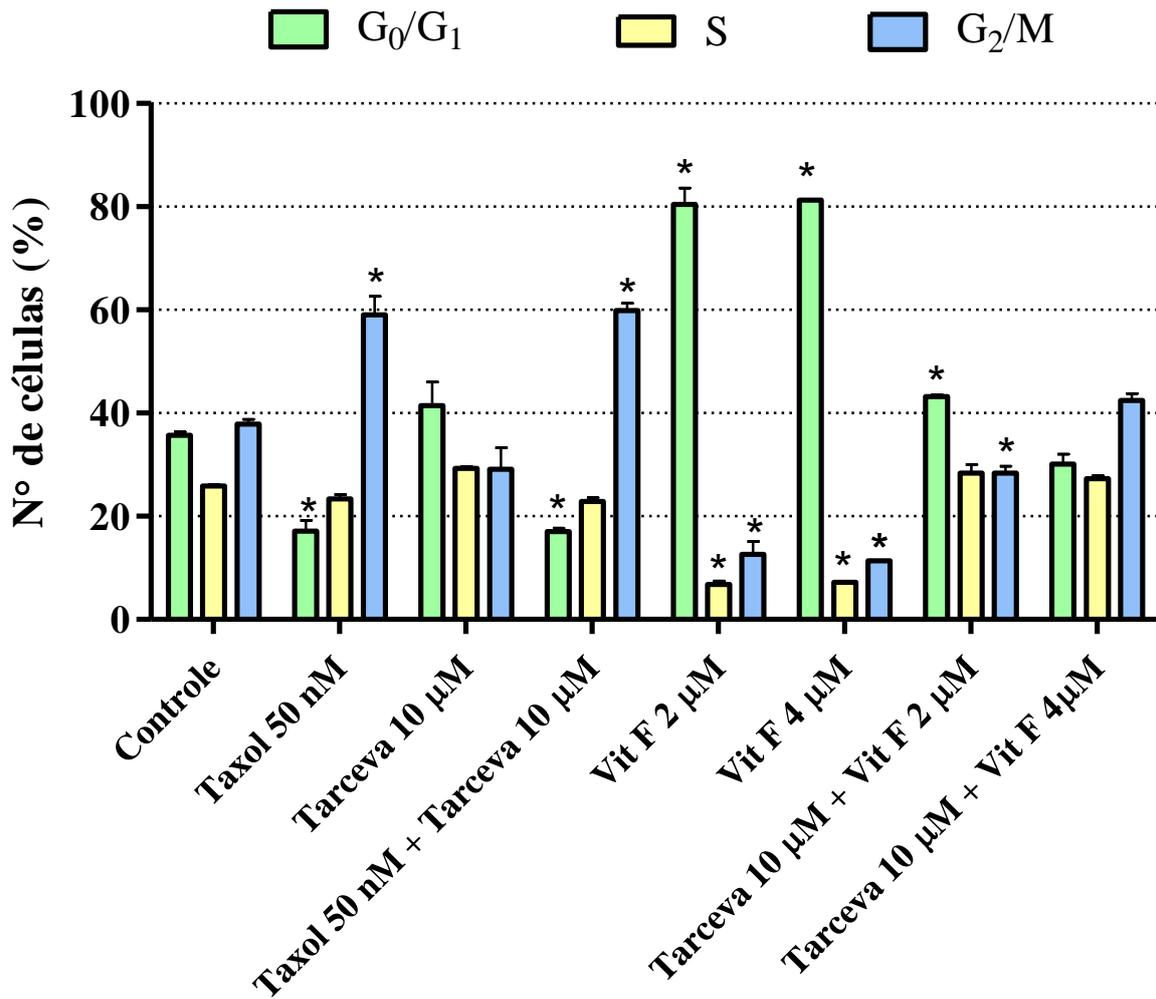
#### **4.13 Análise do ciclo celular em células de glioblastoma sincronizadas (SF-268), utilizando Tarceva**

Mais uma vez, pra tentar entender melhor a maneira como os vitaesteróides agem sobre células tumorais, o ciclo celular de células de glioblastoma (SF-268) foi avaliado após 24 de incubação na ausência de soro fetal bovino. Após esse período, foi adicionado novo meio contendo SFB e em seguida as células foram tratadas com paclitaxel (50 nM), Tarceva (10  $\mu$ M), **Vit F** (2 e 4  $\mu$ M) e Tarceva em conjunto com paclitaxel e **Vit F**.

Na figura 22 pode se observar que o paclitaxel age sempre de maneira semelhante, independente da pré-incubação sem SFB, acumulando células na fase  $G_2/M$  do ciclo celular. Assim também, como a distribuição das células no ciclo não é alterada pela adição de 10  $\mu$ M de Tarceva a cultura.

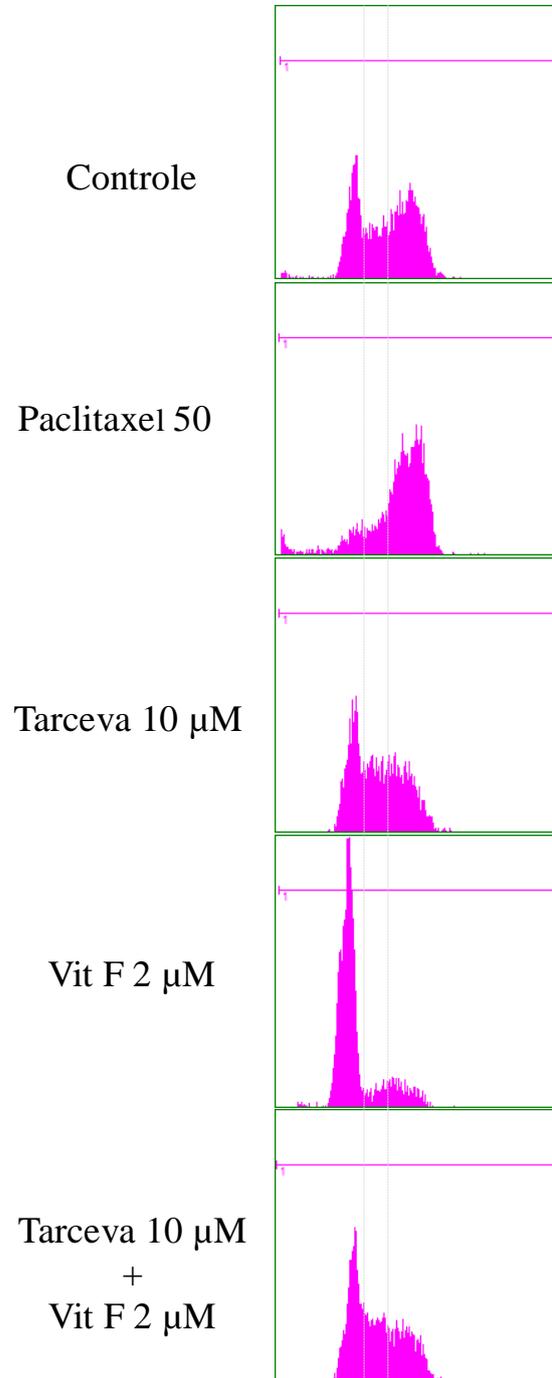
Assim como foi observado nos ensaios anteriores, a vitafisalina F induziu um acúmulo de aproximadamente 80 % das células na fase  $G_0/G_1$  do ciclo celular e consequente redução das fases S e  $G_2/M$  (Figura 23). No entanto quando a Vit F é incubada junto com Tarceva (10  $\mu$ M), esse acúmulo da fase  $G_0/G_1$  é suprimido. Vale ressaltar que, quando as células são tratadas com 2  $\mu$ M de Vit F em conjunto com 10  $\mu$ M de Tarceva, a distribuição das células no ciclo celular ( $G_0/G_1$ : 43,2 %; S: 28,3 %;  $G_2/M$ : 28,3 %) é muito semelhante ao efeito do tratamento com Tarceva somente ( $G_0/G_1$ : 41,4 %; S: 29,3 %;  $G_2/M$ : 29,1 %), o que indica que o Tarceva interfere na ação da vitafisalina F em acumular células em  $G_0/G_1$  e que provavelmente a **Vit F** esteja agindo através da mesma via de sinalização do Tarceva, a via do EGFR (Receptor do Fator de Crescimento Endotelial).

**Figura 22** – Efeito da vitafisalina F sobre a distribuição do ciclo celular da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma) sincronizada, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação com os compostos.



Após tratamento com Tarceva e Vit F as células foram então reincubadas por mais 24 horas na presença de paclitaxel (50 nM). DMSO (4 µL) foi utilizado como controle negativo; Tarceva (10 nM) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem à média ± E.P.M. de um experimento realizado em duplicata. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. \*,  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

**Figura 23** – Efeito da vitafisalina F sobre a distribuição do ciclo celular (eixo x: intensidade de fluorescência; eixo y: número de células) da linhagem tumoral SF-268 (glioblastoma), pré-incubadas na ausência de soro fetal bovino (SBF), determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação com os compostos.



DMSO (4  $\mu\text{L}$ ) foi utilizado como controle negativo; paclitaxel (50 nM) e Tarceva (10  $\mu\text{M}$ ) foram utilizados como controles positivos. As três fases do ciclo celular ( $G_0/G_1$ , S E  $G_2/M$ ) são identificadas na figura. Os histogramas foram obtidos do programa Cytosoft Guava Cell Cycle e representam a média de um experimento realizado em duplicata.

## ***5 Discussão***

Historicamente, as plantas medicinais tem sido utilizadas a milênios como a principal fonte de produtos naturais para o tratamento de doenças. Atualmente existem cerca de 270 mil espécies de plantas classificadas taxonomicamente e dentre essas em torno de 10 mil plantas são, ou já foram, utilizadas na medicina popular (TAN; GYLLENHAAL; SOEJARTO, 2006; MCCHESENEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007). Não só as plantas, mas diversos organismos marinhos e microrganismos terrestres também tem sido importantes em relação a obtenção de novos produtos naturais.

Na área do câncer, os produtos naturais tem sido de fundamental importância, já que grande parte dos medicamentos atualmente utilizados na clínica são de origem natural ou derivados destes (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Na verdade, o sucesso dos produtos naturais como potenciais drogas anticâncer tem sido bastante influenciado pela descoberta de principalmente dois compostos, o paclitaxel e a camptotecina. No entanto, nas duas últimas décadas, poucos compostos, de fonte natural, tem adentrado o arsenal de medicamentos utilizados para o tratamento do câncer, o que tem levado a formação de vários grupos de pesquisa ao redor do mundo, todos visando a descoberta de novas drogas com potencial anticâncer (NEWMAN; CRAGG, 2005; KINGHORN *et al.*, 2011).

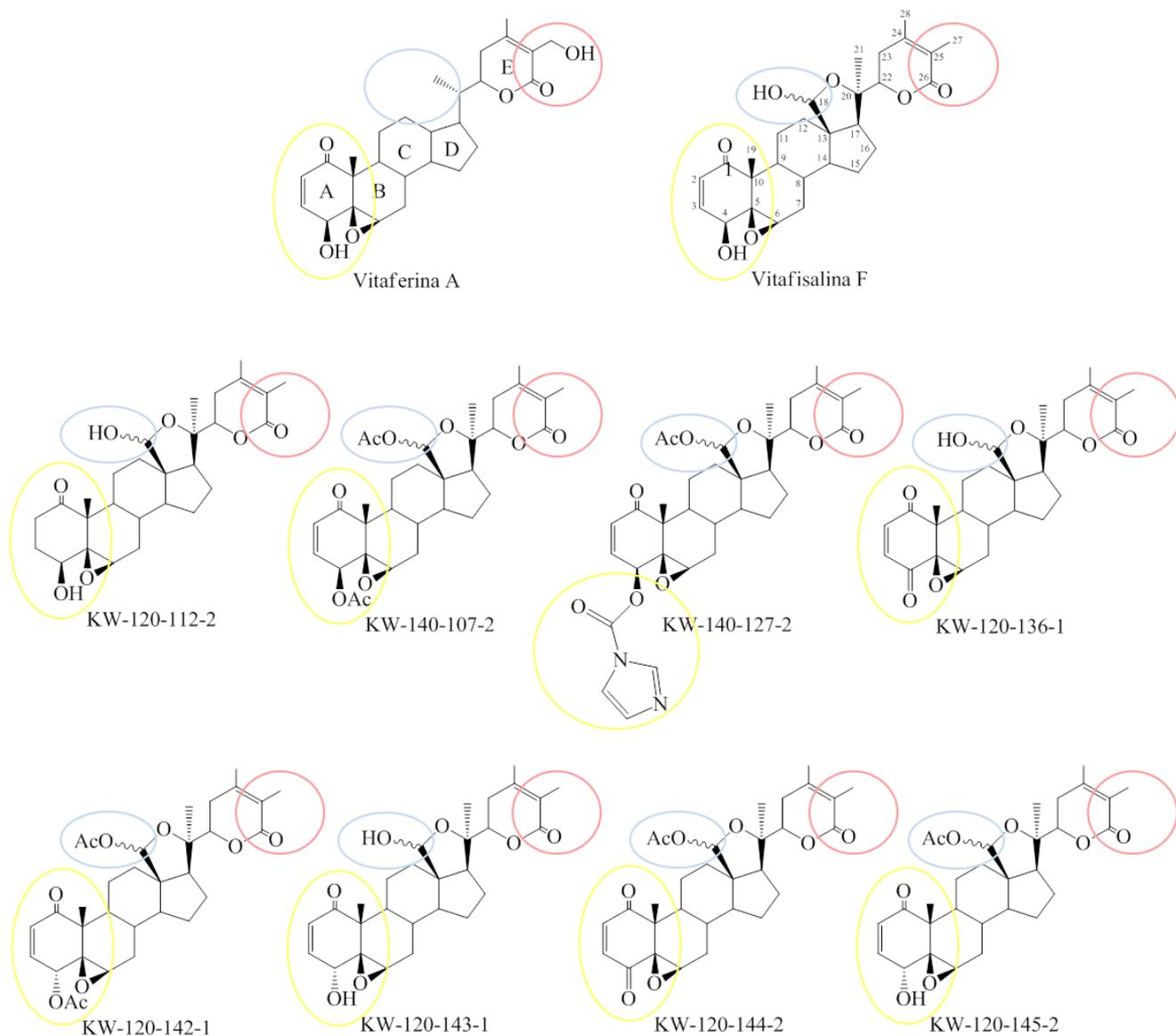
Nesse contexto, os vitaesteróides são compostos que nos últimos anos têm despertado grande interesse dos cientistas em razão de sua grande diversidade estrutural e seu amplo espectro de atividades farmacológicas, como: anti-inflamatório (JAYAPRAKASAM; NAIR, 2003; WUBE *et al.*, 2008), imunossupressor (SOARES *et al.*, 2006), antiparasitário (CARDONA *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2008), anticolinesterásico (RIAZ *et al.*, 2004), antimicrobiano (JANUÁRIO *et al.*, 2002; SHANAZBANU *et al.*, 2006), citotóxico (ROCHA *et al.*, 2006; HSIEH *et al.*, 2007) e antitumoral (DEVI; SHARADA; SOLOMON, 1995; MAGALHÃES *et al.*, 2006). Dentre estes, o efeito antitumoral dos vitaesteróide é o que tem tido maior relevância, com diversos trabalhos reportando a atividade dessa classe de compostos em diversas linhagens tumorais (YANG; SHI; DOU, 2007; FALSEY *et al.*, 2006; BARGAGNA-MOHAN *et al.*, 2007), no entanto, persiste ainda o desafio de se aprofundar e conhecer o exato mecanismo envolvido neste efeito. Com isso, o presente trabalho visa estudar melhor a atividade e os possíveis mecanismos de ação em células tumorais da vitafisalina F (**Vit F**), isolada da planta *Acnistus arborescens*, e comparar seus efeitos aos de outro vitaesteróide muito estudado, a vitaferina A (**Vit A**) isolada de *Withania somnifera*.

Inicialmente, foi realizado um processo de biotransformação da vitafisalina F, utilizando o fungo *Cunninghamella echunilata*, com o intuito de obter análogos mais ativos desse composto. Veras *et al.* (2004), reportaram o alto efeito citotóxico que a vitafisalina F apresentava em diversas linhagens tumorais. Mais recentemente, Rocha *et al.* (2011), descreveram o efeito que a Vitafisalina F causava sobre o ciclo celular de linhagens leucêmicas, acumulando células na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo e em seguida induzindo a apoptose. Apesar da vitafisalina F já ter se apresentado como potente agente antiproliferativo em células tumorais, os processos de biotransformação poderiam gerar alguns derivados mais potentes e seletivos para certos tipos de tumor, como já havia sido feito com a vitaferina A, em que análogos mais citotóxicos foram gerados após 5 dias da incubação da droga com o fungo *Cunninghamella elegans* (FUSKA *et al.*, 1982).

Nesse trabalho, dois fungos foram utilizados nas reações de biotransformação o fungo *Cunninghamella echunilata* e o fungo *Bauveria bassiana*. No entanto em nenhum dos casos os fungos foram capazes de metabolizar a vitafisalina F, onde praticamente toda quantidade do composto adicionada a cultura foi recuperada após 5 dias de incubação. Outras abordagens também foram testadas, como o aumento da quantidade de vitafisalina F adicionada à cultura e o aumento do período de incubação, assim como a utilização de diferentes solventes na extração dos metabólitos secundários, porém o resultado final desses experimentos sempre levavam ao isolamento da vitafisalina F e nenhum outro composto novo.

Esses processos de biotransformação com microorganismos tem se mostrado útil na realização de transformações químicas, de compostos bioativos naturais e sintéticos, que são difíceis ou impossíveis de alcançar por reações químicas convencionais, com a vantagem de serem estéreo e regioseletivas (EL SAYED *et al.*, 1998; RIVA, 2001). Assim, vale ressaltar que a vitafisalina F na verdade é composta por uma mistura epimérica (VERAS *et al.*, 2004), em que a hidroxila (OH) do carbono 18 (C18) pode aparecer tanto na posição  $\alpha$  como na posição  $\beta$ . Essa seria outro objetivo da realização da biotransformação, a tentativa de que os fungos conseguissem reagir com a OH do C18 e assim gerassem de fato apenas um composto, ao invés de dois epímeros. Por outro lado, o fato da vitafisalina F apresentar-se como uma mistura de epímeros é que pode ter contribuído para a falta de atividade dos fungos sobre esse composto. Com isso, partiu-se então para os meios clássicos de modificações de moléculas, utilizando dessa vez diversas reações químicas.

**Figura 24** – Estrutura química dos vitaesteróides estudados ressaltando as diferenças estruturais.



A partir da vitafisalina F, oito novos análogos foram gerados: KW-120-112-2 (**112-2**), KW-140-107-2 (**107-2**), KW-140-127-2 (**127-2**), KW-120-136-1 (**136-1**), KW-120-142-1 (**142-1**), KW-120-143-1 (**143-1**), KW-120-144-2 (**144-2**), KW-120-145-2 (**145-2**); e testados, juntamente com a vitafisalina F e vitaferina A (Figura 24), num painel de sete linhagens tumorais (PC-3M - próstata, NCI-H460 - pulmão, SF-268 - glioblastoma, CHP-100 - neuroblastoma, MDA-MB 231 - mama, MCF-7 - mama, MiaPaCa - pâncreas) pra avaliação de seus efeitos citotóxicos.

No geral, o vitaesteróide acetilado **107-2**, juntamente com o derivado imidazólico (**127-2**), foram os compostos mais ativos, quando comparados com a **Vit F**; nenhuma relação específica foi encontrada pra justificar o aumento de atividade, mas muito provavelmente ele se deve ao fato dos grupamentos que foram adicionados aumentarem a lipofilicidade desses compostos e conseqüentemente sua penetração nas células. A **Vit A** se mostrou citotóxica a todas as linhagens tumorais de maneira semelhante ( $IC_{50}$  variando de 0,2 a 0,6  $\mu M$ ), sem qualquer seletividade aparente pra nenhuma das linhagens testadas. Já os demais vitaesteróides, incluindo a **Vit F**, parecem exercer seus efeitos principalmente nas linhagens SF-268 e CHP-100, enquanto a linhagem MCF-7 se apresentou como a linhagem mais resistente. O efeito dos compostos **Vit F** e **107-2** sobre a linhagem SF-268 chegou a ser até 4 vezes maior do que na linhagem MCF-7 e no caso do análogo **127-2** esse efeito foi ainda mais perceptível, já que o efeito deste ultimo foi aproximadamente 11 vezes maior na linhagem SF-268 do que em MCF-7. Um resultado interessante observado foi que, até para o composto **112-2**, apesar de não ter apresentado nenhum efeito citotóxico nas linhagens testadas ( $IC_{50}$  variando de 9,7 a 17,8  $\mu M$ ), foi possível perceber um certo efeito preferencial para a linhagem SF-268 em relação as demais. Através disso já é possível perceber que a diferença nas estruturas entre **Vit A** e **Vit F** interferem na maneira como cada vitaesteróide vai agir nas diferentes células.

Estes resultados corroboram com outros que afirmam que pequenas mudanças na estrutura da molécula podem acarretar alteração do efeito biológico de um composto, sendo válido, portanto, a produção de análogos por técnicas químicas de semi-síntese na pesquisa de novas drogas, inclusive para drogas anticâncer (LEE, 2010). Cragg, Grothaus e Newman (2009) têm relatado diversos compostos de origem natural com alto potencial anticâncer, mas que porém seria necessário otimizar as estruturas por remoção, modificação, introdução de grupos funcionais e estereocentros, melhorando assim as propriedades desses compostos.

Embora o gasto global com a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos tenha aumentado nos últimos anos, a taxa de aprovação destes fármacos para uso clínico está em

declínio, principalmente devido ao grande número de efeitos colaterais e toxicidade destes compostos (MORROW; TIAN; ZHANG, 2010). Com isso um dos maiores desafios na descoberta de drogas no combate ao câncer é o desenvolvimento de moléculas potencialmente tóxicas somente às células tumorais, evitando que as células normais sejam afetadas. Desta maneira, em um estudo do potencial citotóxico de uma substância, é de fundamental importância a utilização também de células normais, para avaliar se existe alguma seletividade desses compostos para células normais ou tumorais (ZUCO *et al.*, 2002; ANAZETTI *et al.*, 2003).

O efeito citotóxico da **Vit F** e **Vit A** também foi avaliado em células normais de fibroblasto de pulmão humano (linhagem WI-38), utilizando o método do Alamar Blue, e os resultados se mostraram bem diferentes dos encontrados para as linhagens tumorais. As  $CI_{50}$  obtidas para vitafisalina F e vitaferina A foram de 16 e 7  $\mu\text{M}$ , respectivamente, até 17 vezes maior do que os valores de  $CI_{50}$  em células tumorais, corroborando com outros resultados que mostraram a baixa citotoxicidade de outras vitafisalininas em células mononucleadas de sangue periférico, demonstrando assim certa seletividade dos vitaesteróides para células tumorais (ROCHA *et al.*, 2006).

Estudos anteriores sobre a relação estrutura-atividade de outros vitaesteróides (DAMU *et al.*, 2007; JAYAPRAKASAM *et al.*, 2003) têm mostrado que a unidade 4 $\beta$ -hidroxi-2-en-1-ona, composta por uma carbonila ligada ao carbono 1 (C1), uma ligação dupla entre C2 e C3 e uma hidroxila no C4, seriam requisitos estruturais primordiais, mas não os únicos, para os efeitos farmacológicos dessa classe de compostos (SU *et al.*, 2002). De fato a ligação dupla entre C2 e C3 parece ser essencial para a atividade citotóxica dos vitaesteróides, já que a ausência dessa ligação, como em **112-2**, acarreta na perda de atividade desse composto (ROCHA *et al.*, 2006).

Outra unidade que parece ser essencial para o efeito citotóxico dos vitaesteróides é o anel epóxido entre os carbonos 5 e 6, onde a quebra desse anel ou quando o C5 e C6 se encontram ligados a outros grupamentos, a atividade desses compostos é bastante diminuída (SU *et al.*, 2002; MAGALHÃES *et al.*, 2006). De acordo com Damu *et al.* (2007) a quebra simultânea dessas duas unidades (cetona- $\alpha,\beta$  insaturada e 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epóxido) acarreta na perda total da citotoxicidade dos vitaesteróides. Além do efeito citotóxico, em Cardona *et al.* (2006) essas duas unidades foram também relacionadas como sendo as responsáveis pela atividade antiparasitária de outros vitaesteróides.

Levando-se em consideração a hidroxila (OH) presente no C4, essa parece exercer papel fundamental na citotoxicidade desses compostos, já que em **136-1**, quando a hidroxila é

substituída por uma carbonila, o efeito desse composto se mostra 4 vezes menor do que a **Vit F**. O mesmo acontece com **144-2**, que apesar de ter uma acetila no carbono 18, essa não parece favorecer a atividade do composto, que também possui uma substituição de OH por uma carbonila em C4.

Interessantemente, não só a presença da hidroxila em C4 parece ser essencial para a citotoxicidade dos vitaesteróides, mas também a sua posição estereoquímica, já que a simples conversão de  $\beta$ -OH para  $\alpha$ -OH acarreta na diminuição da atividade do composto **143-1**, assim como de **142-1**, que mesmo apresentando duas acetilas em sua estrutura, tiveram uma redução em suas atividades quando comparadas com **107-2** e a **Vit F**, respectivamente.

A busca por novos compostos citotóxicos se resume a descoberta de drogas que sejam tóxicas às células, ou seja, matem-nas. Mas nem sempre esse efeito é tão drástico assim. Geralmente o que acontece é uma morte de maneira programada, em que vários processos intracelulares são necessários para resultar na morte da célula. Esse tipo de morte celular programada, também conhecido como apoptose, tem fundamental importância na manutenção da homeostase de diversos sistemas biológicos, regulando o número de células através da eliminação de células velhas e danificadas (THOMPSON, 1995).

Uma das características que envolvem as células em apoptose é a externalização da fosfatidilserina, que funciona como molécula de reconhecimento para macrófagos e outros fagócitos responsáveis pela eliminação dessas células mortas ou em processo de morte (LI *et al.*, 2003). Um dos métodos experimentais mais utilizados pra detecção de células em apoptose se aproveita justamente dessa externalização da fosfatidilserina, em que uma proteína recombinante, a anexina V, interage especificamente com os resíduos de fosfatidilserina e pode então ser detectada por vários métodos (ARUR *et al.*, 2003).

Aqui, células de SF-268 foram tratadas com 2  $\mu$ M de **Vit A**, **Vit F** e seus análogos por 24 horas, em seguida incubadas com uma solução de anexina V e analisadas em citometro de fluxo. Todos os vitaesteróides testados, com exceção do **112-2**, induziram apoptose em células de SF-268 e assim como havia sido observado no ensaio do MTT os compostos **107-2** e **127-2** foram os mais potentes. Esse resultado está de acordo com outros trabalhos que confirmam a indução de apoptose por essa classe de compostos (ROCHA *et al.*, 2006; OH *et al.*, 2008; SHAH *et al.*, 2009).

Nos últimos 20 anos, estudos sobre a biologia molecular do câncer tem levado a descoberta de vários alvos moleculares que possibilitaram o melhor entendimento da tumorigênese, assim como o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento do câncer (KHALIL *et al.*, 2011). Nesse contexto, as proteínas de choque térmico ou HSPs (do inglês

Heat Shock Proteins) tem se mostrado como potenciais alvos de drogas anticâncer pelo fato de estas estarem envolvidas em diversos processos biológicos como a proliferação e sobrevivência celular (NECKERS, 2002).

Vários estudos tem revelado o papel fundamental que esse grupo de proteínas exerce sobre a formação do tumor, em que o aumento da expressão de certas HSPs, mais especificamente da HSP90, HSP70 e HSP27, tem sido observado em diversos tipos de câncer incluindo mama, ovário, cólon, pulmão e próstata (CIOCCA *et al.*, 2005; GARRIDO *et al.*, 2006). As HSPs atuam como moléculas chaperonas, algumas dependentes e outras não de ATP, evitando principalmente a má formação de novas proteínas assim também como na estabilização, maturação, ativação e degradação de outras proteínas (NETZER; HARTL, 1998; FREEMAN *et al.*, 2002).

Recentemente, Yu *et al.* (2010) demonstrou o efeito antiproliferativo da viteferina A em células tumorais de pâncreas e que ela se ligava a porção C-terminal da HSP90, inibindo assim sua ação como molécula chaperona e consequente degradação de diversas proteínas. Com isso, foi pensado também se a vitafisalina F, assim como seus análogos, poderia estar agindo através da inibição dessa família de proteínas de choque térmico.

O resultado do ensaio de modulação de HSPs mostra que estas proteínas respondem ao estímulo com vitaesteróides. Nas células tratadas, é induzida uma expressão de até 67 vezes mais HSP em relação ao controle negativo, o que comprova que o efeito sobre a modulação de proteínas de choque térmico está relacionado ao efeito citotóxico desses compostos, em que os vitaesteróides mais ativos foram também os que mais induziram a expressão de HSPs. Esses resultados também ressaltam a importância da unidade, no anel A dos vitaesteróides, já que os dois análogos (**136-1** e **144-2**) que tiveram a hidroxila do C4 substituída por uma carbonila não apresentaram atividade alguma sobre a modulação de HSPs. De fato a 4 $\beta$ -hidroxi-2-en-1-ona tem sido sempre relacionada como uma das mais importantes, mas não a única, unidades farmacofóricas dos vitaesteróides, em que ela geralmente age formando ligações de hidrogênio com os resíduos de cisteína das proteínas, assim como acontece com a HSP90 (FUSKA *et al.*, 1984; OH *et al.*, 2008; YU, *et al.*, 2010).

A proliferação celular ocorre através de uma sequência ordenada de eventos, em que todo material genético da célula é primeiramente duplicado para em seguida se dividir e gerar duas novas células. Esses dois processos, de duplicação do DNA e divisão celular, resumem as duas principais fases do ciclo celular, onde a duplicação ocorre na fase de síntese (fase S) e a divisão celular na fase de mitose (fase M) (FISHER *et al.*, 2004). Ao todo o ciclo celular é composto por quatro fases sequenciais, são elas: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M. A fase G<sub>1</sub> é a fase mais longa

do ciclo celular e é onde vão ocorrer o crescimento da célula e toda a síntese de proteínas e enzimas necessárias para a próxima fase, de duplicação do DNA. O mesmo ocorre na fase G<sub>2</sub>, em que a célula começa a se preparar para a fase de mitose e passa a produzir diversas proteínas necessárias para a correta divisão da célula (GUO; HAY, 1999).

Todo esse processo do ciclo celular é regulado por duas famílias de proteínas, as ciclinas e as quinases dependentes de ciclina (*cdks*, do inglês cyclin dependente kinases). As *cdks* estão constitutivamente expressas nas células, mas estas precisam se ligar às ciclinas para se tornarem ativas. Entretanto, as ciclinas são sintetizadas e degradadas de acordo com cada fase do ciclo celular, de modo que esse complexo ciclina-cdk se torne específico para cada uma dessas fases (COLLINS *et al.*, 2005).

No câncer, várias mutações têm sido observadas em genes que codificam *cdks*, ciclinas e outras proteínas relacionadas ao ciclo celular, o que resulta na proliferação descontrolada das células (MCDONALD; DEIRY, 2000).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que a vitafisalina F, assim como outras vitafisalinas, atuam sobre células leucêmicas de HL-60 induzindo acúmulo de células na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular e consequente morte celular por apoptose (ROCHA *et al.*, 2011). Não só as vitafisalinas, mas a vitaferina A também exerce efeito semelhante em células tumorais de mama (ZHANG *et al.*, 2011).

Dessa forma, o efeito da **Vit F** e **Vit A** sobre a distribuição do ciclo celular de células de glioblastoma, também foi avaliado, e assim como nos trabalhos anteriores (ROCHA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2008) ambos vitaesteróides testados agiram acumulando células em G<sub>2</sub>/M.

Stan, Zeng e Singh (2008) reportaram que o efeito da vitaferina A, sobre o ciclo celular, se dava através da inibição do complexo ciclina B1/*cdk1*, onde a expressão da ciclina B1 se inicia no final da fase S, em que ela vai se ligar a *cdk1* e conduzir a passagem das células da fase G<sub>2</sub> para M. A inibição desse complexo ciclina B1/*cdk1* seria consequência do aumento na expressão de p21<sup>cip1/waf1</sup>, que é um inibidor de *cdks*, e que também foi observado em células tratadas com Vit A (MUNAGALA *et al.*, 2011). Além disso, foi observada uma redução na expressão da *cdc25c*, que também atua regulando a ativação do complexo ciclina B1/*cdk1* e que justificaria o acúmulo de células na fase G<sub>2</sub>/M pela vitaferina A (STAN; ZENG; SINGH, 2008). Este efeito poderia explicar o acúmulo das células SF-268 em G<sub>2</sub>/M observado no presente trabalho após tratamento com ambos vitaesteróides, a vitaferina A e vitafisalina F

Além dos efeitos nas proteínas reguladoras do ciclo celular, a tubulina aparece como alvo de vários compostos que também levam ao atraso da progressão do ciclo principalmente na fase da mitose propriamente dita. Os efeitos sobre a tubulina podem levar a uma inibição da polimerização dessas proteínas em microtúbulos, bem como na estabilização dos microtúbulos, impedindo sua despolimerização. O paclitaxel (Taxol) e o docetaxel (Toxetere) são compostos que se ligam às subunidades de tubulina acelerando e estabilizando a formação dos microtúbulos. Já o nocodazole, e os alcalóides da vinca, vincristina e vimblastina, agem de maneira oposta, se ligando também as subunidades de tubulina, mas dessa vez inibindo a sua polimerização em microtúbulos (DUMONTET; SIKIC, 1999).

Os microtúbulos são estruturas dinâmicas responsáveis por vários processos intracelulares como a manutenção da estrutura celular, o transporte de organelas e principalmente pela formação do fuso mitótico. Ao inibir a formação dos microtúbulos, esses compostos impedem que os cromossomos se liguem ao fuso mitótico, o que acarreta na ativação do ponto de checagem da mitose, parada do ciclo e consequente morte celular por apoptose (DUMONTET; SIKIC, 1999). A ativação do ponto de checagem da mitose seria importante para as células evitarem que uma falha na segregação do material genético ocorresse e como resposta, as células permanecem paradas nessa fase até que todos os cromossomos se liguem corretamente ao fuso mitótico, o que não acontece quando as células são tratadas com compostos que inibem a polimerização dos microtúbulos.

Pensando nisso, foi realizado um teste com a vitafisalina F e a vitaferina A, pra verificar se elas interferiam ou não na polimerização de subunidades de tubulina em microtúbulos. Interessantemente, o que foi observado é que tanto a **Vit F**, quanto a **Vit A**, interferem na formação de microtúbulos e de maneira muito semelhante ao paclitaxel, aumentando a velocidade de polimerização e estabilizando os microtúbulos. Além disso, foi observado também que, quando incubados em conjunto, a **Vit A** potencializa o efeito do paclitaxel, o que vem a corroborar com o efeito dos vitaesteróides em agir nos microtúbulos.

Na verdade, esse resultado da ação da **Vit F** e **Vit A** sobre a polimerização de microtúbulos nos leva a confirmar que o acúmulo observado em G<sub>2</sub>/M na verdade se trata de células acumuladas predominantemente na fase de mitose, o que pôde depois ser comprovado também através das imagens obtidas no microscópio confocal.

Outras proteínas do citoesqueleto, como a actina e vimentina, já foram citadas como alvos moleculares da vitaferina A, seja por uma interação direta ou indireta sobre essas proteínas (FALSEY *et al.*, 2006; BARGAGNA-MOHAN *et al.*, 2007). Nesse sentido as proteínas de tubulina parecem servir também como um novo alvo em potencial para a ação

dos vitaesteróides, embora mais alguns estudos precisem ser realizados para comprovar esses achados.

Após isso, mais uma vez foi questionado se esse efeito em acumular células em mitose seria seletivo para células tumorais ou ocorreria também em células normais, já que o efeito citotóxico da **Vit F** e **Vit A** sobre a linhagem WI-38 teria sido considerado baixa. Interessantemente, o que foi observado é que, nenhuma alteração no ciclo celular ocorria quando essas células eram incubadas com a **Vit A**, inclusive nas células tratadas com paclitaxel onde se esperava encontrar um acúmulo em  $G_2/M$  típico do tratamento com esse composto, nenhuma alteração sobre o ciclo ocorreu, embora um leve acúmulo em  $G_2/M$  tenha sido observado. Na verdade, isso já havia sido observado com células normais de mama, em que a **Vit A** havia causado um acúmulo de células na fase  $G_2/M$  de linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7), mas nenhuma alteração sobre a distribuição do ciclo de células normais foi observado (STAN; ZENG; SINGH, 2008). No entanto quando essas células foram previamente sincronizadas, o efeito foi ainda mais interessante, pois o tratamento com a **Vit A** acabou induzindo um acúmulo de quase 88 % das células na fase  $G_0/G_1$  do ciclo celular. Efeito semelhante foi observado em astrócitos isolados de camundongo, em que a vitaferina A induziu um acúmulo dessas células na fase  $G_0/G_1$  após 48 horas incubadas na ausência de soro (BARGAGNA-MOHAN *et al.*, 2010).

A sincronização celular é simplesmente o processo de acumular as células de uma cultura, que se encontram em diferentes fases, numa mesma fase do ciclo celular. Apesar de não ser uma prática comum, esta é considerada a melhor maneira de se analisar a progressão das células ao longo do ciclo celular. Nesse caso, a sincronização foi realizada através da incubação das células na ausência de soro fetal bovino e como o soro é composto quase que exclusivamente de fatores de crescimento, as células deixam de receber o estímulo para proliferarem e acabam permanecendo acumuladas na fase  $G_1$ . No entanto, as células que já deram início as fases S ou  $G_2/M$  continuam até completarem o ciclo celular e somente a partir daí permaneceriam na fase  $G_1$ . Após certo período e com a adição de soro ao meio de cultura novamente, as células iniciariam a fase S, de certo modo, sincronizadas (RAFFAGHELLO *et al.*, 2008).

Dessa forma, o mesmo procedimento, de incubar as células na ausência de soro fetal bovino, foi realizado com a cultura de células de SF-268. E mais uma vez o efeito da **Vit A**, assim como o da **Vit F**, foi o de acumular parte das células na fase  $G_0/G_1$  do ciclo celular ao invés do acúmulo em mitose como havia sido observado anteriormente. Em seguida, pra verificar se esse acúmulo de células em  $G_0/G_1$  era de fato permanente, após o tratamento com

diferentes concentrações de **Vit A** e **Vit F** as células foram então novamente incubadas, agora na presença de paclitaxel. Os resultados desse experimento mostraram que nas menores concentrações utilizadas (0,2 e 0,5  $\mu\text{M}$ ) o acúmulo em  $G_0/G_1$  era revertido após tratamento subsequente com paclitaxel, mas surpreendentemente, nas concentrações de 1, 2 e 4  $\mu\text{M}$  o acúmulo de células na fase  $G_0/G_1$  foi predominante ao efeito do paclitaxel em induzir a parada do ciclo em mitose.

Vários estudos tem demonstrado que a origem dos gliomas está diretamente correlacionada com a desregulação do ciclo celular, decorrentes principalmente pelas mutações nos genes *RB* e *TP53*, responsáveis pelo controle da proliferação celular (FURNARI *et al.*, 2007). Além disso, células de glioma comumente possuem uma amplificação dos genes *CDK4* e *6* e apresentam um defeito na via de sinalização induzida pelos fatores de crescimento. (COSTELLO *et al.*, 1997). Mais especificamente, alterações nos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) têm sido relacionadas como uma das principais características dos glioblastoma humanos (FURNARI *et al.*, 2007).

A ativação de EGFR induz a entrada das células no ciclo celular através da ativação das via de sinalização MAPKs (do inglês Mitogen-activated protein kinases) e PI3K (do inglês Phosphatidylinositol 3-kinases), responsáveis pela expressão de várias proteínas do ciclo celular, como as ciclinas e cdks (GREGORY *et al.*, 2003). Nesse caso, a ciclina D vai interagir com as cdks 4 e 6, causando a fosforilação da proteína Rb e conseqüentemente a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. Ao mesmo tempo que o complexo ciclinaD/cdk4,6 aumenta a fosforilação de Rb, os níveis dos inibidores de cdks, p21 e p27 são diminuídos, garantindo assim que o ciclo celular continue normalmente.

Nas células tumorais, principalmente em células de glioblastoma, dois tipos de mutações envolvem os genes de EGFR, uma é o aumento na expressão desse receptor na membrana das células e a outra leva a ativação constitutiva desse receptor, em que ele independe de fatores de crescimento para se tornarem ativos. No caso da linhagem SF-268, a mutação no gene EGFR induz um aumento da expressão desses receptores na membrana celular, de duas a cinco vezes maior do que em células de tecido normal (WELLS; BISHOP; HELMESTE, 1988). Como nos experimentos realizados nesse trabalho, as células foram previamente incubadas na ausência de SBF e após esse período o meio de cultura foi substituído por um novo meio contendo soro e os compostos testados, foi pensado na possibilidade de que talvez a **Vit F** e a **Vit A** pudessem estar interferindo de alguma forma na via de sinalização desses receptores.

Com isso, o ciclo celular de células SF-268 foi novamente analisado, desta vez utilizando Tarceva (erlotinib), um inibidor específico dos receptores de EGFR (KRAKSTAD; CHEKENYA, 2010). Os resultados mostraram que, quando tratadas com Tarceva, a distribuição do ciclo celular se mostra um pouco alterada em relação ao controle negativo, embora nenhuma diferença significativa tenha sido observada entre as fases do ciclo celular dos dois grupos. Já no tratamento utilizando paclitaxel (50 nM) e Tarceva (10  $\mu$ M), a progressão celular parece continuar normalmente até as células pararem na fase de mitose, como era esperado. Da mesma forma, assim como foi observado anteriormente, o tratamento das células com a vitafisalina F induziu um acúmulo de aproximadamente 80 % das células na fase  $G_0/G_1$  do ciclo celular. No entanto, quando as células foram tratadas com a combinação de **Vit F** e Tarceva, o acúmulo de células na fase  $G_0/G_1$  foi completamente abolido. Interessantemente, quando as células foram tratadas com Tarceva (10  $\mu$ M), em conjunto com a **Vit F** (2  $\mu$ M), a distribuição do ciclo celular é bem semelhante a do ciclo de células tratadas com Tarceva somente, o que nos leva a crer que o Tarceva esteja de algum modo inibindo o efeito da **Vit F** em acumular as células em  $G_0/G_1$ .

Até hoje, poucos trabalhos envolvendo vitaesteróides, descreveram o acúmulo na fase  $G_0/G_1$  de células tratadas com esses compostos e de fato nenhum dos trabalhos realmente consegue explicar o porquê desse acúmulo (STAN; ZENG; SINGH, 2008; BARGAGNA-MOHAN *et al.*, 2010). No entanto, outros trabalhos relatam a presença de várias proteínas que podem estar ligadas a esse acúmulo em  $G_0/G_1$ , como é o caso do aumento na expressão das proteínas p21 e p27 e consequente redução dos níveis de ciclina D1 e cdk 4 (MUNAGALA *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2008). Além disso, a p21 parece estar envolvida tanto no acúmulo de células na fase  $G_1$  como na fase  $G_2/M$  (CAYROL; KNIBIEHLER; DUCOMMUN, 1998), o que poderia talvez em parte explicar esse efeito duplo dos vitaesteróides.

Várias proteínas foram reportadas como sendo alvos moleculares de vitaesteróides como anexina 2, vimentina, proteossoma e Hsp90, e interessantemente, em todos os casos descritos os vitaesteróides sempre interagem com as proteínas através da unidade 4 $\beta$ -hidroxi-2-en-1-ona (FALSEY *et al.*, 2006; BARGAGNA-MOHAN *et al.*, 2007; YANG; SHI; DOU, 2006; YU *et al.*, 2010). Aqui nesse trabalho, alguns resultados indicam que a tubulina também pode ser um potencial alvo para os vitaesteróides e não seria de surpreender se em breve o EGFR adentrasse essa lista. O fato é que aparentemente várias proteínas podem vir a ser alvos dos vitaesteróides, o que pode variar dependendo do tipo de célula e também das condições em que essa célula se encontra.

Com tudo isso, esse trabalho vem só ressaltar a importância de se continuar estudando e pesquisando melhor essa extensa classe de compostos, que apesar de já apresentar alguns mecanismos propostos, ainda possui um vasto caminho de possibilidades pra justificar o seu uso como potencial droga anticâncer.

## ***6 Conclusão***

- A vitafisalina F, isolada da planta *Acnistus arborescens*, apresentou potente atividade citotóxica em células tumorais e mostraram também atuar através da modulação de HSPs.

- Os análogos, obtidos através de reações químicas, também apresentaram potente efeito citotóxico e após a comparação da estrutura-atividade com a vitafisalina F, pode-se concluir que a presença da unidade 4 $\beta$ -hidroxi-2-en-1-ona, parece ser a responsável pela grande maioria dos efeitos das vitafisalinas.

- A vitafisalina F também induziu um acúmulo de células nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e em mitose, o que pode ser comprovado pela inibição da polimerização dos microtúbulos. O acúmulo em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> provavelmente se dá pelo efeito nos receptores EGF, no entanto outros estudos precisam ser realizados para comprovar esse efeito. Com isso, os resultados ressaltam o potencial antitumoral das vitafisalinas e a importância em se estudar essa classe de compostos.

# *Referências*

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.

ARUR, S.; UCHE, U. E.; REZAUL, K.; FONG, M.; SCRANTON, V.; COWAN, A. E.; MOHLER, W.; HAN, D. K. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Dev Cell.**, v. 4, n. 4, p. 587-598, 2003.

BARATA, L.; MORS, W. B.; KIRSON, I.; LAVIE, D. A new withanolide from *Acnistus arborescens* (L.) Schlecht. (Solanaceae) from state of Guanabara, Brazil. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 42, p. 401-407, 1970.

BARGAGNA-MOHAN, P.; HAMZA, A.; KIM, Y.E.; KHUAN; HO.Y.; MOR-VAKNIN, N.; WENDSCHLAG, N.; LIU, J.; EVANS, R.M.; MARKOVITZ, D.M.; ZHAN, C.G.; KIM, K.B.;MOHAN, R. The tumor inhibitor and antiangiogenic agent withaferin A targets the intermediate filament protein vimentin. **Chem. Biol.**, v. 14, p. 623-634, 2007.

BARTON, D. H. R.; NAKANISHI, K.; METH-COHN, O. **Comprehensive Natural Products Chemistry**. [S.l.]: Pergamon, 1999.

BAYLIN, S. B.; OHM, J. E. Epigenetic gene silencing in cancer: a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, p. 107-116, 2006.

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

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, v. 25, p. 475-516, 2008.

CARDONA, D.; QUINONES, W.; TORRES, F.; ROBLEDO, S.; VELEZ, I.D.; CRUZ, V.; NOTARIO, R.; ECHEVERRI, F. Leishmanicidal activity of withajardins and acnistins. An experimental and computational study. **Tetrahedron**, v. 29, p. 6822-6829, 2006.

CAYROL, C.; KNIBIEHLER, M.; DUCOMMUN, B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. **Oncogene**, v. 16, n. 3, p. 311-320, 1998.

CHOUDHARY, M. I.; YOUSUF, S.; NAWAZ, S. A.; AHMED, S.; ATTA, U. R. Cholinesterase inhibiting withanolides from *Withania somnifera*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 52, p. 1358-1361, 2004

CIOCCA, D. R.; CALDERWOOD, S. K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. **Cell Stress Chaperones**, v. 10, p. 86-103, 2005.

COLLINS, I.; GARRETT, M. D. Targeting the cell division cycle in cancer: CDKand cell cycle checkpoint kinase inhibitors. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 5, p. 366-373, 2005.

COSTELLO, J. F.; PLASS, C.; ARAP, W.; CHAPMAN, V.M.; HELD, W.A.; BERGER, M.S.; SU HUANG, H. J.; CAVENEE, W. K. Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. **Cancer Res.**, v. 57, p. 1250–1254, 1997.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chem. Rev.**, v. 109, p. 3012-3043, 2009.

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

DAMU, A. G.; KUO, P. C.; SU, C. R.; KUO, T. H.; CHEN, T. H.; BASTOW, K. F.; LEE, K. H.; WU, T. S. Isolation, structures, and structure - cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 1146-1152, 2007.

DEVI, P. U.; SHARADA, A. C.; SOLOMON, F. E. In vivo growth inhibitory and radiosensitizing effects of withaferin A on mouse Ehrlich ascites carcinoma. **Cancer Lett.**, v. 95, n. ½, p. 189-193, 1995.

DUMONTET, C.; SIKIC, B. I. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. **J. Clin. Oncol.**, v. 17, n. 3, p. 1061–1070, 1999.

EL SAYED, K. A.; HAMANN, M. T.; WADDLING, C. A.; JENSEN, C.; LEE, S. K.; DUNSTAN, C. A.; PEZZUTO, J. M. Structurally novel bioconversion products of the marine natural product sarcophine effectively inhibit j6 cell transformation. **J. Org. Chem.**, v. 63, p. 7449-7455, 1998.

FALSEY, R. R.; MARRON, M. T.; GUNAHERATH, G. M.; SHIRAHATTI, N.; MAHADEVAN, D.; GUNATILAKA, A. A.; WHITESELL, L. Actin microfilament aggregation induced by withaferin A is mediated by annexin II. **Nat. Chem. Biol.**, v. 2, p. 33-38, 2006.

FEHER, M.; SCHMIDT, J. M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 43, p. 218-227, 2003.

FIRN, R.O.; JONES, C.G. Natural products – a simple model to explain chemical diversity. **Nat. Prod. Rep.**, v. 20, p. 382-391, 2003.

FREEMAN, B. C.; YAMAMOTO, K. R. Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. **Science**, v. 296, p. 2232–2235, 2002.

FULDA, S.; K. M. DEBATIN. Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1705, p. 27-41, 2004.

FURNARI, F. B.; FENTON, T.; BACHOO, R. M.; MUKASA, A.; STOMMEL, J. M.; STEGH, A.; HAHN, W. C.; LIGON, K. L.; LOUIS, D. N.; BRENNAN, C.; CHIN, L.; DEPINHO, R. A.; CAVENEE, W. K. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev.**, v. 21, p. 2683-2710, 2007

FUSKA, J.; FUSKOVA, A.; ROSAZZA, J. P.; NICHOLAS, A. W. Novel cytotoxic and antitumor agents. IV. Withaferin A. Relation of its structure to the in vitro cytotoxic effects on P388 cells. **Neoplasma**, v. 31, p. 31–36, 1984.

FUSKA, J.; PROUSEK, J.; ROSAZZA, J.; BUDESINSKY, M. Microbial transformations of natural antitumor agents. 23. Conversion of withaferin-A to 12 beta- and 15 beta-hydroxy derivatives of withaferin-A. **Steroids**, v. 40, n. 2, p. 157-169, 1982.

GARRIDO, C.; BRUNET, M.; DIDELOT, C.; ZERMATI, Y.; SCHMITT, E.; KROEMER, G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. **Cell Cycle**, v. 5, p. 2592–2601, 2006.

GLICKMAN, M. H.; ADIR, N. The proteasome and the delicate balance between destruction and rescue. **PLoS Biol.**, v. 2, n. 1, p.13, 2004.

GREGORY, M. A.; QI, Y.; HANN, S.R., Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 51606–51612, 2003.

GRZANKA, A. Actin distribution patterns in HL-60 leukemia cells treated with etoposide. **Acta Histochemica**, v. 103, p. 453–464, 2001.

GUO, M.; HAY, B. A. Cell proliferation and apoptosis. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 11, p. 745–752, 1999.

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

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144 n. 5, p. 646-674, 2011.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp. Cell Res.**, v. 25, p. 585-621, 1961.

HSIEH, P. W.; HUANG, Z. Y.; CHEN, J. H.; CHANG, F. R.; WU, C. C.; YANG, Y. L.; CHIANG, M. Y.; YEN, M. H.; CHEN, S. L.; YEN, H. F.; LÜBKEN, T.; HUNG, W. C.; WU, Y.C. Cytotoxic Withanolides from *Tubocapsicum anomalum*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 747-753, 2007.

INCA. **Estimativa 2010**: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 18 set. 2011.

JANUÁRIO, A. H.; RODRIGUES FILHO, E.; PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, D. N.; SATO, D. N.; FRANÇA, S. C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). **Phytother. Res.**, v. 16, p. 445-448, 2002.

JAYAPRAKASAM, B.; NAIR, M. G. Cyclooxygenase-2 enzyme inhibitory withanolides from *Withania somnifera* leaves. **Tetrahedron**, v. 59, p. 841-849, 2003.

JAYAPRAKASAM, B.; ZHANG, Y.; SEERAM, N. P.; NAIR, M. G. Growth inhibition of human tumor cell lines by withanolides from *Withania somnifera* leaves. **Life Sci.** v. 74, p. 125-132, 2003.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; XU, J.; WARD, E. Cancer statistics, 2010. **CA Cancer J. Clin.**, v. 60, p. 277–300, 2010.

KHALIL, A. A.; KABAPY, N. F.; DERAZ, S. F.; SMITH, C. Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets? **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1816, n. 2, p. 89-104, 2011.

KINGHORN A. D.; PAN, L.; FLETCHER J. N.; HEEBYUNG, C. The Relevance of Higher Plants in Lead Compound Discovery Programs. **J. Nat. Prod.**, v. 74, n. 6, p. 1539–1555, 2011.

KSEBATI, M. B.; SCHMITZ, F. J. Minabeolides: A Group of Withanolides from a Soft Coral, *Minabea* sp. **J. Org. Chem.**, v. 53, p. 3926-3929, 1988.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: Pathology basis of diseases.** [S.l.]: WB Saunders, 2004.

KUPCHAN, S.M.; ANDERSON, W.K.; BOLLINGER, P.; DOSKOTCH, R.W.; SMITH, R.M.; SAENZ RENAULD, J.A.; SCHNOES, H.K.; BURLINGAME, A.L.; SMITH, D.H. Tumor Inhibitors. XXXIX. Active principles of *Acnistus arborescens*. Isolation and structural and spectral studies of withaferin A and withacnistin. **J. Org. Chem.**, v. 34, p. 3858-3866, 1969.

LEE, C. D.; SUI, X.; HOOKER, S. P.; HEBERT, J. R.; BLAIR, S. N. Combined Impact of Lifestyle Factors on Cancer Mortality in Men. **Ann. Epidemiol.**, v. 10, p. 749-754, 2011.

LEE, S.W.; PAN, M. H.; CHEN, C.M.; CHEN, Z. T. Withangulatin I, a new cytotoxic withanolide from *Physalis angulata*. **Chem. Pharmacol. Bull.**, v. 56, p. 234-236, 2008.

LEE, K. H. Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. **J. Nat. Prod.**, v. 73, n. 3, p. 500, 2010.

LI M. O.; SARKISIAN M. R.; MEHAL W. Z.; RAKIC P.; FLAVELL R. A. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1560-1563, 2003.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, p. 161, 2009.

MAGALHÃES, H. I. F.; VERAS, M. L.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, C. In-vitro and in-vivo antitumour activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 58, n. 2, p. 235-241, 2006.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015–2022, 2007.

McDONALD, E. R.; EL DEIRY, W. S. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. **Int. J. Oncol.**, v. 16, p. 871-957, 2000.

MERLO, L. M.; PEPPER, J. W.; REID, B. J.; MALEY, C. C. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 12, p. 924-935, 2006.

MINGUZZI, S.; BARATA, L. E. S.; SHIN, Y. G.; JONAS, P. F.; CHAI, H.; PARK, E. J.; PEZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 635-641, 2002.

MINGUZZI, S.; BARATA, L. E.; SHIN, Y.G.; JONAS, P.F.; CHAI, H.B.; PARK, E.J.; PEZZUTO, J.M.; CORDELL, G.A. Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 635-641, 2002.

MOHAN, R.; HAMMERS, H. J.; BARGAGNA-MOHAN, P.; ZHAN, X. H.; HERBSTTRITT, C. J.; RUIZ, A.; ZHANG, L.; HANSON, A. D.; CONNER, B. P.; ROUGAS, J.; PRIBLUDA, V. S. Withaferin A is a potent inhibitor of angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 7, p. 115-122, 2004.

MORRISON, T. B.; WEIS, J. J.; WITWER, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **Biotechniques**, v. 24, p. 954-962, 1998.

MORROW, J. K.; TIAN, L.; ZHANG, S. Molecular networks in drug discovery. **Crit. Rev. Biomed. Eng.**, v. 38, n. 2, p. 143-156, 2010.

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

MUNAGALA, R.; KAUSAR, H.; MUNJAL, C.; GUPTA, R. C. Withaferin A induces p53-dependent apoptosis by repression of HPV oncogenes and upregulation of tumor suppressor proteins in human cervical cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 11, p. 1697-1705, 2011.

NECKERS, L. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. **Trends Mo. Med.**, v. 8, p. 55-61, 2002.

NETZER, W. F.; HARTL, F. U. Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and-independent mechanisms. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, p. 68-74, 1998.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 17, p. 215 - 234, 2000.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as drug over the past 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Plants as a source of anti-cancer agents In: CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. **Anticancer agents from natural sources**. Boca Raton, FL: CRC Press/ Taylor & Francis, 2005. p. 553-571.

NITTALA, S. S.; LAVIE, D. Withanolides of *Acnistus breviflorus*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 12, p. 2735-2739, 1981.

OH, J. H.; LEE T. J.; PARK, J. W.; KWON, T. K. Withaferin A inhibits iNOS expression and nitric oxide production by Akt inactivation and down-regulating LPS-induced activity of NF-kappaB in RAW 264.7 cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 599, p. 11-17, 2008

ORTHOLAND, J. Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 8, p. 271 - 280, 2004.

PAN, Y.; WANG, X.; HU, X. Citotoxic withanolides from the flowers of *Datura metel*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 1127-1132, 2007.

PHILLIPS, R. M.; BIBBY, M. C. **Angiogenesis Protocols**. New York: Human Press, 2001.

QIUWEN M. I.; JOHN M.; PEZZUTO, N. R.; FARNSWORTH, M. C.; WANI, A. D. K.; STEVEN M. S. Use of the *in vivo* Hollow Fiber Assay in Natural Products Anticancer Drug Discovery. **J. Nat. Prod.**, v. 72, n. 3, p. 573-580, 2009.

RADHA, M.; HINA, K.; CHARU, M.; RAMESH, C. Gupta1,3, Withaferin A induces p53-dependent apoptosis by repression of HPV oncogenes and upregulation of tumor suppressor proteins in human cervical cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 32, n.11, p.1697-1705, 2011.

RAFFAGHELLO, L.; LEE, C.; SAFDIE, F. M.; WEI, M.; MADIA, F.; BIANCHI, G.; LONGO, V. D. Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 105, n. 24, p. 8215-8220, 2008.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacol. Ther.**, v. 99, p. 1-13, 2003.

RIAZ, N.; MALIK, A.; AZIZ-UR-REHMAN; NAWAZ, S. A.; MUHAMMAD, P.; CHOUDHARY, M. I. Cholinesterase-inhibiting withanolides from *Ajuga bracteosa*. **Chem. Biodivers.**, v. 1, n.9, p. 1289-1295, 2004.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 18, p. 57157-57153, 1962.

RIVA, S. Biocatalytic modification of natural products. **Curr. Opinion Chem. Biol.**, v. 5, p. 106-111, 2001.

ROCHA, D. D.; BALGI, A.; MAIA, A. I.; PESSOA, O. D.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; ROBERGE, M.; PESSOA, C. Cell cycle arrest through inhibition of tubulin polymerization by withaphysalin F, a bioactive compound isolated from *Acnistus arborescens*. **Invest. New Drugs**, v. 30, n. 3, p. 959-966, 2012.

ROCHA, D. D.; MILITÃO, G. C. G.; VERAS, M. L.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; ALVES, A. P. N. N.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Selective cytotoxicity of withaphysalins in myeloid leukemia cell lines versus peripheral blood mononuclear cells. **Life Sci.**, v. 79, p. 1692–1701, 2006.

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.

SALOMON, D. S.; BRANDT, R.; CIARDIELLO, F.; NORMANNO, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 19, p. 183–232, 1995.

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.

SCHWARTSMANN, G.; RATAIN, M. J.; CRAGG, G. M.; WONG, J. E.; SAIJO, N.; PARKINSON, D. R.; FUJIWARA, Y.; PAZDUR, R.; NEWMAN, D. J.; DAGHER, R.; DI LEONE, L. Anticancer drug discovery and development throughout the world. **J. Clin. Oncol.**, v. 20, n. 18, p. 47-59, 2002.

SHAH, N.; KATARIA, H.; KAUL, S. C.; ISHII, T.; KAUR, G.; WADHWA, R. Effect of the alcoholic extract of Ashwagandha leaves and its components on proliferation, migration, and differentiation of glioblastoma cells: combinational approach for enhanced differentiation. **Cancer Sci.**, v. 100, n. 9, p. 1740-1747, 2009.

SHANAZBANU; SHASHIDARA, S.; BABU, V. L. A.; DHANAPAL, R. Isolation of withaferin A from *Withania somnifera* Dun leaves and its antibacterial activity. **Asian J. Chem.**, v. 18, n. 2, p. 1243-1247, 2006.

SHEVCHENKO, A.; WILM M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometry sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SHOHAT, B.; GITTER, S.; ABRAHAM, A.; LAVIE, D. Antitumor activity of withaferin A (NSC-101088). **Cancer Chemother Rep.**, v. 51, p. 271-276, 1967.

SHOHAT, B.; GITTER, S.; LAVIE, D. Effect of withaferin A on Ehrlich ascites tumor cells--cytological observations. **Int. J. Cancer**, v. 5, p. 244-252, 1970.

SHOHAT, B.; JOSHUA, H. Effect of withaferin A on ehrlich ascites tumor cells. II. Target tumor cell destruction in vivo by immune activation. **Int. J. Cancer**, v. 8, p. 487-496, 1971.

SOARES, M. B.; BRUSTOLIM, D.; SANTOS, L. A.; BELLINTANI, M. C.; PAIVA, F. P.; RIBEIRO, Y. M.; TOMASSINI, T. C.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **Int. Immunopharmacol.**, v. 6, n. 3, p. 408-114, 2006.

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, S.; GOPAL-SRIVASTAVA, R. Biomarkers in cancer screening: a public health perspective. **J. Nutri.**, v. 132, n. 8, p. 2471-2475, 2002.

STAMPS, A. C.; DAVIES, S. C.; BURMAN, J.; O'HARE, M. J. Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. **Int. J. Cancer**, v. 57, n. 6, p. 865-874, 1994.

STAN, S. D.; ZENG, Y.; SINGH, S. V. Ayurvedic Medicine Constituent Withaferin A Causes G2 and M Phase Cell Cycle Arrest in Human Breast Cancer Cells. **Nutr. Cancer**, v. 60, p. 51-60, 2008.

SU, B. N.; MISICO, R. I.; PARK, E. J.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Isolation and characterization of bioactive principles of the leaves and stems of *Physalis philadelphica*. **Tetrahedron**, v. 58, p. 3453-3466, 2002.

TAN, G.; GYLLENHAAL, C.; SOEJARTO, D. D. Biodiversity as a Source of Anticancer Drugs Curr. **Drug Targets**, v. 7, p. 265-277, 2006.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1456-1462, 1995.

TOMASSINI, T. C. B.; BARBI, N. S.; RIBEIRO, I. M.; XAVIER, D. C. D. Gênero *Physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. **Quím. Nova**, v. 23, n. 1, p. 47-57, 2000.

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

VERAS, M. L.; BEZERRA, M. Z. B.; LEMOS, T. L. G.; UCHOA, D. E.; BRAZ-FILHO, R.; CHAI, H.; CORDELL, G. A.; PESSOA, O. D. L. Cytotoxic withaphysalins from leaves of *Acnistus arborescens*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 710-713, 2004a.

VIEIRA, N. C.; ESPÍNDOLA, L. S.; SANTANA, J. M.; VERAS, M. L.; PESSOA, O. D.; PINHEIRO, S. M.; DE ARAÚJO, R. M.; LIMA, M. A.; SILVEIRA, E. R. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, n. 4, p. 1676-1682, 2008.

VINEIS, P.; SCHATZKIN, A.; POTTER, J. D. Models of carcinogenesis: an overview. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 10, p. 1703-1709, 2010.

WEINBERG, R.A. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WELLS, A.; BISHOP, J. M.; HELMESTE, D. Amplified gene for the epidermal growth factor receptor in a human glioblastoma cell line encodes an enzymatically inactive protein. **Mol. Cell Biol.**, v. 8, n. 10, p. 4561-4565, 1988.

WUBE, A. A.; WENZIG, E. M.; GIBBONS, E.; ASRES, K.; BAUER, R.; BUCAR, F. Constituents of the stem bark of *Discopodium penninervium* and their LTB<sub>4</sub> and COX-1 and -2 inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 69, p. 982-987, 2008.

YANG, H.; SHI, G.; DOU, Q. P. The tumor proteasome is a primary target for the natural anticancer compound Withaferin A isolated from "Indian winter cherry". **Mol. Pharmacol.**, v. 71, n. 2, p. 426-437, 2007.

YU, Y.; HAMZA, A.; ZHANG, T.; GU, M.; ZOU, P.; NEWMAN, B.; LI, Y.; GUNATILAKA, A. A.; ZHAN, C. G.; SUN, D. Withaferin A targets heat shock protein 90 in pancreatic cancer cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 79, n. 4, p. 542-551, 2010.

ZHANG, X.; MUKERJI, R.; SMADI, A. K.; COHEN, M. S. Down-regulation of estrogen receptor-alpha and rearranged during transfection tyrosine kinase is associated with Withaferin A-induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 11, p. 84, 2011.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S.C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, 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.

***Anexos***

**ANEXO A – LISTA DOS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS**

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2

Agitador de tubo, Donner AD 8850

Banho-maria, DELTA Modelo 105Di

Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212

Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403

Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin

Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte mini

Deonizador de água Milli-Q, Milipore

Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter

Fluxo laminar, VECO

Incubadora de células, (CO<sub>2</sub> Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow

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

Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070

Microondas, Panasonic

Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot

Microscópio de fluorescência, Olympus

Micrótomo, SLEE Mainz

pHmetro, Micronal B474

Pipetas automáticas, Gilson

Sistema de Eletroforese Horizontal mini Submarine, Amersham Biosciences

Sistema de Fotodocumentação, Kodak

## ANEXO B – LISTA DAS SOLUÇÕES, REAGENTES E FÁRMACOS UTILIZADOS

Ácido Acético	-	Vetec
Ácido Clorídrico	-	Vetec
Álcool Etílico	70 %	Vetec
Agarose 1 %	0,5 g de agarose Água deionizada q. s. p. 50 mL	FMC - Bioproducts
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®
Alamar Blue	0,3 mg/mL	Sigma®
Anticorpo anti-BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU BSA 5 % q.s.p. 500 µL de solução	Sigma® Dako
Anticorpo biotinizado anti- imunoglobulina de camundongo	1 µL de anticorpo anti-imunoglobulina BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução	Sigma®
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® -
BrdU 10mM	-	Sigma®
Brometo de Etídio 100 µg/mL	1mg 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)	5 µL de DAB	Immunotech©
	1 mL de Tris-HCl (Tris 0,05M) pH= 7,6	Proquímios
	2 µL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Proquímios
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	Vetec®
Doxorrubicina – fornecida pelo Instituto do Câncer do Ceará – ICC	2,5 mg/mL	Zodiac®
EDTA	-	Qeel
Eosina 0,5%	0,5 g de Eosina	Doles©
	80 mL de Álcool etílico	Vetec
	0,5 mL de Ácido acético	Vetec
	20 mL de H <sub>2</sub> O	-
Eosina-Azul de Metileno (May-Grunwald)	0,2 g Metanol q.s.p. 100 mL de solução	Reagen
Estreptavidina – peroxidase	1 µL de Estreptavidina – peroxidase	Sigma®
	BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução	Dako®
Ficoll	-	Sigma®
Fitohemaglutinina	-	Sigma®
Formaldeído 10 %	100 mL de formaldeído	Dinâmica®
	H <sub>2</sub> O q. s. p. 1 L	
Giemsa	-	Bioclin

	0,5 g de Hematoxilina	Doles®
	10 mL de Glicerina	Labsynth®
Hematoxilina 0,1%	25 g de Sulfato de alumínio	Labsynth®
	0,1 g de Iodeto de potássio	Labsynth®
	H <sub>2</sub> O q.s.p. 500 mL de solução	-
Hidróxido de Sódio (NaOH)	-	Vetec®
	1 mg de iodeto de propídeo	Boehringer©
Iodeto de propídeo 50 µg/mL	PBS q.s.p. 50 mL	
	1 g de laranja de acridina (100 µg/mL)	Fluka®
Laranja de Acridina	H <sub>2</sub> O q.s.p. 10 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	Cultilab®
Meio de cultura de células RPMI 1640		
	20 mg de MTT	Sigma®
MTT	PBS q.s.p. 100 mL de solução	-
N-Lauroylsarcosine	-	Sigma®
	Penicilina 10.000 U.I./mL	Cultilab®
Penicilina – estreptomicina	Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab®
	Cloreto de Sódio = 0,600g	
	Cloreto de Potássio = 0,030g	Laboratórios
Ringer-lactato	Cloreto de Cálcio 2H <sub>2</sub> O = 0,020g	Biosintética®
	Lactato de Sódio = 0,30g	

	Água q. s. p. 100 mL	
Sulfato de Gentamicina	-	Gentamicin Novafarma®
Solução de Eletroforese	EDTA 1mM, NaOH 300 mM, pH > 13	-
Solução de Lise	NaCl 2,5M, EDTA 100mM Tris 10mM, N-Lauroyl sarcosine 1% pH = 10, Triton X-100 1 %, DMSO 10 %	-
Solução de Neutralização	Tris 0,4 M, pH = 7,5	
Solução desnaturante (para análise de incorporação de BrdU)	Formamida 70 % 2x SSC (pH entre 6,5 e 7,5 a 70 °C)	Vetec®
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 1 L de solução	Labsynth® Reagen® -
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Citrato de sódio 0,15 M H <sub>2</sub> O	-
Tampão de corrida 50 X (TAE)	242 g de TRIS 57,1 mL de ácido acético glacial 100 mL de EDTA 0,5 M	-

Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio	Labsynth®
	2,14 g de NaHPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Labsynth®
	0,276 g de NaHPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Labsynth®
	H <sub>2</sub> O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	-
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M	Labsynth®
	Tris 0,5 M (pH= 7,6)	Proquímios®
	H <sub>2</sub> O	-
Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5 %	Cultilab®
	0,125 g de EDTA	Proquímios®
	450 mL de PBS	-
Triton X -100	-	Isofar
Xilol 10 %	100 mL de formaldeído	Dinâmica®
	H <sub>2</sub> O q. s. p. 1 L	
Vitafisalina O	-	-
Vitafisalina F	-	-
Vitafisalina M	-	-
Vitafisalina N	-	-
Vitafisalina (17 <i>S</i> ,20 <i>R</i> ,22 <i>R</i> )- 5β,6β:18,20-2-diepóxi-4β,18- diidróxi-1-oxovita-3.24-enolido	-	-
5- Fluorouracil	2,5 mg/1 mL	ICN Farmacêutica®