



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

**HELLEBRIGENINA, UM BUFODIENOLÍDEO COM POTENCIAL AÇÃO
COMPATÍVEL DE INIBIDOR CATALÍTICO DA TOPOISOMERASE II**

BRUNO MARQUES SOARES

FORTALEZA
2013

BRUNO MARQUES SOARES

**HELLEBRIGENINA, UM BUFODIENOLÍDEO COM POTENCIAL AÇÃO
COMPATÍVEL DE INIBIDOR CATALÍTICO DA TOPOISOMERASE II**

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

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

FORTALEZA
2013

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

S652h

Soares, Bruno Marques.

Hellebrigenina, um bufodienolídeo com potencial ação compatível de inibidor catalítico da topoisomerase II. / Bruno Marques Soares. – 2013.

85 f.: il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

1. Apoptose. 2. Leucemia. 3. Dano ao DNA. 4. DNA Topoisomerase Tipo II. I. Título.

CDD 616.99419

BRUNO MARQUES SOARES

**HELLEBRIGENINA, UM BUFODIENOLÍDEO COM POTENCIAL AÇÃO
COMPATÍVEL DE INIBIDOR CATALÍTICO DA TOPOISOMERASE II**

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

Aprovada em: 14/03/2013

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Jairo Diniz Filho
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
Universidade Federal do Ceará

*O começo de todas as ciências é o espanto
das coisas serem o que são.*

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

À **Profª Claudia do Ó Pessoa** por ter me aceitado como orientando desde a graduação, pelo exemplo que é como pessoa, professora e pesquisadora, pelas oportunidades que surgem a todo momento, pelos eventos e também pelos momentos de descontração.

À **Profª Letícia Vêras Costa-Lotufu** pelo exemplo de pesquisadora e pela simpatia contagiante.

Ao **Prof. Manoel Odorico de Moraes**, por ter implementado e pelo contínuo aperfeiçoamento do Laboratório de Oncologia Experimental sem o qual esse trabalho não poderia ter sido feito.

Ao **Prof. Jairo Diniz Filho** pelos ensinamentos dos experimentos *in silico* (docking) que ainda continuarão eu espero e por aceitar participar dessa banca.

Ao **Prof. Vietla Satyanarayana Rao** por aceitar participar dessa banca.

Ao **Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti** pela imensa contribuição nesse trabalho, pelos gratos ensinamentos nos ensaios, pela contribuição significativa na minha formação, como exemplo de pesquisador e também pelos momentos de descontração.

Aos queridos amigos do Laboratório de Oncologia Experimental: **Treissy Lima, Sarah Sant'anna, Alisson Rebouças, Daisy Lima, Felipe Rocha, Daniel Pascoalino, Arinice Costa, Evelyne Alves, Igor Bonfim, Assuero Meira, Danilo Damasceno, Paula Jimenez e Diego Veras**, pelos ensinamentos, paciência e os vários momentos de descontração.

Ao **Delano Marinho e Jérsia Araújo**, casal exemplo de pesquisadores, pelo ensinamento, paciência e ajudas sempre que eu precisei. À **Marcilia Costa** exemplo de determinação, disciplina e pesquisadora, pelos momentos em nossa viagem recente e nossas semanas no laboratório que sempre começam com a frase: “Essa semana vai ser uma loucura!”

As “lindas” **Aline Sbardelotto, Gabriella Vieira, Patrícia Marçal e Paula Abreu** são exemplos de mulheres, amigas e cada uma de um jeito diferente é motivo de admiração por mim. Amo vocês!

Aos amigos da Pós-Graduação em Farmacologia: **Synara Lopes, Talita Moraes, Danielle Fosquetti e Sabrina Oliveira**, pelos nossos momentos pré e pós aulas, congressos e saídas.

Agradecimentos mais que especiais as técnicas: **Silvana França, Erivanda França, Rogéria Montenegro** que sem elas esse trabalho não existiria. E também, às secretárias **Sheyla Prado e Adelânia Roque** pela sempre prontidão em ajudar.

As secretárias da pós **Aura Rhannes e Márcia Borges** pela prontidão sempre que precisei de ajuda.

Ao **Eudmar Marcolino** pelos ótimos momentos que temos passados juntos, pelo companheirismo, pela paciência enquanto escrevia a dissertação, pela ajuda nas correções e formatação também. Te amo muito!

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

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

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

RESUMO

Os bufodienolídeos são esteróides cardioativos de 24 carbonos, isolados originalmente de um extrato de pele de sapos da família Bufonidae utilizado na medicina chinesa. Os bufodienolídeos possuem grande variedade de atividades biológicas, incluindo atividades antineoplásicas. Em relação à atividade antitumoral, os bufodienolídeos tem demonstrado inibir o crescimento de várias linhagens de células cancerígenas humanas por induzir apoptose e parada do ciclo celular. O presente estudo avaliou o potencial citotóxico e genotóxico de seis bufodienolídeos em seis linhagens tumorais humanas, três linhagens murinas normais e células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) humano. Todos os seis bufodienolídeos foram citotóxicos para todas as linhagens tumorais e CMSP com valores de IC_{50} variando entre 0,002 e 3,17 μM . Os bufodienolídeos testados não apresentaram citotoxicidade para linhagens murinas normais. Desta forma, o composto hellebrigenina foi escolhido para se determinar o mecanismo de ação envolvido. Uma sequência de experimentos *in vitro* foram realizados utilizando-se a linhagem leucêmica HL-60. As células foram tratadas em diferentes concentrações da amostra hellebrigenina (0,03, 0,06 e 0,12 μM) por 24 horas. A viabilidade das células (número de células viáveis e integridade de membrana) HL-60 avaliada por citometria de fluxo, mostrou que o número de células reduziu a partir da menor concentração (0,03 μM) testada e a porcentagem de células com membrana íntegra reduziu a partir da concentração 0,06 μM . A análise morfológica por citometria de fluxo revelou aumento de células com padrão apoptótico a partir da concentração de 0,06 μM . Já a análise do conteúdo nuclear, nos mostrou aumento de fragmentação de DNA sub-G1 indicativo de apoptose e acúmulo de células na fase G2/M a partir das concentrações de 0,03 e 0,06 μM , respectivamente. Outros testes por citometria de fluxo revelaram que houve externalização da fosfatidilserina, despolarização mitocondrial, ativação da caspase iniciadora 8 e consequente ativação das caspases efetoras 3 e 7. Estes dados indicam um mecanismo citotóxico por indução de mais de uma via apoptótica. Hellebrigenina não foi capaz de causar danos ao DNA de HL-60 e de CMSP e nem o surgimento de aberrações cromossômicas em CMSP. Por meio dos estudos de docking molecular foi possível prever a ligação entre hellebrigenina e topoisomeraseII α humana, resultado compatível com a possível inibição dessa enzima. De forma geral, os resultados apontam o potencial citotóxico do bufodienolídeo hellebrigenina.

Palavras-chave: apoptose, leucemia, danos ao DNA, DNA Topoisomerase tipo II

ABSTRACT

Bufodienolides are cardioactive steroids of 24 carbons, originally isolated from a frog's skin extract of the family Bufonidae used in Chinese medicine. Bufodienolides shows many biological activities, including anticancer activities. Related to antitumor activity, the bufodienolides has been shown to inhibit the growth of several human cancer cell lines by inducing apoptosis and cell cycle arrest. This study evaluated the potential cytotoxicity and genotoxicity of six bufodienolides, in six human tumor cell lines, three normal murine lineages and PBMC (peripheral blood mononuclear cells). All six bufodienolides were cytotoxic to all cell lines and tumor PBMC with IC50 values ranging from 0.002 to 3.17 μM . Bufodienolides showed no cytotoxicity for normal murine strains. Thus, the compound hellebrigenin was chosen to determine the action mechanism involved, a sequence of *in vitro* experiments were performed using HL-60 leukemia cell line. Cells were treated at different concentrations of hellebrigenin (0.03, 0.06 and 0.12 μM) for 24 hours. Cell viability (viable cell number and membrane integrity) HL-60 assessed by flow cytometry showed that the number of cells decreased from the lower concentration (0.03 μM) tested and the percentage of cells with reduced membrane integrity from 0.06 μM concentration. Morphological analysis by flow cytometry revealed increased apoptotic cells starting at concentrations of 0.06 μM . The analysis of nuclear content, showed an increase in DNA fragmentation indicative of sub-G1 apoptosis and accumulation of cells in G2 / M phase from the concentrations of 0.03 and 0.06 μM , respectively. Other tests by flow cytometry revealed that there was an externalization of phosphatidylserine, mitochondrial depolarization, activation of caspase 8 and initiating subsequent activation of effector caspases 3 and 7. These data indicate a cytotoxic mechanism induced by over an apoptotic pathway. Hellebrigenin was not able to cause DNA damage in HL-60 and PBMC nor the emergence of chromosomal aberrations in PBMC. Through the studies of molecular docking was possible to predict the connection between hellebrigenina and human topoisomeraseII α , showing a result that is compatible with a possible inhibition of this enzyme. Overall, the results indicate the potential cytotoxicity of hellebrigenin.

Keywords: apoptosis, leukemia, DNA damage, DNA Topoisomerase type II

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos diferentes tipos de morte celular	20
Tabela 2. Pesquisa de patentes por palavras-chave no banco de dados Espacenet.	27
Tabela 3. Linhagens utilizadas no ensaio de citotoxicidade in vitro por meio do teste do MTT.	35
Tabela 4. Atividade citotóxica de bufodienolídeos (BUF-01, BUF-03, BUF-05, BUF-06, BUF-08 e BUF-011) extraídos de <i>Rhinella schneideri</i> em linhagens celulares de câncer e normais. A doxorrubicina foi usada como controle positivo.	49
Tabela 5. Efeito do composto hellebrigenina sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HL- 60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.	54
Tabela 6. Efeito da amostra hellebrigenina sobre a proliferação e indução de aberrações cromossômicas em CMSP humanas após 24 horas de incubação.	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os marcos do câncer (adaptado de LUO <i>et al.</i> 2009).....	16
Figura 2. Os tipos mais incidentes de Câncer no Brasil (INCA, 2011).....	17
Figura 3. Ciclo celular (FISHER, 2004).....	18
Figura 4. . Estrutura química da bufalina, o primeiro bufodienólídeo isolado.....	24
Figura 5. <i>Rhinella scheneideri</i> (retirado de http://calphotos.berkeley.edu).....	26
Figura 6. Inventores com mais de quatro patentes	28
Figura 7. Número de patentes por depositantes.....	29
Figura 8. Número de patentes depositadas por país.	29
Figura 9. Evolução anual do depósito de patentes.....	30
Figura 10. Tipos de cometa e classificação por categoria de dano: 0 – sem dano (cauda < 5%); 1 – baixo nível de dano (5 – 20%); 2 – médio nível de dano (20 – 40%); 3 – alto nível de dano (40 – 95%) e 4 – dano máximo (>95%).	44
Figura 11. Efeito do composto hellebrigenina sobre a concentração de células na linhagem HL-60, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.	51
Figura 12. Efeito do composto hellebrigenina sobre a integridade de membrana de células da linhagem HL-60, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.....	52
Figura 13. Efeito do bufodienólídeo hellebrigenina sobre a morfologia de células HL-60 determinado por citometria de fluxo.	53
Figura 14. Efeito do composto hellebrigenina sobre a externalização da fosfatidilserina em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação.	55
Figura 15. Efeito do composto hellebrigenina sobre a externalização da fosfatidilserina em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação..	56
Figura 16. Efeito da hellebrigenina sobre o potencial transmembrânico em células HL-60 determinado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123, após 24 horas de incubação. .	57
Figura 17.: Efeito do composto hellebrigenina sobre a ativação de caspase iniciadora 8 (A) e caspase efetora 3 e 7 (B) em células de HL-60 determinado por citometria de fluxo utilizando FLICA e FAM (verde), após 24 horas de incubação.....	59

Figura 18. Efeito da amostra hellebrigenina sobre a indução de dano ao DNA em células leucêmicas HL-60 (A) e CMSP (B) após 24 horas de incubação.	60
Figura 19. Ligação entre porção de topoisomerase II e hellebrigenina.	64

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

®	Marca registrada
ANOVA	Analysys of Variance (Análise de Variância)
CASPASE	<i>Cysteine-dependent aspartate-diredted proteases</i>
CMSP	Células mononucleadas do sangue periférico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HTS	High Troughput Screening
IC50	Concentração Inibitória Média
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
PBS	Phosfate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RPMI	Rosswell Parrk Memorial Institute Medium
TBS	Tris Buffer Solution (Tampão Tris)
Topo I	Topoisomerase I
Topo II	Topoisomerase II
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Câncer	15
1.2	Produtos Naturais	22
1.3	Metabólitos secundários de anfíbios	22
1.4	Bufodienolídeos	23
1.5	<i>Rhinella schneideri</i>	25
1.6	PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA	26
2	OBJETIVOS	31
2.1	Geral	31
2.2	Específicos	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Material Utilizado	32
3.2	Metodologia Experimental	34
3.2.1	<i>Isolamento e identificação dos Bufodienolídeos</i>	34
3.2.2	<i>Avaliação da Atividade Citotóxica in vitro</i>	35
3.2.2.3	<i>Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP)</i>	36
3.2.2.4	<i>Teste do MTT</i>	36
3.2.3	<i>Estudo do Mecanismo de Ação</i>	37
3.2.3.1	<i>Citometria de Fluxo</i>	38
3.2.3.2	<i>Teste do Cometa</i>	42
3.2.3.4	<i>Análise de Docking Molecular</i>	46
4	RESULTADOS	48
4.1	Avaliação da atividade citotóxica dos bufodienolídeos	48
4.2	Avaliação da viabilidade e morfologia de células HL-60 após tratamento com o composto hellebrigenina	51
4.3	Avaliação do efeito do composto hellebrigenina sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HL-60	53
4.4	Determinação da externalização da fosfatidilserina	54
4.5	Efeito da amostra hellebrigenina sobre despolarização mitocondrial em células de HL-60.	56
4.6	Efeitos da amostra hellebrigenina sobre a ativação da caspase iniciadora 8 e caspases efetoras 3 e 7 em células de HL-60.	57

4.7	Avaliação do potencial genotóxico em células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) e células leucêmicas HL-60.....	59
4.8	Estudo de Docking Molecular	64
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é um termo utilizado genericamente para caracterizar um conjunto de mais de 100 doenças que incluem tumores malignos de variadas localizações, formado por células de crescimento desordenado que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. (INCA, 2011)

O primeiro indício histórico de câncer remete a uma descrição semelhante a essa doença em papiros do Antigo Egito de cerca 1.600 anos a.C. No entanto, a denominação dessa doença com o termo câncer é creditada ao médico grego Hipócrates (460-377 a.C.), considerado o pai da medicina. Já em 1761, Giovanni Morgagni realizava autopsias em seus pacientes com o intuito de encontrar indícios patológicos de doenças, sendo considerado o início da oncologia, o estudo do câncer. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010).

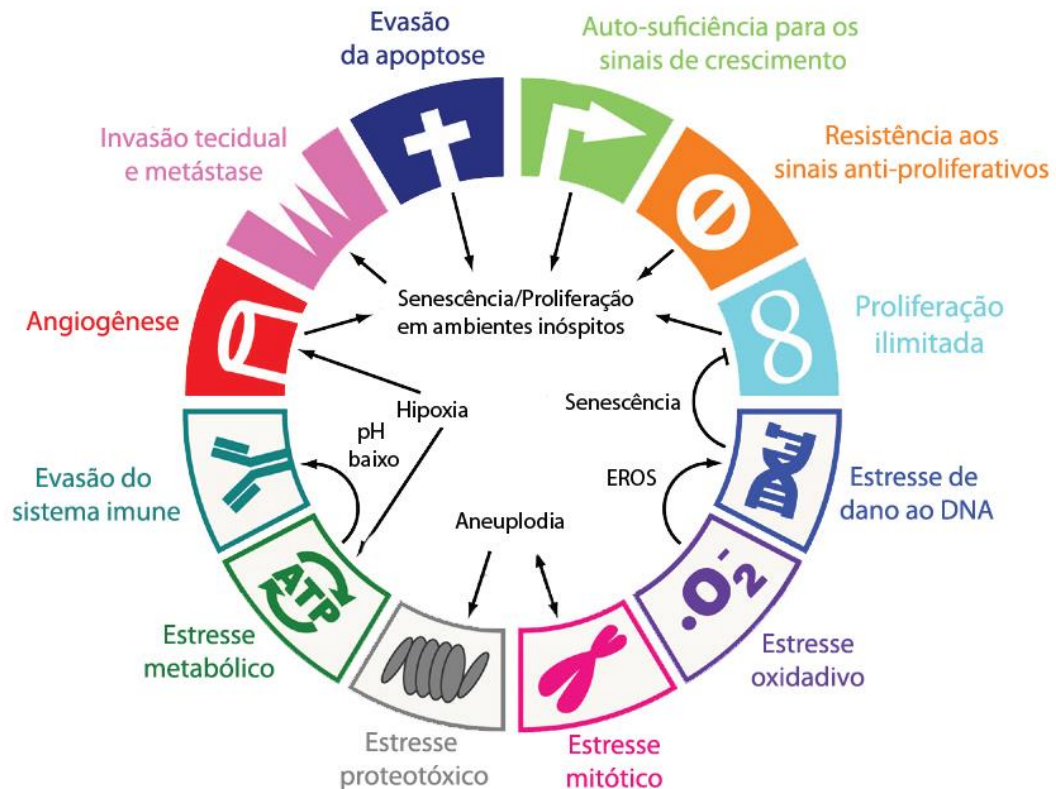
O uso de microscópios no século XIX possibilitou um salto na oncologia científica. Rudolf Virchow, considerado o fundador da patologia celular, possibilitou as bases para o estudo moderno patológico do câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010).

Atualmente, a carcinogênese é considerada como um processo de várias etapas em que ocorrem diversas alterações genéticas promovendo alterações progressivas em células normais até sua transformação em célula maligna (HANANAH & WEINBERG, 2000).

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

As últimas duas décadas presenciaram um grande avanço no conhecimento da patogênese do câncer. Entre as características de um tumor maligno podemos citar a autossuficiência da sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade a inibidores do crescimento, inibição da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese, poder de invasão celular e capacidade de metastatizar-se (HANAHAN & WEINGER, 2000; LUO *et al.*, 2009). Além dessas características clássicas, Kroemer e Pouyssegur propuseram a adição da evasão do sistema imune, bem como Luo e colaboradores adicionaram os estresses metabólicos, proteotóxicos, mitóticos, oxidativo e de danos ao DNA (**Figura 1**) (KROEMER & POUYSSEGUR, 2008; LUO *et al.*, 2009).

Figura 1. Os marcos do câncer.



Adaptado de LUO *et al.* 2009

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

Existem três tipos clássicos de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores com eficácia, se não

houver metástase. A radioterapia (geralmente raios gama, radioisótopos como cobalto-60 e raios-X) é usada comumente em conjunto com a cirurgia, como incremento da eficiência do tratamento. Mesmo isoladamente, a radioterapia pode diminuir tumores grandes, diminuir a recorrência e a chance de metástase, sendo uma metodologia antineoplásica muito usada (MURAD & KATZ, 1996).

A quimioterapia tem como objetivo primário destruir as células neoplásicas, preservando as normais. No entanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Porém, o corpo recupera-se desses inconvenientes após o tratamento, e o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável (KATZUNG, 1998; MURAD & KATZ, 1996).

Atualmente, o câncer é a segunda doença com maior número de óbitos no mundo, não ultrapassando apenas as doenças cardiovasculares. Estima-se que por ano ocorram cerca de 12 milhões de novos casos e sete milhões de mortes pela doença (WHO, 2009).

No Brasil, as neoplasias malignas também são a segunda maior causa de morte na população. Para o ano de 2013, estima-se 518.510 novos casos. Deste total, são esperados 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para sexo feminino. O câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero (**Figura 2**) (INCA, 2011).

Figura 2. Os tipos mais incidentes de Câncer no Brasil (INCA, 2011)

Localização primária					Localização primária		
	casos novos	percentual				casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

INCA, 2011

Dessa forma, fica clara a importância do contínuo investimento para o desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer como: na promoção da saúde, na detecção precoce, na assistência aos pacientes, na vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social, na pesquisa e na gestão do Sistema Único de Saúde (SUS) (INCA, 2011).

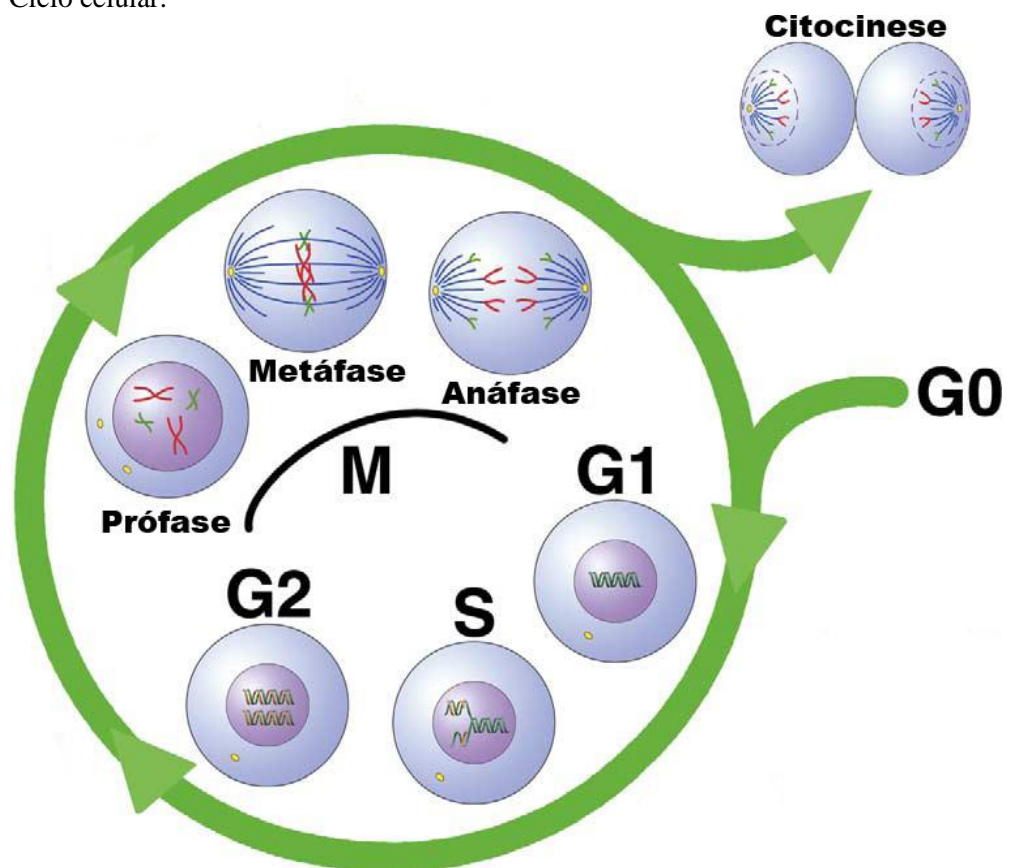
1.1.1 Ciclo Celular e câncer

Células cancerígenas possuem defeitos em seus ciclos regulatórios que controlam a proliferação celular normal e sua homeostase (HANANAH & WEINBERG, 2000). Desse modo, células defeituosas ou mutadas conseguem progredir pelo ciclo celular, acumulando mutações (FOSTER, 2008).

O ciclo celular é uma intrincada sequência de eventos que permitem o crescimento e duplicação da célula. Há dois tipos de genes importantes que regulam o ciclo celular, e, por conseguinte, o desenvolvimento do câncer, os oncogenes e os genes supressores de tumor (HARTWELL AND KASTAN, 1994).

O destino da célula bem como o mecanismo que interpreta os sinais de crescimento são governados pelo “relógio” do ciclo celular, decidindo se o ciclo progride ou não. Células destinadas a replicação passam para a fase G1 do ciclo onde ocorrerá a primeira parada e seguem para a fase S na qual ocorrerá a duplicação do material genético. Da fase S, a célula segue para a fase G2 onde ocorre o preparo da duplicação que por sua vez ocorre na fase M (Figura 3) (FISHER, 2004).

Figura 3. Ciclo celular.



Ao passar pela mitose, as células filhas entram em G1 para completar o ciclo mais uma vez. Durante tal fase, ocorre intensa estimulação e crescimento, ou então a célula pode temporariamente não seguir o ciclo sendo chamada de fase G0. Após passar o ponto de restrição, coordenando pelo gene retinoblastoma (Rb) no final de G1, a célula entrará então na fase S na qual ocorre intensa síntese de DNA. Esta fase necessita se desenvolver rapidamente uma vez que o DNA se torna muito sensível a dano, quando as bases de ácidos nucléicos ficam expostas e seus duplos se separam. (WEINBERG, 2007)

Nos chamados checkpoints acontece o controle dos eventos do ciclo celular, controlados por cinases dependentes de ciclina (cdk) que são expressas durante todas as fases do ciclo. Cdk's são constituídas por uma ciclina (proteína estrutural) e uma cinase (enzima). O controle do ciclo se dá por meio de proteínas inibidoras do ciclo celular (cki). As proteínas que medeiam o controle na fase G1-S se mostram na sua forma inativa na maioria dos cânceres onde alterações nos checkpoints de G2-M são menos comuns. (MALUMBRES & BARBACID, 2009)

Durante a fase G2, a reorganização dos processos de síntese celular, que incluem a regulação de danos não-reparados ao DNA, é monitorada pelos "checkpoints" de G2. Os checkpoints da fase G2 requerem os sistemas de ciclina-cdk-cdi para eliminar células danificadas que conseguiram passar da fase G2. Durante a fase M, acontece o alinhamento das cromátides e posterior divisão em duas células filhas. O processo de mitose sofre parada caso os centrômeros não estiverem junto aos microtúbulos e as ckd's (cdc2 e ciclina B) possuem função importante nesse evento (FOSTER, 2008; WEINBERG, 2007).

1.1.2 Morte Celular

Tem sido descrito na literatura quatro tipos de morte celular: apoptose, autofagia, necrose e catástrofe mitótica. Outro tipo de morte também é levado em conta na terapia do câncer, a senescência. Tais tipos de morte são baseados em distintas características bioquímicas e morfológicas (**Tabela 1**). Dois desses processos, apoptose e autofagia, são considerados "programados" devido seu intenso controle genético. A morte celular programada resulta na desintegração dos componentes celulares e sua fagocitose pelas células vizinhas. A necrose e a catástrofe mitóticas são consideradas respostas a uma grande injúria na célula. No entanto, novas descobertas sugerem que tais tipos de morte podem também ser t

controlados geneticamente. Senescência é um processo essencial de envelhecimento devido a diminuição dos telômeros e ativação das vias de supressão de tumor (RICCI E ZONG, 2006).

Tabela 1 - Características dos diferentes tipos de morte celular.

Tipos de morte celular	Mudanças morfológicas			Características bioquímicas
	Núcleo	Membrana celular	Citoplasma	
Apoptose	Condensação da cromatina; Fragmentação internucleossomal do DNA	Íntegra; Formação de prolongamentos (Blebbs)	Fragmentação (formação de corpos apoptóticos)	Dependente de caspase
Autofagia	Condensação parcial da cromatina; Sem formação de DNA ladder	Formação de prolongamentos (Blebbs)	↑ número de vesículas autofágicas	Independente de caspase; ↑ da atividade lisossomal
Catástrofe mitótica	Múltiplos micronúcleos; Fragmentação nuclear	-	-	Independente de caspase em estágio inicial; Ativação anormal de CDK1/ciclina B
Necrose	Degradação maciça e randômica do DNA nuclear	Inchaço e ruptura	↑ de vacuolização; Degradação de organelas; Inchaço mitocondrial	-
Senescência	Estrutura heterocromática distinta (Focos heterocromáticos associados a senescência)	-	Achatamento; ↑ granulosidade	Atividade SA-β-gal

CDK1, quinase 1 dependente de ciclina; SA-β-gal, β-galactosidase associada a senescência.
Fonte: adaptada de Okada e Mak, 2004

Apoptose é um tipo de morte celular altamente programada e organizada a nível molecular e tem papel importante na homeostase celular (KIM, 2005). Entre as características morfológicas de apoptose podemos citar desorganização da membrana celular (formação de

“blebbins”), redução de volume, condensação da cromatina e fragmentação nucleossomal. Em condições normais, células em apoptose são reconhecidas pelos macrófagos ou células vizinhas que as fagocitam. (RICCI & ZONG, 2006).

Existem duas vias moleculares distintas que levam a uma morte apoptótica: a via intrínseca, mediada por mitocôndria, e a via extrínseca, chamada de via extracelular. A via intrínseca é ativada em resposta a sinais de estresse intracelular como dano ao DNA e níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROS), também por infecção viral e ativação de oncogenes. Já a via extrínseca é acionada pela ligação de algum composto extracelular a um receptor específico na membrana da célula. Ambas as vias ativam enzimas proteolíticas chamadas de caspases que conseguem rapidamente desestabilizar as organelas e, desse modo, a arquitetura celular (RICCI & ZONG, 2006).

Na via intrínseca, quando os sinais de morte alcançam a mitocôndria ocorre o colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi$), bem como uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Ao mesmo tempo, a água do espaço entre as membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e consequentemente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma. Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a indução do $\Delta\Psi$ e TPM levam à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Ocorre ainda a formação de um megaporo que contém diversas proteínas e abrange as membranas interna e externa da mitocôndria permitindo a liberação do citocromo c para o citoplasma onde participa da ativação da apoptose. Quando no citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando caspase-9 ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (HENGARTNER, 2000).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata de caspases. Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas e têm capacidade de recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3 executando a morte por apoptose (HENGARTNER, 2000).

Enquanto apoptose é altamente bem descrita e definida a nível molecular, a necrose não é tão bem definida a nível molecular e geralmente mencionada como uma forma de morte celular descontrolada e patológica. No entanto, estudos recentes sugerem que a necrose é um

evento regulado que pode estar envolvido em vários aspectos da fisiologia, desenvolvimento e patologia celular (RICCI E ZONG, 2006)

1.2 Produtos Naturais

Os produtos naturais tem sido a fonte da maioria dos compostos ativos usados na Medicina. Esta afirmação é bem fiel a realidade do cenário da descoberta de fármacos principalmente antes da era do high-throughput screening (HTS) e da pós-genômica, onde 80% das drogas eram oriundas ou inspiradas em produtos naturais. De certa forma, atualmente isso ainda é verdade uma vez que quase metade das drogas descobertas desde 1994 são baseadas em produtos naturais (HARVEY, 2008).

Historicamente, as plantas tem sido a fonte mais importante de produtos naturais e as pesquisas progrediram principalmente em duas linhas: etnofarmacologia e toxicologia. Tais estratégias produziram grande número de drogas importantes e ainda continuam a produzir novos compostos (TULP & BOHLIN, 2004 Nesse cenário, cerca 50% de novos fármacos são oriundos de plantas. (HARVEY, 2008) No entanto, tem ganhado importância aos compostos de origem animal principalmente aqueles que são venenosos e também de animais marinhos (TULP & BOHLIN, 2004).

Drogas provenientes de animais vertebrados são principalmente oriundas da pesquisa na área de fisiologia humana e patologia. Várias moléculas endógenas humanas, como os hormônios, são exemplos de compostos que são usados para o tratamento de doenças. No entanto, têm sido descobertas várias drogas de animais vertebrados e invertebrados terrestres, incluindo um inibidor da enzima conversora de angiotensinogenio (ECA) isolada do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, origem brasileira. (CHIN, 2006).

1.3 Metabólitos secundários de anfíbios

Os anfíbios estão mundialmente distribuídos e podem ser encontrados em todos os continentes, exceto na Antártica (CLARKE, 1997). A habilidade dos anfíbios de viver em ambientes bastante diferentes pode estar atribuída à evolução de várias adaptações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais. A pele de sapos possui um rico arsenal de compostos químicos que possuem papel de grande importância na defesa do animal

contra predadores. Esses animais possuem dois tipos de glândulas, a mucosa e a granular. As glândulas granulares são sítios de síntese de diversos compostos químicos que promovem proteção contra infecções de bactérias e fungos, sendo divididas em quatro categorias principais: aminas biogênicas, bufodienolídeos, alcalóides, peptídeos e proteínas. (BETTIN & GREVEN, 1986; CEVIKBAS, 1978; DALY *et al.*, 1987).

1.4 Bufodienolídeos

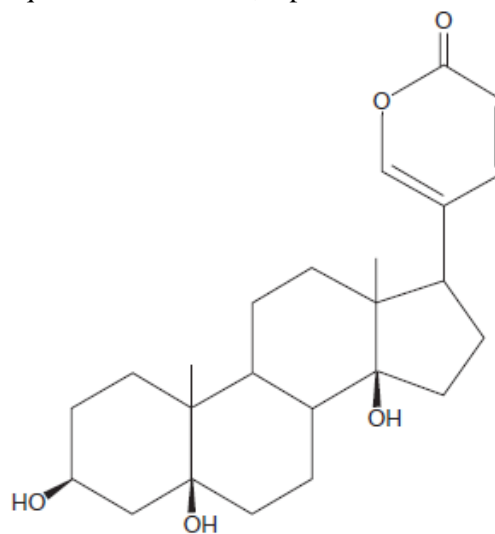
Os bufodienolídeos foram originalmente encontrados na pele de sapos da família Bufonidae, mas, depois, sua existência foi comprovada em plantas angiospermas, artrópodes e até em mamíferos (KRENN *et al.*, 1998). Muitos bufodienolídeos foram isolados de uma droga tradicional da China, o Ch'na Su que é um produto medicinal fabricado a partir de secreções da pele de sapos como *Bufo bufo gargazigans* e *Bufo melanostriatus* (NOGAWA *et al.*, 2001). São classificados, dentre os compostos de metabólitos secundários, como esteroides (TYLER *et al.*, 1988). Importantes por sua atividade como glicosídeos cardíacos (classificação dentre os esteroides), onde estimulam a força contrátil do coração por inibir a Na^+/K^+ -ATPase (BICK *et al.*, 2002), possuem ainda outras atividades biológicas como antimicrobiana, antiviral, inseticida, tóxica para gado e atividade antitumoral (STEYN & HEERDEN, 1998).

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

Em geral, os bufodienolídeos são fontes de inibição de células leucêmicas humanas (HL-60) e também inibição em linhagens de câncer de fígado tipo PLC/PRF/5 (KAMANO *et al.*, 2002). A bufalina é um dos bufodienolídeos mais abundantes e mais estudados (Figura 4). Zhang *et al.* descobriram que esse esteroide possui potente atividade em diferenciar células em algumas linhagens cancerígenas de leucemia mielóide (K562, U937, ML1 e HL-60). Esses

autores também caracterizam que o potencial de diferenciação dessas células aumenta significativamente com a adição de outras substâncias, diminuindo, inclusive, seus efeitos adversos (ZHANG *et al.* 1991, 1992). A bufalina também foi capaz de inibir proliferação de células endoteliais, a angiogênese do tumor (formação de vasos sanguíneos que irão suprir as células tumorais) e, também, afetou a profileração de células de câncer de próstata (LEE *et al.* 1997; YEH, 2003). Em experimentos *in vivo*, teve significativa atividade antitumoral com baixa toxicidade em camundongos, bem como foi capaz de induzir apoptose em células tumorais transplantadas (HAN *et al.*, 2007).

Figura 4. . Estrutura química da bufalina, o primeiro bufodienólídeo isolado.



Apoptose é um processo ativo que leva a célula à morte. Agentes que induzam apoptose em tumores específicos são considerados drogas antitumorais ideais. Tem sido demonstrado que a expressão de certos genes que estão envolvidos na transformação de células saudáveis em cancerígenas inibem a indução de apoptose (LU *et al.*, 2008). Em seu estudo, Masuda *et al.* (1995) observaram que a fragmentação de DNA causada pela bufalina está correlacionada com o declínio da expressão do gene bcl-2 gene, envolvido na indução de apoptose. Outros estudos indicam que a bufalina induz a expressão do gene Tiam1 que possui papel importante na indução da apoptose e na ativação de Rac1, p-21 e c-jun N-terminal quinase (KAWAZOE *et al.*, 1999). Em contraste ao que foi mostrado, Pastor *et al.* (2002) não observaram fragmentações de DNA em células de leucemia humana com bufalina em concentração menor do que a usada por Masuda. No entanto, células ovarianas de hamster tratadas com bufalina quando irradiadas com raios-x mostraram dramático atraso no reparo do DNA, em parte pela inibição da enzima topoisomerase II (PASTOR *et al.*, 2003). Apesar de

alguns bufodienolídeos apresentarem atividade citotóxica especificamente em linhagens de câncer, sua função nos sapos da família Bufonidae, provavelmente, está relacionada com a defesa desses animais.

1.5 *Rhinella schneideri*

O anfíbio *Rhinella schneideri* (Werner, 1984) (**Figura 5**) da família Bufonidae, descrito primeiramente com nome de *Bufo paracnemis* (A. Lutz, 1925), é nativo da América do Sul e ocorre principalmente na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. Abrange grande parte do Brasil, uma vez que ocorre do Ceará até Rio Grande do Sul. Conhecido popularmente como cururu e sapo-boi (BASTOS *et al.*, 2003; FROST, 2010; COCHRAN, 1955).

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

Figura 5. *Rhinella scheneideri*.



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

1.6 PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

A prospecção tecnológica pode ser definida como um meio sistemático de mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos futuros capazes de influenciar de forma significativa uma indústria, a economia ou a sociedade como um todo. Diferentemente das atividades de previsão clássica, que se dedicam a antecipar um futuro suposto como único, os exercícios de prospecção são construídos a partir da premissa de que são vários os futuros possíveis. Esses são tipicamente os casos em que as ações presentes alteram o futuro, como ocorre com a inovação tecnológica. Avanços tecnológicos futuros dependem de modo complexo e imprevisível de decisões alocativas tomadas no presente por um conjunto relativamente grande de agentes não conclusivos. Os exercícios de prospecção funcionam como meio de atingir dois objetivos: o primeiro é preparar os atores na indústria para aproveitar ou enfrentar oportunidades ou ameaças futuras. O segundo objetivo é desencadear um processo de construção de um futuro desejável (KUPFER & TIGRE, 2004).

Essa parte do trabalho teve como finalidade fazer o mapeamento das patentes desenvolvidas com os temas glicosídeos cardíacos e bufodienolídeos para a formulação de medicamentos, principalmente antitumorais.

A prospecção tecnológica foi desenvolvida a partir de consultas ao banco de patentes do Espacenet. A escolha pela utilização desse banco de patentes se deve ao fato de o Espacenet possuir dados de patentes mais completos de forma a desenvolver uma prospecção tecnológica mais analítica.

O estudo foi feito utilizando as palavras chaves Bufodienolide*, Bufadienolide*, Cardiac glycoside* e o código A61K. O código se refere a preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas. Foram analisadas 171 patentes em julho de 2011 (**Tabela 2**).

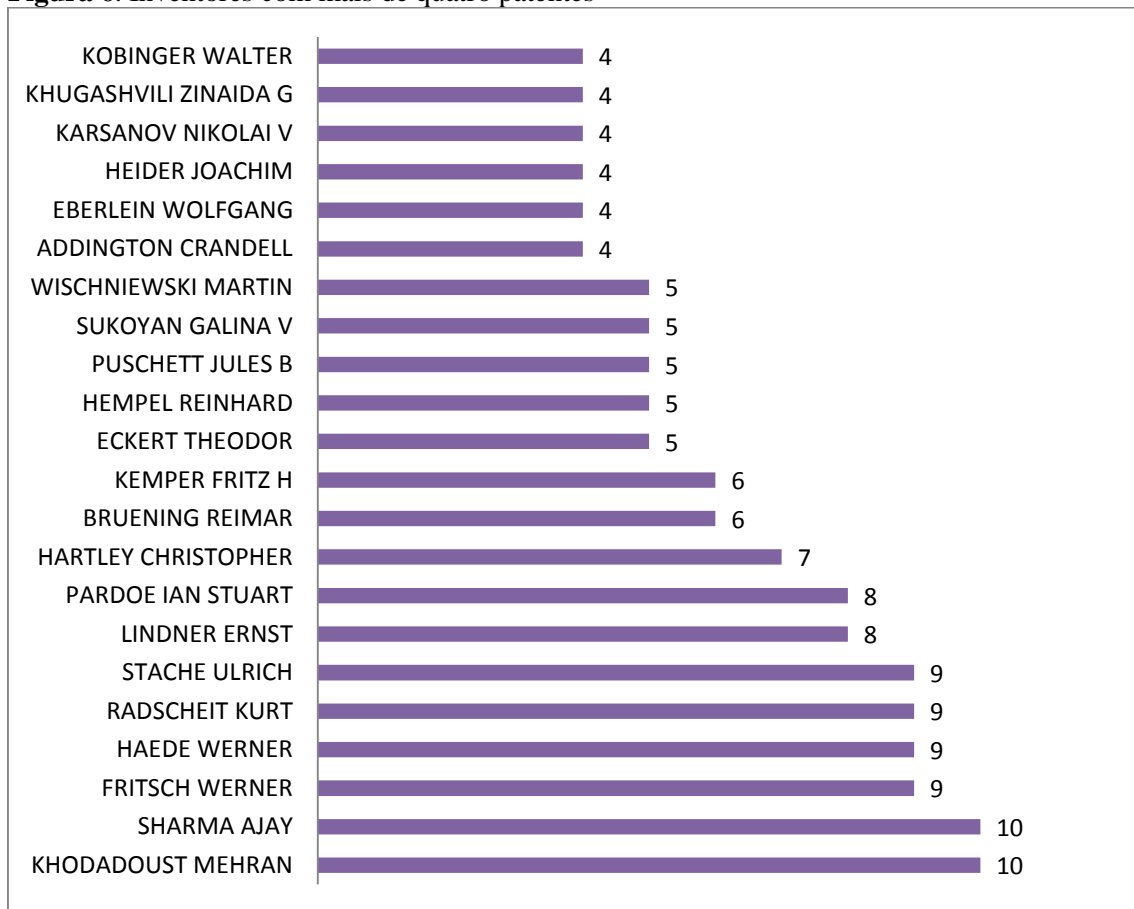
Tabela 2.

Tabela 2. Pesquisa de patentes por palavras-chave no banco de dados Espacenet.

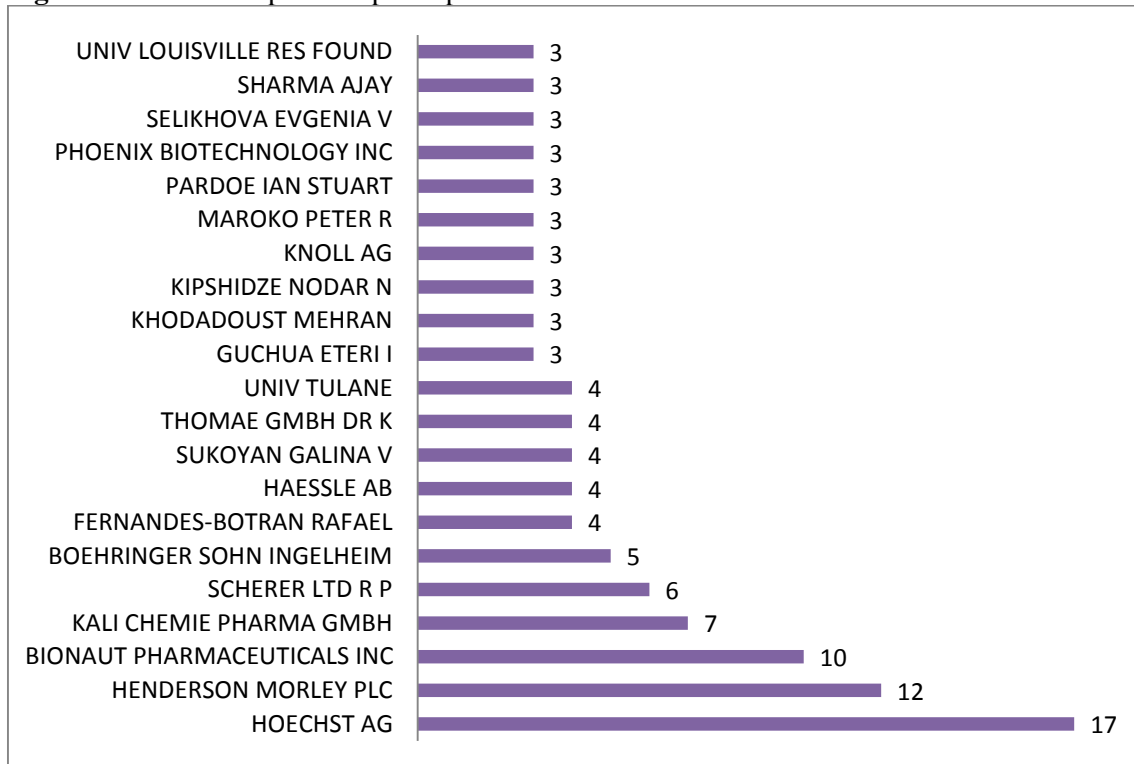
Palavras-chave	Espacenet
Bufodienolide*	78
Bufadienolide*	5
Cardiac glycoside*	211
Hellebrigenin*	5
Bufalin*	24
Bufodienolide* and cardiac glycoside*	-
Bufodienolide* or bufadienolide* or “cardiac glycoside*”	171

A partir daí iniciou-se à análise das patentes destacando-se os inventores, os depositantes, o países dos depositantes e a evolução anual do depósito de patentes.

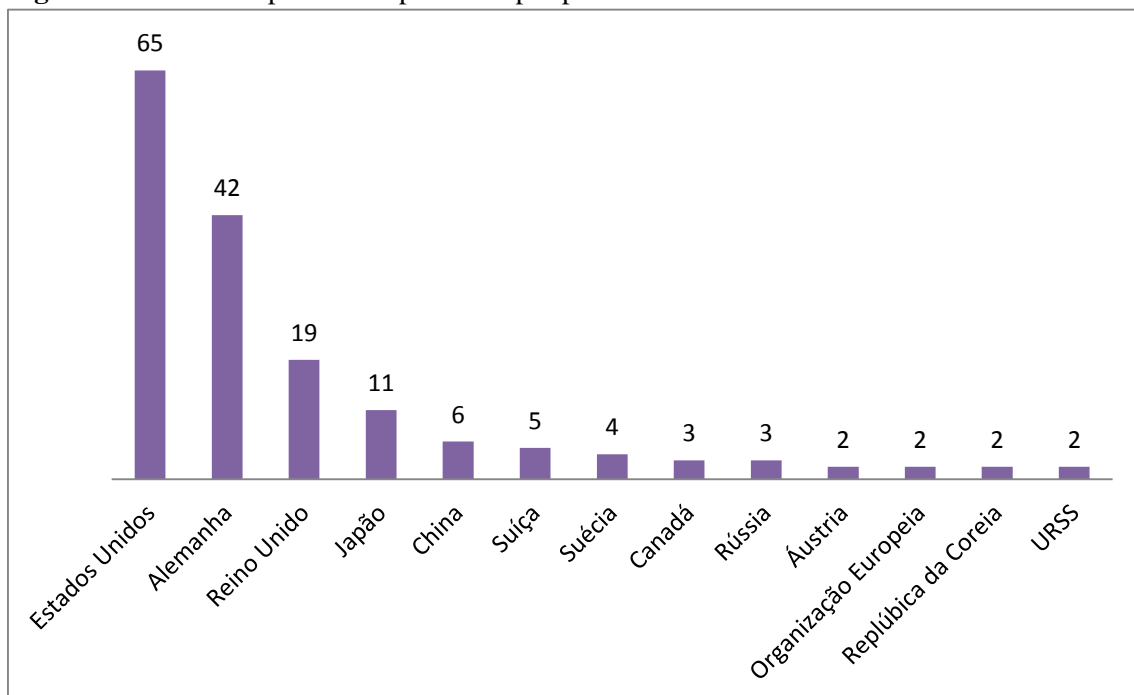
A **figura 6** indica os inventores que mais se repetem no desenvolvimento de patentes com destaque para os inventores Khodadoust Mehran e Shama Ajay, ambos com 10 patentes. No total, 197 inventores foram contabilizados.

Figura 6. Inventores com mais de quatro patentes

Em relação aos depositantes, a **figura 7** mostra os que mais se repetem com destaque para os depositantes Hoechst Ag e Henderson Mordley PLC, com 17 e 12 patentes respectivamente. Foram encontrados 128 depositantes no total.

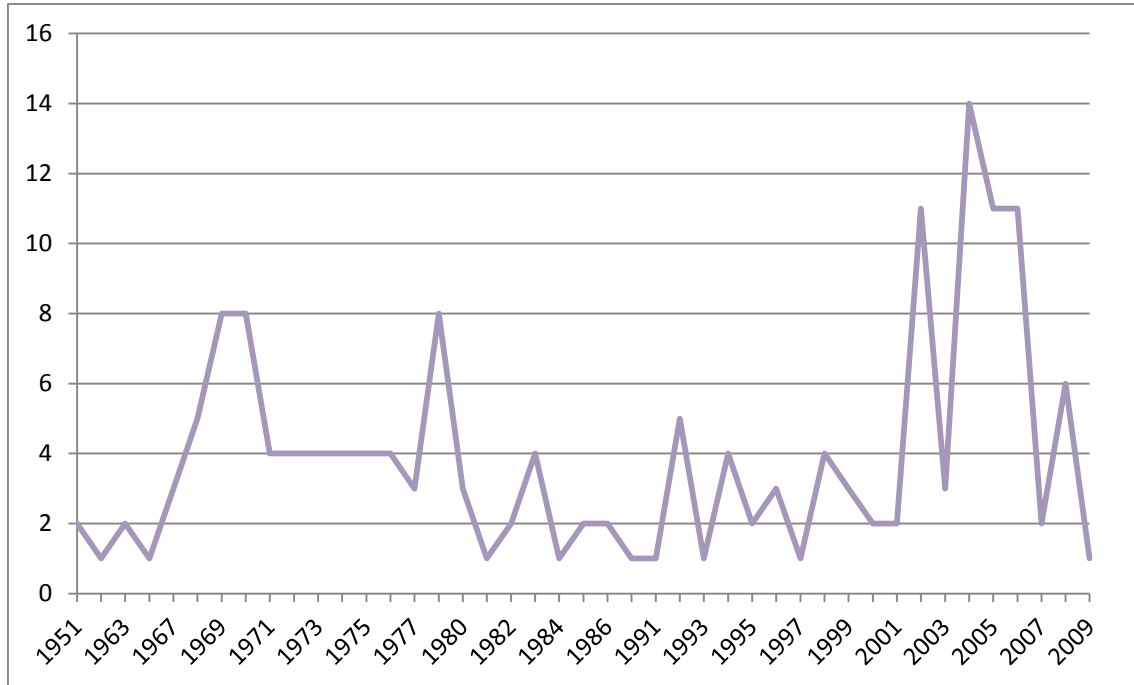
Figura 7. Número de patentes por depositantes

A **figura 8** indica os países com maior número de patentes depositadas nessa busca. Destaque para os Estados Unidos e Alemanha com maioria expressiva de patentes.

Figura 8. Número de patentes depositadas por país.

No que diz respeito a evolução anual das patentes, a **figura 9** indica aumento dos depósitos na década de 60, seguido de um declínio e posterior ápice no anos 2000.

Figura 9. Evolução anual do depósito de patentes.



Tal prospecção tecnológica com enfoque nos temas glicosídeos cardíacos e bufodienolídeos nos indica a forte presença dos Estados Unidos e Alemanha na área. O aumento do número de patentes no final da década de 80 deve estar relacionado ao uso dessa classe de compostos na medicina no alívio da insuficiência cardíaca, já o ápice no início do século XXI pode estar relacionado com a descoberta de sua atividade antitumoral.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar o potencial citotóxico e os possíveis mecanismos de ação dos bufodienolídeos: Telocinobufagina (BUF-01); Marinobufagina (BUF-02); Bufalina (BUF-05); Bufalina-3-acetato (BUF-06); Helebrigenina (BUF-08) e BUF-11 (nome ainda não identificado).

2.2 Específicos

- Avaliar a atividade citotóxica dos bufodienolídeos em células tumorais humanas, células normais murinas e em células mononucleadas isoladas do sangue periférico humano usando o ensaio do MTT;
- Avaliar os prováveis mecanismos de ação responsáveis pela citotoxicidade dos análogos com melhor potencial citotóxico, através de:
 - Técnicas de citometria de fluxo utilizando como modelos experimentais a linhagem de leucemia HL-60;
 - Análise da incorporação de corantes vitais (iodeto de propídeo) – integridade de membrana;
 - Determinar o conteúdo de DNA nuclear das células – ciclo celular;
 - Determinar o potencial transmembrânico das células;
 - Verificar a externalização da fosfatidilserina;
 - Determinar a ativação de caspase iniciadora 8 e caspases efetoras (-3 e -7).
- Avaliar o potencial genotóxico usando o Ensaio do Cometa e Ensaio de Aberrações Cromossômicas em células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP);
- Avaliar a afinidade de ligação entre bufodienolídeos e topoisomerase II através de métodos de *docking* molecular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Utilizado

Soluções, reagentes e fármacos

Ácido Acético	-	Vetec®
Ácido Clorídrico	-	Vetec®
Álcool Etílico	-	Vetec®
Agarose 1%	0,5 de agarose Água deionizada q.s.p. 50 mL	FMC- Bioproducts®
Agarose LMP 1,5%	1,5g 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®
Brometo de Etídio 100 ug/mL	1 mg de brometo de etídio PBS q.s.p. 10 mL de solução	Sigma®
Cloreto de Sódio (NaCl)	-	Labsynth®
Dimetilsufóxido (DMSO)	-	Sigma®
EDTA	-	Qeel®
Ficoll-Hypaque	-	Sigma®
Fitohemaglutinina	-	Sigma®
Hidróxido de Sódio (NaOH)	-	Vetec®
Iodeto de propídeo 50 µg/mL	1 mg de iodeto de propídeo PBS q.s.p. 50 mL Diluído em água deionizada e esterilizada, filtrado em filto Millipore (0,22 µm) e complementado com SBF	Boehringer®
Meio de cultura de células RPMI 1640	10%, 1% de glutamina, 1% de antibiócos, 1% de bicarbonato de sódio (0,75%) e 25 mM e HEPES	Cultilab®

MTT	20 mg de MTT PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma®
Penicilina- Estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab®
Solução de eletroforese	EDTA 1mM, NaOH 300 mM, pH > 13 NaCl ₂ , 5 M, EDTA 100 mM	-
Solução de Lise	Tris 10 mM, N- Lauroylsarcosine 1% pH=10, TritonX-1001%, DMSO 10%	-
Solução de Neutralização	Tris 0,4 M, pH=7,5	-
Soro fetal bovino	-	Cultilab®
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio 2,14 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O 0,276 g de NaHPO ₄ .H ₂ O H ₂ O q.s.p. 1L de solução (ph=7,2)	Labsynth® Labsynth®
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Tris 0,5 M (pH=7,6) H ₂ O	Labsynth® Proquímios®
Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5% 0,125 g de EDTA 450 mL de PBS	Cultilab® Proquímios®
TritonX-100	-	Isifar®

Equipamentos

Agitador de placa, MLWModeloThys2®

Agitador de tubo, DonnerAD8850®

Banho maria, DELLTAModelo105Di®

Centrífuga Centimicro, FANENModelo212®

Centrífuga Excelsea Baby, IFANEMModelo206®

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403®

Citômetro de fluxo, GuavaEasyCytemini®
 Deonizador de água MilliQ, Milipore®
 Espectrofotômetro de placa DTX880, Beckman Coulter®
 Fluxo laminar, VECO®
 Incubadora de células, (CO₂WaterJacketIncubator) NUAIRETS Autoflow®
 High Troughput Screening (HTS)/Laboratory Automation Workstation, Biomek3000,
 Beckman Coulter®
 Microondas, Panasonic®
 Microscópio óptico, Metrimpex Hungray/PZO Labimex Modelo Stuarlab®
 Microscópio óptico de inversão, ZEISS, modelo Axiovert 40C®
 Microscópio de fluorescência, Olympus®
 pHmêtro, MicronalB474®
 Pipetas automáticas, Gilson®
 Sistema de Eletroforese Horizontal mini-Submarine, Amersham Biosciences®
 Sistema de Foto-documentação, Kodak®

Material biológico

Linhagens celulares tumorais humana e células normais murinas em cultura (**Tabela 2**);

Células mononucleares de sangue periférico humano isolados de voluntários sadios; coletada em condições adequadas. O projeto foi submetido e aprovado no comitê de ética de pesquisa em humana; Protocolo COMEPE (Comitê de Ética de Pesquisa da UFC) nº 281/09.

3.2. Metodologia Experimental

3.2.1 Isolamento e identificação dos Bufodienólídeos

Com o objetivo de obter bufodienólídeos em quantidade suficiente para a produção de derivados esteroidais e avaliação das atividades biológicas, adquiriu-se, por compressão da glândula paratóide, o veneno de 350 espécimes do sapo *Rhinella schneideri*, sob a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA-097/06, processo 02010.000832/04-74). Os animais capturados foram soltos no local de captura em Brasília, de forma a evitar futuros impactos ambientais na anfíbiofauna da região. Após a

desidratação e pulverização do veneno fresco, 95 g do veneno foram obtidos. A extração do veneno com acetato de etila, à temperatura ambiente, seguida da evaporação do solvente à vácuo, em evaporador rotativo, um sólido amorfo e amarronzado (9g) foi adquirido. Porções de cerca de 1 g foram cromatografadas em coluna *dry-flash* com óxido de alumínio neutro (alumina). Destas foram isolados os bufodienolídeos (Figura X.), os quais foram caracterizados por métodos físico-químicos e espectométricos, modificados quimicamente e submetidos a ensaios biológicos (CUNHA-FILHO, 2010).

O isolamento dos bufodienolídeos foi realizado no Instituto de Química da Universidade de Brasília sob supervisão da Prof^a Dr^a. Maria Lucília dos Santos.

3.2.2 Avaliação da Atividade Citotóxica *in vitro*

As linhagens celulares utilizadas para avaliação da atividade antiproliferativa foram obtidas a partir da doação pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI e estão listadas na **tabela 3.**)

As células mononucleadas de sangue periférico (CMSP) obtidas de voluntários sadios foram utilizadas como modelo para avaliação da citotoxicidade sobre células normais não transformadas.

Tabela 3. Linhagens utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* por meio do teste do MTT.

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

3.2.2.2. Manutenção das linhagens celulares

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

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

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

3.2.2.3 *Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP)*

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

3.2.2.4 *Teste do MTT*

Princípio do Teste

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) para formazan, pela atividade

da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (MOSMANN, 1983), permitindo, dessa forma, quantificar a porcentagem de células vivas.

Procedimento Experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 poços em densidade entre $0,7 \times 10^5$ e $0,3 \times 10^6$ células/mL (ajustado para cada linhagem, como mostrado na **tabela 2**). As células foram incubadas durante 24 e 72 horas juntamente com a amostrada testada. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada poço recebeu 150 μ L da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensionado em 150 μ L de DMSO para a quantificação do sal reduzido (formazan) nas células vivas. As absorbâncias foram obtidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa utilizando o programa Mutimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.) no comprimento de onda de 595 nm.

Análise dos Dados

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. O gráfico absorbância x concentração foi registrado e determinado a sua concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI₅₀) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism Software versão 5.0.

3.2.3 Estudo do Mecanismo de Ação

Para os experimentos de determinação de mecanismo de ação de hellebrigenina, foram utilizadas as células leucêmicas da linhagem HL-60 na concentração $0,3 \times 10^6$ e avaliadas quanto a diversos efeitos celulares. Os protocolos aplicados neste estudo examinaram os efeitos concentração e tempo dependentes. As concentrações foram estimadas a partir do valor de CI⁵⁰ da hellebrigenina encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular após incubação por 24 e 72 horas. As concentrações escolhidas foram de 0,03, 0,06 e

0,12 μM . Os grupos do controle negativo receberam a mesma quantidade de DMSO enquanto a doxorubicina (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo.

3.2.3.1 Citometria de Fluxo

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

Para todos os compostos testados, cinco mil eventos foram avaliados por experimento e os debris celulares foram omitidos da análise. A fluorescência de células de HL-60 foram então determinadas por citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mine usando o software Guava Express Plus após 24 horas de incubação. Cinco mil eventos foram analisados para cada replicata em três experimentos independentes.

3.2.3.1.1 Determinação da integridade da membrana, densidade e morfologia celular

Princípio do Teste

O teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo (PI) penetrar nas células cuja membrana esteja rompida e após ligação ao DNA emitir alta fluorescência quando excitado pelo laser. As células com membrana íntegra emitem baixa fluorescência (SHAPIRO, 1995).

Procedimento Experimental

Uma alíquota de 100 μL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 μL de uma solução de PI a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (diluído em tampão fosfato). Após 5 minutos as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Foram obtidas informações sobre morfologia celular (espalhamento frontal e lateral da luz, o que corresponde ao tamanho e granulosidade relativa entre as células, respectivamente) e integridade de membrana utilizando-se o filtro para o espectro do vermelho (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

3.2.3.1.2 *Análise de conteúdo e fragmentação de DNA (Ciclo Celular)*

Princípio do Teste

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

Procedimento Experimental

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

3.2.3.1.3 *Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial*

Princípio do teste

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

Procedimento Experimental

Uma alíquota de 100 μ L de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 200 μ L de uma solução de rodamina 1 μ g/mL. Após 15 minutos de incubação no escuro, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm/5 min. O sobrenadante foi então descartado e 100

μL de PBS foi adicionado em cada amostra. Após um período de 30 minutos incubadas no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (CURY-BOAVENTURA *et al.*, 2004).

3.2.3.1.4 *Determinação da Externalização da Fosfatidilserina – Anexina V*

Princípio do Teste

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

Procedimento Experimental

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

Análise dos Dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 2 experimentos realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças

significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnett, com nível de significância de 5%. ($p < 0,05$)

3.2.3.1.5 *Determinação da ativação de caspases iniciadoras 8 e efetoras 3 e 7*

Princípio do Teste

As caspases pertencem a família de proteases cisteínas. A ativação das caspases 8 e 9 possui papel fundamental no mecanismo de apoptose, sendo responsável pela iniciação das vias intrínsecas e extrínsecas de apoptose e pela clivagem de vários componentes celulares relacionados ao reparo e ao controle do DNA. Assim, a quantificação dos níveis de caspase iniciadoras 8 e 9 permite avaliar os mecanismos de indução apoptótica (MEHMET, 2000).

Procedimento Experimental

A detecção das caspase 8 e caspases 3 e 7 foi analisada por citometria de fluxo utilizando o Kit FAM de caspases 8, 3 e 7 após 24 horas de incubação com hellebrigenina nas concentrações de 0,03, 0,06 e 0,12 μM e comparadas ao controle negativo (grupo não-tratado). A doxorubicina (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo. As células ($0,3 \times 10^6$) foram incubadas com o Inibidor de caspases com marcador fluorescente (FLICA™) e mantida por uma hora a 37°C em incubadora de CO₂. Após a incubação, 80 μL de tampão de lavagem foram adicionados e então, as células centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. O precipitado resultante foi ressuscitado em 200 μL de tampão de lavagem e centrifugado novamente. Em seguida as células foram ressuscitadas em uma solução contendo iodeto de propídeo e tampão de lavagem e analisadas imediatamente utilizando o citômetro de fluxo.

Análise dos dados

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Dunnett ou por Student Newman Keuls, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.2.3.2 Teste do Cometa

Principio do Teste

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

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

Procedimento Experimental

O presente estudo utilizou-se do teste de cometa alcalino para avaliar a indução de danos ao DNA de células HL-60 e CMSP expostas a 0,03, 0,06 e 0,12 μM de hellebrigenina por 24 horas de tratamento.

Preparo das laminas

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

Lise celular

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

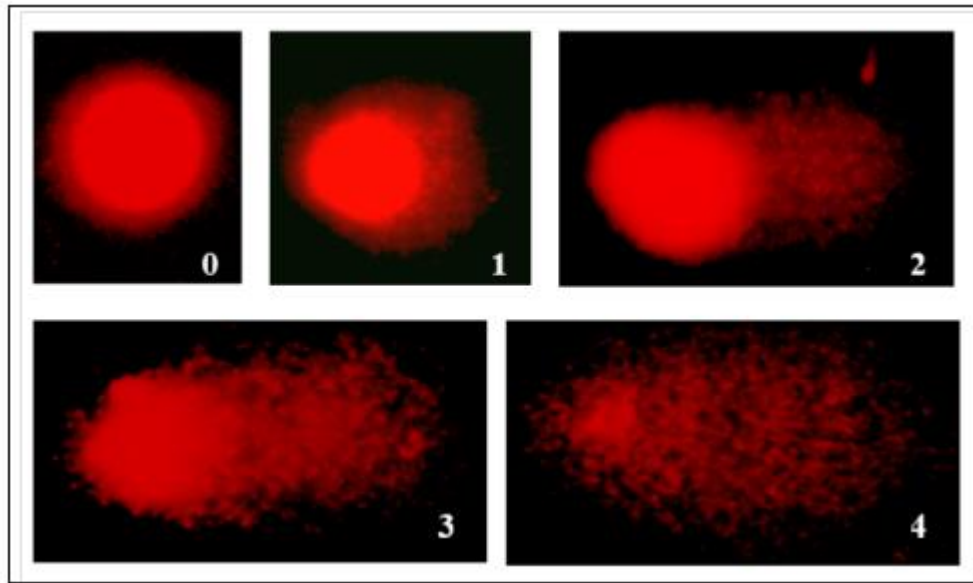
Neutralização e eletroforese

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

Coloração e análise das lâminas

A coloração das lâminas foi realizada com solução de brometo de etídio (Sigma) a 20 µg/mL. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus, modelo BX41) e classificadas de acordo com os escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (figura 10). Foram contados 100 cometas por lâmina e atribuídos, por análise visual, a uma das cinco categorias – sem dano, baixo nível de dano, médio nível, nível alto de dano e dano máximo – que relacionam a percentagem de DNA na cauda do cometa ao grau de lesão sofrida pela célula (LOVELL; THOMAS; DUBOW, 1999).

Figura 10. Tipos de cometa e classificação por categoria de dano.



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

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

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

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

Análise dos dados

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

3.2.3.3 Determinação de aberrações cromossômicas

Princípio do Teste

Uma grande variedade de ensaios criptogênicos tem sido usada com sucesso no monitoramento de populações expostas a agentes mutagênicos. E as aberrações cromossômicas tem sido de grande importância, por avaliarem a possibilidade da ocorrência

de câncer na população (AU *et al.*, 2001). O teste de aberrações cromossômicas em culturas de células de mamíferos é um dos métodos mais sensíveis para detecção de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Procedimento Experimental

Os linfócitos ($0,5 \times 10^5$ céls./mL) foram cultivados em frascos de cultura contendo RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e 3% de fitohemaglutinina durante 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Duas horas antes do término do tempo de incubação, foi adicionada em todas as culturas uma solução de colchicina (0,0016%) para obtenção de metáfases. Posterior ao tempo de cultivo, as culturas foram fixadas com uma solução fixadora (metano/ácido acético, 3:1) mantida previamente gelada (4°C).

Preparação das lâminas

Duas a quatro gotas (dependendo do material) da suspensão celular foram transferidas para lâminas limpas e secas. Após a montagem das lâminas, estas foram coradas com uma solução de Giemsa (5%) por 7 minutos. Foram montadas cinco lâminas para cada cultura.

Análise Citogenética

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico, com a finalidade de se detectar possíveis alterações cromossômicas estruturais ou numéricas nas metáfases dos linfócitos. Os cromossomos foram analisados com a objetiva de imersão (100x), em lâminas codificadas, observando-se a posição do centrômero, alterações no grau de ploidia e aberrações estruturais segundo Rabelo-Gay e colaboradores (1991).

Critérios da análise

Os parâmetros analisados foram a frequência de células com aberrações cromossômicas em 100 metáfases/cultura e o índice mitótico (IM), determinado pela

contagem do número de metáfases em 2000 linfoblastos/cultura (MOORHEAD *et al.*, 1960). O IM foi calculado usando-se a seguinte fórmula:

$$IM = \frac{\text{Número de metáfases}}{\text{Número total de linfoblastos}} \times 100$$

Análise Estatística

Para análise estatística do índice mitótico, foi utilizado os testes ANOVA e o teste t de Student foi utilizado para comparar as frequências de células aberrantes em relação aos controles, no software Prism® versão 5.0 (GraphPad Prism Software), sendo os resultados considerados significantes quando $p < 0,05$.

3.2.3.4 *Análise de Docking Molecular*

O docking molecular é um método que permite estudar como duas estruturas tridimensionais se ajustam uma à outra, da melhor forma possível. Este método tem sido muito utilizado para estudar como algumas moléculas podem inibir enzimas e planejar fármacos (REIS, 2008).

Procedimento experimental

O procedimento foi realizado utilizando as ferramentas Avogadro 1.0.3, Autodock Tools, e Autodock 4.1. As coordenadas para o domínio de ligação de ATP na enzima topoisomerase II α humana foram obtidas do banco de dados Protein Data Bank (código da enzima: 1ZXM)(WEI *et al.*, 2005). As moléculas de água foram removidas e os átomos de hidrogênio foram adicionados à estrutura cristalográfica original. Ao íon magnésio foi atribuída uma carga +2. A estrutura molecular do composto hellebrigenina foi desenhado utilizando-se o software Avogadro e ajustados suas cargas de Gasteiger com a ferramenta AutoDock Tools. Os arquivos do receptor e ligante foram preparados de acordo com os protocolos originais (MORRIS *et al.*, 1998; SANNER, 1999). O docking foi realizado utilizando-se as instruções do Algoritmo Genético Lamarckiano (Lamarckian Genetic Algorithm). Foram usados parâmetros padrões de busca exceto pelo quantidade de energias calculadas (25.000.000) e corridas de docking (50). Finalmente, a área (grid) central da

enzima foi escolhida para realização das corridas do docking agrupando-se as orientações com distancia 0,375 Å para se obter o modo de docking mais favorável. A estrutura da proteína foi considerada rígida em todas as corridas.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade citotóxica dos bufodienolídeos

A avaliação citotóxica inicial dos bufodienolídeos envolveu 7 linhagens tumorais humanas (HL-60, HCT-8, HCT-116, MDA-MB435, OVCAR-8, PC3-M e SF-295), células murinas não tumorais (J774, L929 e V79) e células mononucleadas do sangue periférico humano (CMSP) foram tratadas com concentrações crescentes de telocinobufagina (BUF-01), marinobufagina (BUF-03), bufalina (BUF-05), bufalina-3-acetato (BUF-08), hellebrigenina (BUF-08) e BUF-11 durante 72 horas.

A análise da ação citotóxica das amostras testadas (**Tabela 4**) mostrou que todos os bufodienolídeos apresentaram elevada citotoxicidade frente às linhagens tumorais de diferentes tipos histológicos, com valores menores que 1 μM (exceto BUF-03) e muitas vezes menores que 10 nM (exemplo: BUF-05 e BUF-06) para as linhagens tumorais e para a linhagem normal (CMSP). No entanto, não se mostraram citotóxicas para linhagens normais murinas ($\text{CI}_{50} > 5 \mu\text{g/mL}$).

Em relação ao teste hemolítico utilizando eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus*), os bufodienolídeos estudados não foram capazes de induzir lise das hemácias. A ausência de atividade hemolítica ($\text{CE}_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$) sugere que o efeito citotóxico das amostras testadas independe de um dano específico à membrana plasmática das células.

O bufodienolídeo hellebrigenina (BUF-08) foi escolhido para os ensaios de determinação de mecanismos de ação por possuir CI_{50} intermediária em relação aos outros bufodienolídeos. Uma vez que hellebrigenina não se mostrou seletiva para nenhuma linhagem cancerígena, a linhagem leucêmica HL-60 foi selecionada como modelo de estudo para determinação dos mecanismos de ação induzidos por esse bufodienolídeo. Dessa forma, os experimentos posteriores foram realizados utilizando-se as concentrações de hellebrigenina correspondentes próximas a metade da CI_{50} , a própria CI_{50} e o dobro da CI_{50} (0,03, 0,06 e 0,12 μM , respectivamente) em células HL-60. Por sua vez, o controle positivo doxorrubicina foi testado na concentração de 0,5 μM .

Tabela 4. Atividade citotóxica de bufodienólídeos (BUF-01, BUF-03, BUF-05, BUF-06, BUF-08 e BUF-011) extraídos de *Rhinella schneideri* em linhagens celulares de câncer e normais. A doxorrubicina foi usada como controle positivo. ug/mL (μ M)

Linhagens	BUF-01	BUF-03	BUF-05	BUF-06	BUF-08	BUF-11	Doxo
Tumorais							
HL-60	0,023 (0,052) 0,017-0,031	0,68 (1,53) 0,569-0,835	0,003 (0,007) 0,0023-0,004	0,0043 (0,01) 0,0021-0,006	0,019 (0,046) 0,016-0,023	0,010 (0,022) 0,009-0,012	0,02 (0,03) 0,01-0,02
HCT-8	0,026 (0,058) 0,020-0,036	0,43 (0,97) 0,286-0,655	0,002 (0,005) 0,002-0,0039	0,0023 (0,005) 0,0014-0,0038	0,011 (0,026) 0,009-0,014	0,011 (0,024) 0,010-0,012	0,04 (0,07) 0,03-0,05
HCT-116	ND*	0,79 (1,78) 0,686-0,908	0,0033 (0,008) 0,0023-0,0048	0,0024 (0,006) 0,0015-0,0038	0,018 (0,43) 0,016-0,021	0,010 (0,022) 0,008-0,013	0,12 (0,20) 0,09-0,17
MDAMB-435	0,046 (0,103)	1,41 (3,17) 1,177-1,707	0,005 (0,012) 0,0042-0,0072	0,0076 (0,018) 0,0053-0,0109	0,066 (0,158) 0,05-0,08	0,028 (0,063) 0,022-0,036	0,47 (0,81) 0,34-0,65
OVCAR-8	ND*	1,28 (2,88) 0,998-1,633	0,0123 (0,032) 0,009-0,017	0,0084 (0,019) 0,0063-0,0112	0,056 (0,134) 0,05-0,067	0,039 (0,088) 0,033-0,046	0,26 (0,45) 0,17-0,31
PC3-M	ND*	ND*	0,0096 (0,025) 0,0048-0,016	0,0029 (0,007) 0,0012-0,0007	0,027 (0,065) 0,018-0,04	0,108 (0,244) 0,068-0,171	0,2 (0,34) 0,17-0,23
SF-295	0,013 (0,029) 0,011-0,016	0,45 (1,01) 0,321-0,655	0,001 (0,002) 0,0012-0,0021	0,0015 (0,003) 0,0011-0,0019	0,026 (0,062) 0,021-0,032	0,049 (0,110) 0,042-0,056	0,16 (0,27) 0,13-0,23

Linhagens	BUF-01	BUF-03	BUF-05	BUF-06	BUF-08	BUF-11	Doxo
Normais							
CMSP	0,025 (0,056)	0,23 (0,52)	0,010 (0,025)	0,0117 (0,027)	0,047 (0,113)	0,06 (0,135)	0,97 (1,78)
	0,021-0,029	0,201-0,268	0,0085-0,0134	0,0109-0,0125	0,043-0,050	0,048-0,076	0,52-1,80
L929	>5	>5	>5	>5	>5	>5	ND*
V79	>5	>5	>5	>5	>5	>5	ND*
J774	>5	>5	>5	>5	>5	>5	0,05 (0,01) 0,04-0,07

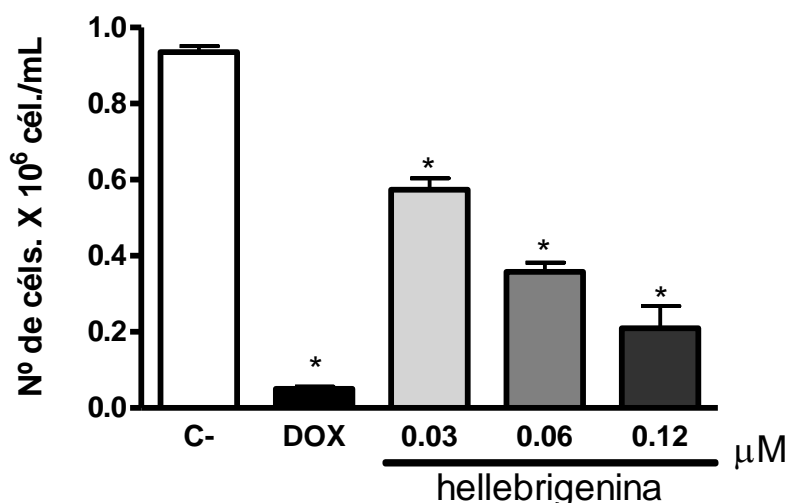
A tabela apresenta os valores de CI50 (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) ($\mu\text{g/mL}$) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) realizado pelo teste do MTT, após 72h de incubação obtidos por regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism.

4.2 Avaliação da viabilidade e morfologia de células HL-60 após tratamento com o composto hellebrigenina

A viabilidade celular (número de células viáveis e integridade da membrana citoplasmática) foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo (IP) como agente fluorogênico. A doxorubicina foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 4%) usado para dissolver as substâncias. A amostra hellebrigenina – nas concentrações (0,03 μM , 0,06 μM e 0,12 μM) – foi analisada após 24 horas de incubação.

Análise da **figura 11** mostrou que a hellebrigenina reduziu a viabilidade celular de forma dependente da concentração. Após 24 h de exposição, a redução do número de células viáveis foi significativamente reduzida ($p < 0,001$) já a partir da menor concentração: $0,57 \pm 0,03 \times 10^6$ céls./mL (0,03 μM), $0,35 \pm 0,02 \times 10^6$ céls./mL (0,06 μM) e $0,21 \pm 0,05 \times 10^6$ céls./mL (0,12 μM). A doxorubicina, utilizada como controle positivo, reduziu drasticamente ($p < 0,001$) a viabilidade celular $0,05 \pm 0,006 \times 10^6$ céls./mL.

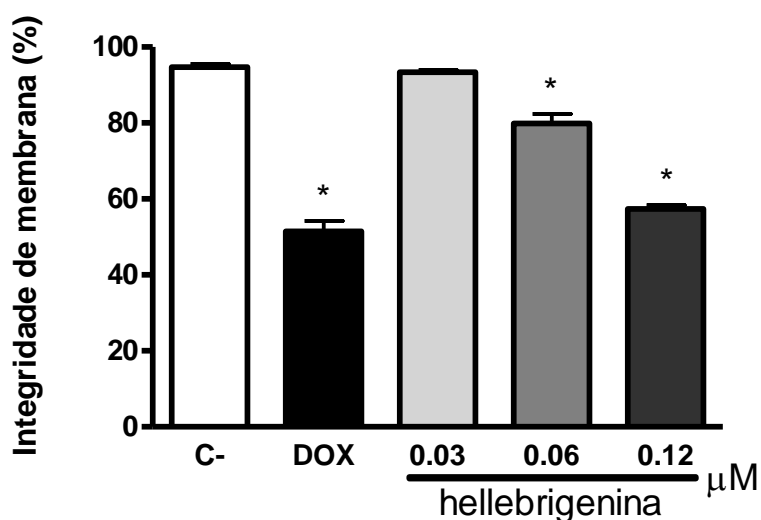
Figura 11. Efeito do composto hellebrigenina sobre a concentração de células na linhagem HL-60, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.



O controle negativo (C-) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo (DOX). As barras representam a média \pm E.P.M de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * $p < 0,001$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnet.

Na análise da integridade de membrana por citometria de fluxo (**Figura 12**), o percentual de células HL-60 com membrana íntegra, pertencentes ao grupo controle, foi de $94,67 \pm 0,9\%$. A análise dos grupos teste mostrou que a partir da concentração $0,06 \mu\text{M}$, a hellebrigenina foi capaz de causar dano significativo a membrana ($p < 0,001$), reduzindo o percentual de células com membranas plasmáticas íntegras para $79,84 \pm 2,5\%$ e para $57,41 \pm 0,9\%$ nas culturas tratadas com a maior concentração ($0,12 \mu\text{M}$). A doxorrubicina, causou um dano significativo ($p < 0,001$) à membrana, reduzindo o percentual de células com membrana íntegra para $51,44 \pm 2,74\%$.

Figura 12. Efeito do composto hellebrigenina sobre a integridade de membrana de células da linhagem HL-60, determinado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.

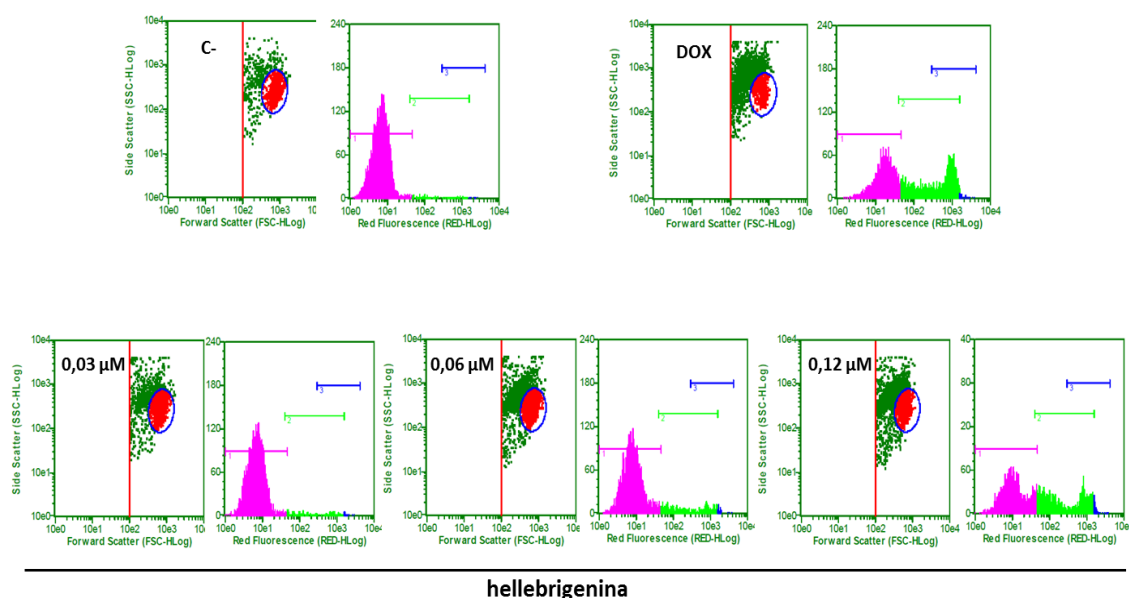


O controle negativo (C-) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras testadas. Doxorrubicina ($0,5 \mu\text{M}$) foi utilizada como controle positivo (DOX). As barras representam a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * $p < 0,01$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

O estudo morfológico foi estabelecido pela análise do volume e granulosidade celular por citometria de fluxo (**Figura 13**). Análise qualitativa do resultado foi feita através de gráficos de dispersão representativos dos eventos celulares. Após 24 horas de incubação em diferentes concentrações foi observado um aumento gradual do número de células com padrão apoptótico, a partir da concentração de $0,06 \mu\text{M}$, conforme observado nos gráficos pela diminuição do volume, FSC; e menor granulosidade, SSC

quando comparado com o controle negativo. O tratamento com doxorrubicina, também apresentou padrão celular típico de apoptose.

Figura13. Efeito do bufodienolídeo hellebrigenina sobre a morfologia de células HL-60 determinado por citometria de fluxo



Utilizou-se o FSC (*Forwar scatter* – desvio da luz para frente) e SSC (*Side scatter* – desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo das células e granulosidade, ou complexidade interna, da célula, respectivamente, após 24 horas de incubação. O histograma apresentado ao lado de cada *dot plot* representa as células com membrana íntegra (marcação vermelha) e células com membrana danificada (marcação com verde), o que significa o aumento da fluorescência vermelha, devido à absorção e incorporação, pela célula, do iodeto de propídeo.

4.3 Avaliação do efeito do composto hellebrigenina sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HL-60

O conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliado por citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo como agente fluorogênico. A doxorrubicina (0,5 μM) foi usada como controle positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) usado para diluir a amostra. As células foram analisadas após a 24 horas de incubação com o composto hellebrigenina.

Nesta avaliação, os resultados, apresentados na **tabela 5**, mostram que a partir da concentração 0,06 μM , hellebrigenina foi capaz de aumentar significativamente o DNA

sub-G1 (DNA fragmentado ou condensado) bem como o controle positivo doxorrubicina.

Quanto a progressão do ciclo celular (**Tabela 5**), a partir da menor concentração, o composto foi capaz de aumentar ligeiramente o conteúdo de DNA na fase G2/M de forma significativa ($p < 0,01$) e sem dependência da concentração.

Tabela 5:

Tabela 5. Efeito do composto hellebrigenina sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação.

Substância	Concentração (μM)	DNA (%)			
		Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
Controle	-	11,31 \pm 2,20	23,01 \pm 2,59	66,82 \pm 1,01	10,04 \pm 1,98
Doxorrubicina	0,5	74,25 \pm 4,96 ***	38,31 \pm 2,45 ***	60,41 \pm 2,28	1,095 \pm 0,60 **
Hellebrigenina	0,03	19,96 \pm 2,15	19,78 \pm 2,35	60,53 \pm 1,09	19,69 \pm 2,45 **
	0,06	38,04 \pm 4,44 ***	19,36 \pm 2,07	59,37 \pm 3,15	21,17 \pm 1,12 **
	0,12	62,26 \pm 3,30 ***	18,11 \pm 2,85	58,81 \pm 2,82	19,90 \pm 2,70 **

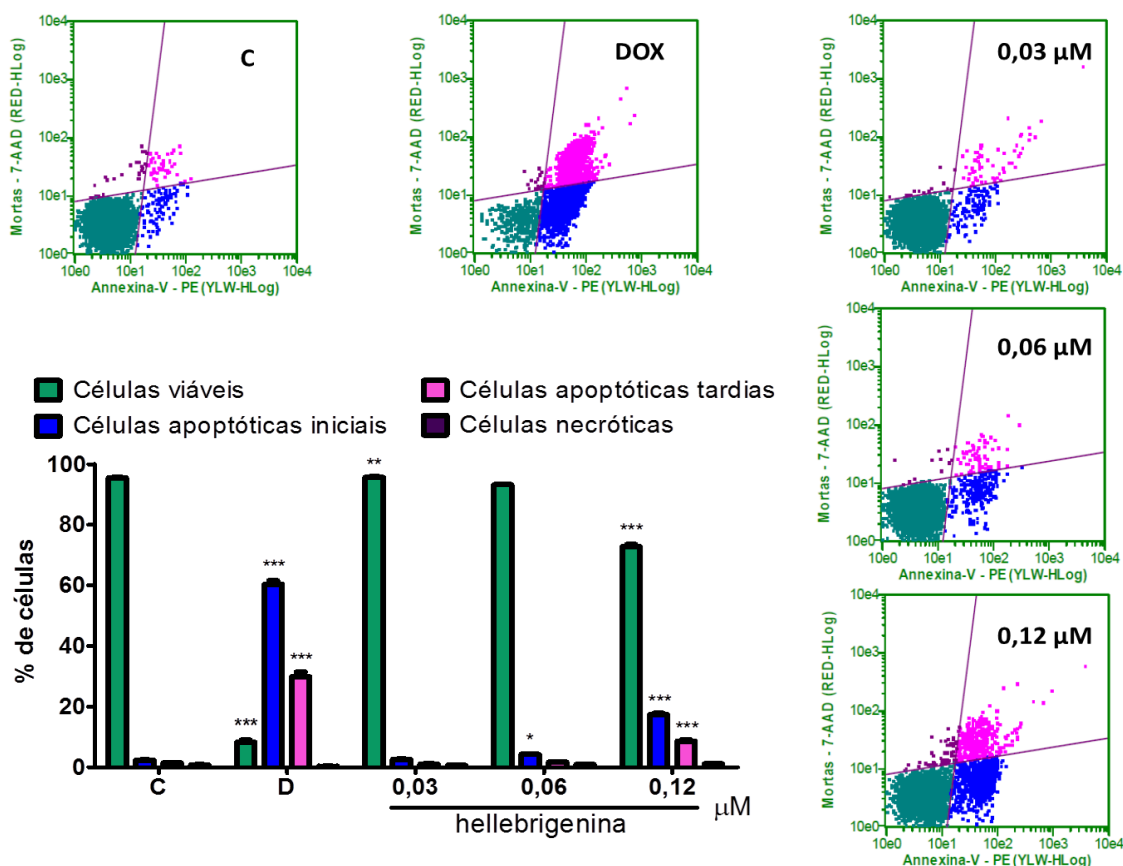
A tabela apresenta os valores correspondentes à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido pelo teste de Dunnett. Doxorrubicina foi usada como controle positivo.

4.4 Determinação da externalização da fosfatidilserina

A externalização da fosfatidilserina (PS) é considerada um marco importante nas fases iniciais do processo apoptótico (MARTIN *et al.*, 1995). Logo, as células tratadas com os compostos durante 24 horas e os controles (DMSO, 0,1%) foram incubadas com anexina V (proteína com alta afinidade por PS) com o objetivo de avaliar a porcentagem de células com PS externalizado sobre a superfície da membrana celular.

A análise da **figura 14** mostra que a média da porcentagem de células HL-60 viáveis no grupo controle negativo foi de $95,48 \pm 0,21\%$ e após exposição à amostra hellebrigenina, na menor concentração ($0,03 \mu\text{M}$), não reduziu o número de células viáveis e não induziu significativamente a externalização da PS. A concentração de $0,06 \mu\text{M}$ não reduziu a porcentagem de células viáveis $95,69 \pm 0,65\%$, mas induziu de forma significativa ($p < 0,05$) o aumento de células em apoptose inicial $4,22 \pm 0,17\%$ e também foi capaz de induzir a externalização de PS ($p < 0,01$), ao ser analisada a soma do percentual de células em apoptose inicial com o percentual de células em apoptose tardia (soma: $5,94 \pm 0,23\%$), como apresentado na **figura 15**. Na maior concentração ($0,12 \mu\text{M}$), foi observado o aumento significativo ($p < 0,001$) de células em apoptose inicial $17,40 \pm 0,37\%$ e tardia $8,57 \pm 0,54\%$, com uma consequente redução do percentual de células viáveis para $72,90 \pm 0,59\%$. A doxorrubicina apresentou aumento significativo na porcentagem de células em apoptose inicial e tardia ($60,39 \pm 1,16\%$ e $29,84 \pm 1,57\%$, respectivamente).

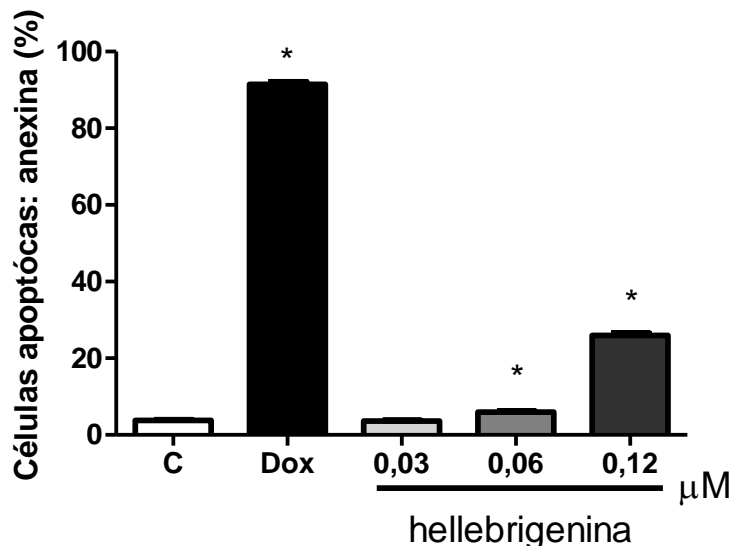
Figura 13. Efeito do composto hellebrigenina sobre a externalização da fosfatidilserina em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo



Utilizou-se Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina ($0,5 \mu\text{M}$) 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. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

Figura 14. Efeito do composto hellebrigenina sobre a externalização da fosfatidilserina em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo

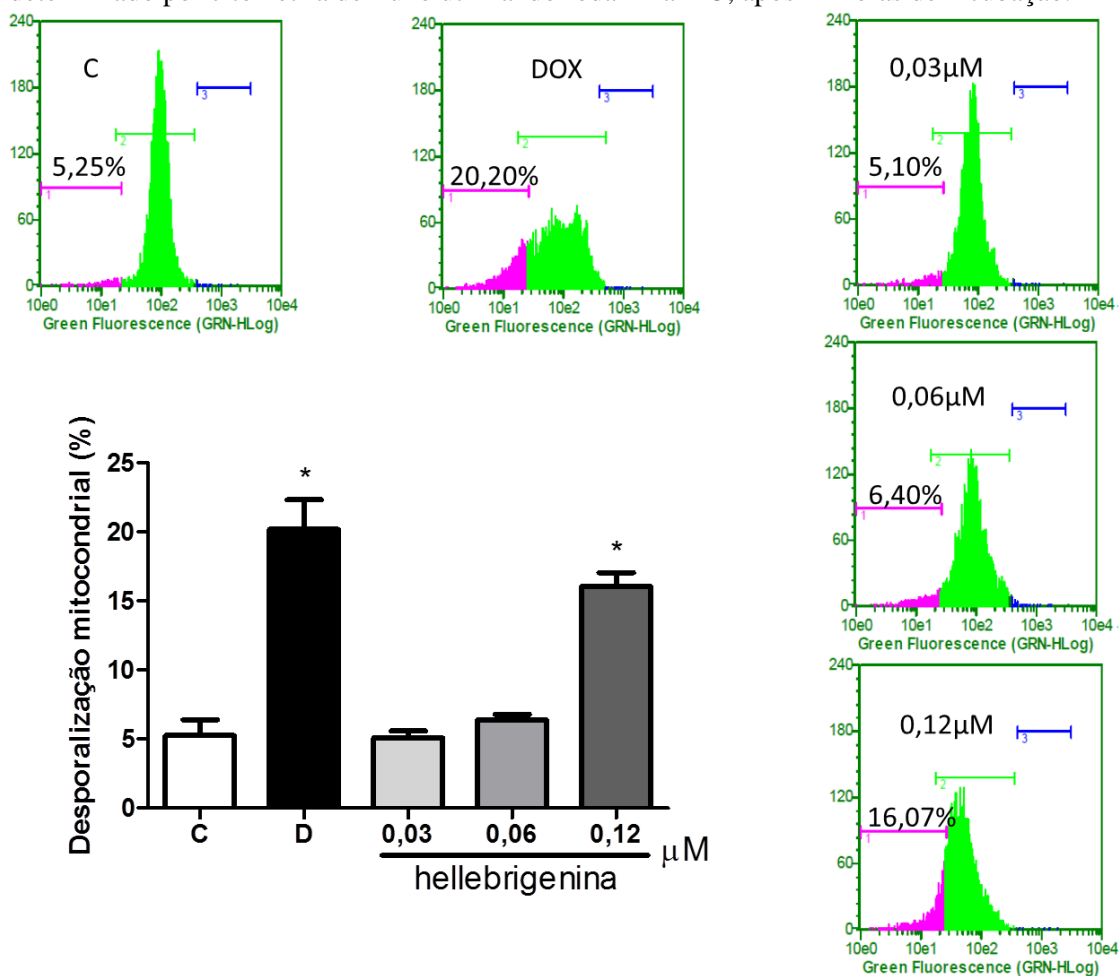


Utilizou-se Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo (DOX). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * $p < 0,01$; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.5 Efeito da amostra hellebrigenina sobre despolarização mitocondrial em células de HL-60.

Para avaliar o papel da mitocôndria na apoptose induzida por hellebrigenina, a capacidade de induzir alterações no potencial transmembrânico da mitocôndria foi avaliada por citometria de fluxo através da incorporação do corante Rodamina 123. Como observado na **figura 16**, apenas na maior concentração 0,12 μM , hellebrigenina foi capaz de induzir despolarização mitocondrial em $16,07 \pm 1,00\%$ de células do experimento. A doxorubicina, utilizada como controle positivo, causou $20,20 \pm 2,14\%$ de despolarização mitocondrial (figura 4.6).

Figura 15. Efeito da hellebrigenina sobre o potencial transmembrânico em células HL-60 determinado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123, após 24 horas de incubação.



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

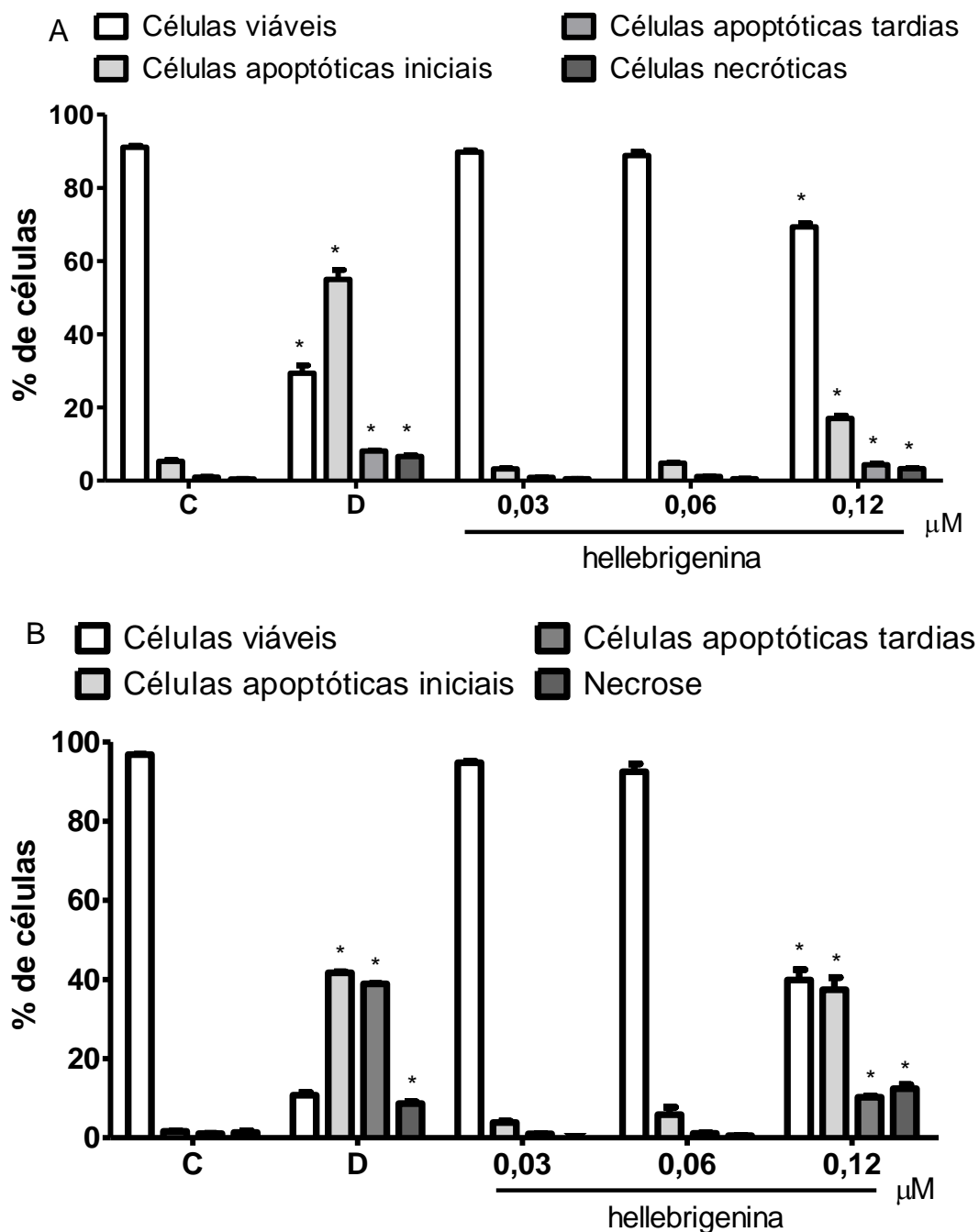
4.6 Efeitos da amostra hellebrigenina sobre a ativação da caspase iniciadora 8 e caspases efetoras 3 e 7 em células de HL-60.

Após 24 de incubação, foi observado (**figura 17A**) ativação significativa ($p < 0,001$) da caspase iniciadora 8, apenas na maior concentração testada 0,12 μ M com percentual de células em apoptose inicial $17,01 \pm 0,80\%$ e de $4,33 \pm 0,40\%$ para apoptose tardia. E ainda foi capaz de aumentar ($p < 0,001$) a porcentagem de células em necrose ($3,31 \pm 0,13\%$). A doxorubicina aumentou, significativamente ($p < 0,001$), tanto

o número de células em apoptose inicial e tardia ($54,98 \pm 2,58$ e $8,08 \pm 0,21\%$, respectivamente), bem como em necrose $6,62 \pm 0,38\%$.

Da mesma forma, somente na maior concentração de $0,12 \mu\text{M}$ foi observada ativação significativa ($p > 0,001$) das caspases efetoras 3 e 7, conforme mostra a **figura 17B**. O percentual de células em apoptose inicial foi de $20,59 \pm 0,82\%$ e de $3,95 \pm 0,18\%$ em apoptose tardia, bem como o aumento o percentual de células em necrose para $3,62 \pm 0,13\%$ ($p > 0,001$). A doxorubicina aumentou o percentual de apoptose inicial e tardia ($61,31 \pm 1,77\%$ e $9,38 \pm 0,49\%$, respectivamente) e também de células em necrose ($3,5 \pm 0,26$).

Figura 16.: Efeito do composto hellebrigenina sobre a ativação de caspase iniciadora 8 (A) e caspase efetora 3 e 7 (B) em células de HL-60 determinado por citometria de fluxo



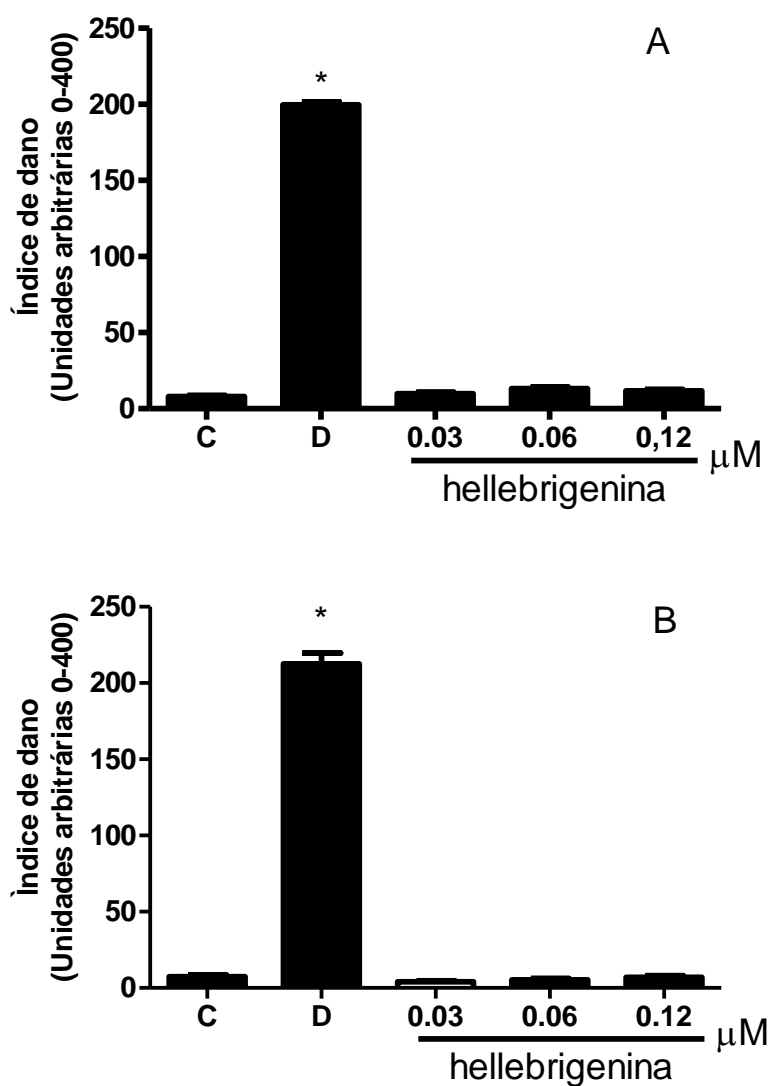
Utilizou-se FLICA e FAM (verde), após 24 horas de incubação. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo (DOX). Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * $p < 0,001$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.7 Avaliação do potencial genotóxico em células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) e células leucêmicas HL-60

A avaliação do potencial genotóxico em CMSP e HL-60, tratadas com o composto hellebrigenina, foi realizada pelo ensaio do cometa em condições alcalinas e por ensaio de aberrações cromossômicas (somente CMSP).

A **figura 18** mostra que o composto testado não foi capaz de induzir dano à fita de DNA, portanto não foi genotóxico em HL-60 (figura 13A) e nem em CMSP (figura 13B). Já a doxorrubicina induziu danos significativos ($p < 0,001$) a molécula de DNA representados pela média do índice de dano: $212,75 \pm 7,17$ (CMSP) e $199,66 \pm 2,49$ (HL-60).

Figura 17. Efeito da amostra hellebrigenina sobre a indução de dano ao DNA em células leucêmicas HL-60 (A) e CMSP (B) após 24 horas de incubação



. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (0,5 μM) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondem à

média \pm E.P.M de três experimentos independentes. * $p < 0,001$; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

A **tabela 6** mostra os efeitos de hellebrigenina na indução de aberrações cromossômicas. Depois de 24 horas de incubação, nenhum aumento no aparecimento de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas foi observado. No entanto, os efeitos citotóxicos de hellebrigenina foram detectados através da redução do índice mitótico a partir da concentração intermediária de hellebrigenina em CMSP.

Tabela 6. Efeito da amostra hellebrigenina sobre a proliferação e indução de aberrações cromossômicas em CMSP humanas após 24 horas de incubação.

Amostras	Tratamento	Exp.	Índice Mitótico ^c		Número de Aberrações ^d				Células Aberrantes ^e	
			%	Média ± E.P.M.	G	R	P	E	%	Média ± S.D.
DMSO ^a	0.1%	1	6.8	6.70 ± 0.26	1	0	0	0	0.0	0.0
		2	6.2	3.06 ± 0.20	0	0	0	0	0.0	
		3	7.1		1	0	0	0	0.0	
Doxorrubicina ^b	0.5 µM	1	3.4	3.06 ± 0.20*	8	11	1	2	9.33	10.88 ± 2.25*
		2	2.7		5	9	3	0	8.0	
		3	3.1		11	14	1	5	15.3	
Hellebrigenina	0.03 µM	1	5.3	5.53 ± 0.14	0	0	0	0	0.0	0.0
		2	5.8		0	0	0	0	0.0	
		3	5.5		2	0	0	0	0.0	
	0.06 µM	1	3.6	3.63 ± 0.14*	1	0	0	0	0.0	0.0
		2	3.9		0	0	0	0	0.0	
		3	3.4		1	0	0	0	0.0	
	0.12 µM	1	1.6	2.26 ± 0.33**	1	0	0	0	0.0	0.0
		2	2.5		1	0	0	0	0.0	
		3	2.7		0	0	0	0	0.0	

^acontrole negativo; ^bcontrole positivo; ^cfrequência por experimento (Exp.), média e desvio padrão, em 2,000 células ^dnúmero de aberrações por 150 metáfases analisadas; ^efrequência por experimento (Exp.), média e desvio padrão de células aberrantes, exceto *gaps*; **G**: *gaps* (cromossomos e cromátides); **R**: rupturas

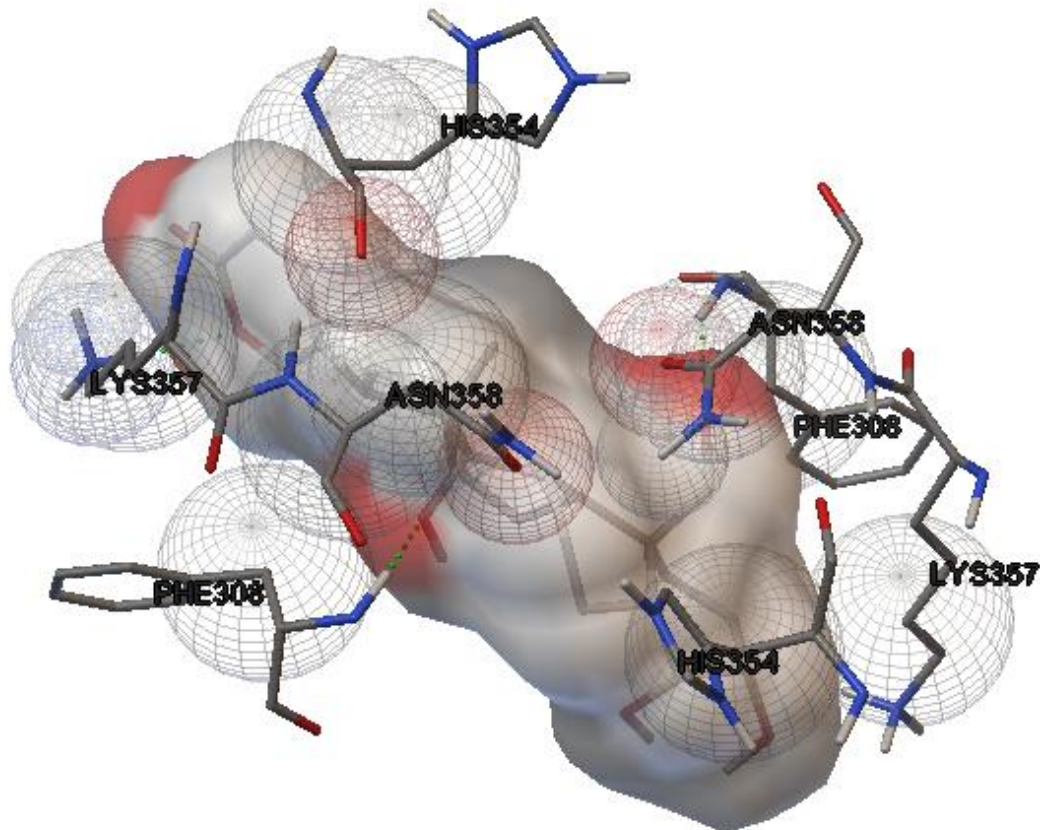
(cromossomos e cromátides); **P**: células poliploides; **E**: endoreduplicação; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido de teste t de Student.

4.8 Estudo de Docking Molecular

A análise dos resultados foi baseada na interação do ligante hellebrigenina com sítio de ligação a ATP da topoisomerase II α humana (topoII). Esse ligante, no raio de 0,35 Å, interage principalmente com os seguintes aminoácidos: ASN358, HIS354, LYS357 e PHE308, das duas subunidades diferentes desse sítio de topo II. As PHE308 das cadeias A e B e a LYS357 da cadeia B estão ligadas por ponte de hidrogênio enquanto o restante mantém-se próximos provavelmente por forças de Van der Waals, indicado na figura 19 pelas esferas azuis. Vale ressaltar que o ligante se encontra estável na união das duas subunidades dessa porção da enzima, mas longe do sítio de ligação com ATP.

A **figura 19** mostra a conformação de menor energia encontrada (-7,74 kJ/mol) na ligação entre o sitio de ATPase de topo II e o composto helebrigenina. Dessa forma, tem-se a compatibilidade para uma possível inibição de topoisomeraII α humana.

Figura 18. Ligação entre porção de topoisomerase II α e hellebrigenina



Tracejados verdes representam ligações de ponte de hidrogênio. Esferas representam forças de Van der Waals.

5 DISCUSSÃO

Os agentes anticâncer são, em grande parte, obtidos direta ou indiretamente de produtos naturais, e atuam na inibição do crescimento de células tumorais (CRAGG *et al.*, 2005; NEWMAN *et al.*, 2003). Estes agentes não precisam ser necessariamente o melhor composto para o uso farmacêutico (KINGSTON, 1996), podendo ser utilizados como protótipos para a síntese de análogos mais promissores. A obtenção de análogos é um processo comumente utilizado para descobrir os grupamentos essenciais à atividade biológica, e isso pode ser feito através de estudos da relação entre a estrutura e atividade biológica servindo de base para a otimização molecular (GARRET & WORKMAN, 1999; WILSON & DANISSHEFKY, 2007). Neste processo, tem-se por objetivo o desenho racional e o desenvolvimento de uma segunda geração de agentes com características melhoradas, tais como o aumento da eficácia e da estabilidade, a melhora das propriedades farmacocinéticas e a diminuição dos efeitos colaterais (ORTHOLAND & GANESAN, 2004).

Inicialmente, o potencial citotóxico dos compostos em estudo foram determinadas através do ensaio do MTT após 72 horas de incubação (**Tabela 4**). De forma geral os bufodienolídeos mostraram elevada toxicidade para diferentes linhagens de câncer humano (HL-60, HCT-8, HCT-116, MDA-MB45, OVCAR-8, PC3M e SF295). A exemplo da bufalina e 3-acetato de bufalina que em pequenas quantidades (nM) foram capazes de inibir o crescimento celular.

Esses dados corroboram com diversos autores que utilizaram ensaio de MTT e obtiveram resultados semelhantes principalmente em células leucêmicas utilizando bufodienolídeos modificados (YE *et al.*, 2004; NASU *et al.*, 2005; NOGAWA *et al.*, 2001). Esse resultados confirmam, o trabalho previamente realizado pelo nosso grupo que avalia a citotoxicidade de vários bufodienolídeos utilizando diversas linhagens tumorais. (CUNHA-FILHO *et al.*, 2010).

Muitos fármacos atualmente utilizados no tratamento do câncer agem inibindo a progressão do ciclo celular, e como consequência inibem a proliferação celular (ANAZETTI *et al.*, 2003). Um dos grandes problemas evidenciados no tratamento do câncer, utilizando quimioterápicos, são seus efeitos colaterais. Grande parte desses efeitos deve-se, principalmente, a baixa seletividade desses fármacos por células tumorais, onde as células normais mais afetadas são as que se proliferam rapidamente, como as células da pele, do trato gastrointestinal e do sangue (ANAZETTI *et al.*, 2003). Assim a busca por novos

quimioterápicos tem como objetivo principal aumentar a seletividade e a efetividade dessas substâncias, procurando eliminar apenas as células tumorais e preservando as células normais.

Ao considerar os efeitos colaterais da quimioterapia, é de grande importância verificar se a droga teste causa danos a células normais, tais como linfócitos (ZUCO *et al.*, 2002; ANAZETTI *et al.*, 2003). Desse modo, células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram utilizadas para avaliar a seletividade dos bufodienolídeos para células tumorais. Foi observado que todos os bufodienolídeos testados não exibiram seletividade para células tumorais, causando citotoxicidade também a CMSP. Entretanto, Daniel e colaboradores (2003) mostraram que bufodienolídeos modificados para remoção do sítio cardioativo não possuíam toxicidade para CMSP. Esta poderia ser uma abordagem utilizada para possíveis modificações em nossos compostos visando redução da citotoxicidade em CMSP. Cragg e colaboradores (2009) tem relatado que compostos naturais possuem alto potencial anticâncer, porém é necessário otimizar as estruturas por remoção, modificação, introdução de grupos funcionais e estereocentros, melhorando as propriedades dos compostos (COSERI, 2009; KINGSTON, 2008).

Ainda ao se considerar células normais, a citotoxicidade dos bufodienolídeos foi avaliada em linhagens celulares normais murinas (L929, V79 e J774) onde todas amostras testadas não foram citotóxicas ($CI_{50} > 5 \mu\text{g/mL}$). Isso se deve ao fato de diferenças entre subunidades Na^+/K^+ -ATPase encontradas em humanos e roedores. A bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+ -ATPase) possui duas subunidades principais: a subunidade α catalítica e a subunidade β regulatório, cada uma possuindo mais 4 subtipos. Dessa forma, a diversidade de Na^+/K^+ -ATPase se dá pela combinação desses 8 tipos de subunidades (Mijatovic *et al.*, 2007). No entanto, a maioria dos glicosídeos cardíacos, incluindo os bufodienolídeos, tem maior afinidade para a subunidade α_3 que está presente em células humanas, mas não em células de roedores (Newman *et al.*, 2008). Assim, como grande parte dos efeitos citotóxicos exercidos por bufodienolídeos tem ligação com Na^+/K^+ -ATPase, nossas amostras não se mostraram tóxicas para células de murinos.

Para os estudos de mecanismo de ação de atividade antiproliferativa foi escolhido o bufodienolídeo hellebrigenina (BUF-08) para determinação de mecanismo de ação utilizando-se as concentrações de 0,03, 0,06 e 0,12 μM , valores determinados com base na CI_{50} do composto. A linhagem leucêmica HL-60 foi escolhida para a realização dos testes, uma vez que hellebrigenina não foi específica para nenhuma linhagem tumoral testada. Essa é uma linhagem celular bem estabelecida para avaliação dos efeitos de drogas na proliferação

celular, ciclo celular, diferenciação celular e eventos apoptóticos (COLLIN, 1987; MILITÃO *et al.*, 2006).

O surgimento de um tumor pode ser consequência de vários fatores, dentre os quais estão a herança genética e os fatores ambientais (raios UV, poluição, alimentação, estresse, etc.) que podem desencadear um acúmulo de alterações gênicas que não conseguiram ser reparadas e agregam a célula características moleculares próprias de um câncer (desdiferenciação, alto grau de mitose e, dentre outros, mecanismos de proteção contra a morte celular programada, como apoptose) (DANIAL, 2007; BUCHAKJAN & KORNBLUTH, 2010). Portanto, a importância do desenvolvimento de fármacos que consigam ativar este mecanismo de morte celular. Diversas alterações morfológicas da célula podem ser sugestivas de apoptose; redução do volume celular, condensação da cromatina e fragmentação internucleossomal do DNA, formação de “blebbins” na membrana plasmática e, finalmente, fragmentação celular, formando os corpos apoptóticos (REED, 2000, 2001; GREEN & KROEMER, 2005; KROEMER *et al.*, 2005; MELLIER *et al.*, 2010).

As células em apoptose mantêm suas membranas integras durante quase todo o processo até sua morte, diferentemente das necróticas, que, morfológicamente, apresentam perda da integridade de membrana, a célula fica túrgida e o DNA é degradado aleatoriamente (CHO *et al.*, 2010; HENRIQUEZ *et al.*, 2008). O que pode ser identificado nos resultados obtidos por citometria de fluxo, mostrado na **figura 11**, no qual o composto helebrigenina reduziu o número de células viáveis de forma concentração-dependente, confirmando assim os resultados obtidos no ensaio do MTT. O estudo da integridade de membrana também foi feito por citometria de fluxo. As células HL-60 foram incubadas com a amostra e após 24 horas procedeu-se a análise no citômetro, mostrando uma redução no tamanho celular e na granulosidade em padrão concentração-dependente. Este resultado pode ser observado na **figura 12**, onde se destaca a redução do número de células com morfologia normal. Percebe-se ainda a manutenção da integridade de membrana apenas na menor concentração (0,03 μM), quando observamos os histogramas da **figura 13**, além da análise da **figura 12**, que mostra uma alteração de integridade nas doses de 0,06 e 0,12 μM .

Os resultados de proliferação corroboram com estudos prévios do nosso grupo onde helebrigenina mostrou redução do número de células viáveis pelo teste de azul de tripan, bem como diminuição da proliferação celular por incorporação de BrdU em células da linha HL60 (SOARES, 2011). Huang e colaboradores (2012) relataram diminuição do número de células viáveis por bufalina através de citometria de fluxo em células de câncer de bexiga (T24).

Uma característica bioquímica importante na detecção da apoptose é a externalização da fosfatidilserina (PS), presente na região interna da bicamada lipídica (BRATON *et al.*, 1997). O uso de anexina V, uma proteína recombinante que interage forte e especificamente com os resíduos de fosfatidilserina, pode ser usada na identificação deste evento (ARUR *et al.*, 2003).

A utilização do teste da anexina V, mostrado nas **figuras 13 e 15**, foi realizado a fim de caracterizar bioquimicamente a indução da apoptose. Os resultados apresentados na **figura 16** revelam que a externalização da fosfatidilserina ocorre de forma menos intensa que no controle positivo, mas mesmo assim significativa e de forma dose-dependente a partir da concentração de 0,06 μ M. Assim como várias autores relataram apoptose por bufalina e outros bufodienolídeos, inclusive por utilização de anexina (DANIEL *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2012; NASU *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2009; TAKAI *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2008). Em estudos anteriores nosso grupo demonstrou que hellebrigenina foi capaz de induzir apoptose em células de leucemia HL-60 em baixas concentrações (μ M) por ensaio de acridina laranja e alterações morfológicas (SOARES, 2011).

A ativação de endonucleases está associada ao processo de apoptose e resulta em extensa clivagem (quebra) do DNA (VERMES *et al.*, 2000), que pode ser detectada por citometria de fluxo, utilizando o corante iodeto de propídeo. A análise da fragmentação do DNA (**Tabela 5**), provocada pelas concentrações 0,06 e 0,12 μ M, mostrou produção de níveis significativos de DNA/sub-G1 (DNA fragmentado ou condensado). Daniel e colaboradores (2003) também mostraram aumento de DNA fragmentado para vários bufodienolídeos em células Jukart.

Como característica típica da apoptose, a fragmentação internucleossomal de DNA é, costumeiramente, atribuída às caspases, enzimas pertencentes à família das cisteínas proteases dependentes de Ca^{2+} e Mg^{2+} que tem a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (STRASSER *et al.*, 2000). Existem duas vias mediadas por caspases para ativação da apoptose, a via extrínseca e a intrínseca. A primeira delas, também chamada de via mediada por receptor de morte, desempenha um importante papel na homeostase tecidual, especialmente na resposta imune e é iniciada pela ativação da caspase iniciadora 8, enquanto que a outra, também conhecida como via dependente da mitocôndria é usada extensivamente na resposta a agravos intracelulares, tais como danos ao DNA e é induzida pela ativação da caspase iniciadora 9 (DANIAL & KORSMEYER, 2004).

No presente estudo foram avaliadas a caspase iniciadora 8 e caspases efetoras 3 e 7. Hellebrigenina foi capaz de ativar caspases apenas na maior dose (0,12 μM), em contraste do que foi encontrado na externalização de fosfatidil serina e fragmentação de DNA que indicavam apoptose já na segunda dose (0,06). O que pode indicar o envolvimento de outros fatores na indução de apoptose. Como forma de analisar se hellebrigenina está ativando a via intrínseca da apoptose, foram realizados estudos de despolarização de mitocôndria. O bufodienolídeo foi capaz de despolarizar as membranas da mitocôndria apenas na maior dose da mesma forma que os ensaios para detecção de caspases. Caspases podem ser ativadas por citocromo c liberado pela mitocôndria quando despolarizada. O citocromo c interage com o fator ativador de apoptose Apaf 1, resultando em sua oligomerização e recrutamento de procaspase 9, que se torna auto ativada com o chamado apoptossomo (BUDIARDJO *et al.*, 1999). A caspase 9 proteoliticamente ativa as caspases efetoras incluindo caspase 3 e 7 que, por sua vez, estimulam a fragmentação do DNA por DNAses (LIU *et al.*, 1996).

Alguns autores mostraram o envolvimento de bufalina e outros bufodienolídeos na ativação de caspases iniciadoras e efetoras, bem como despolarização mitocondrial em diversas linhagens tumorais. (DANIEL *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2008).

Diferentes tratamentos que induzem apoptose podem ser ciclo-específicos ou não, mas todos podem de alguma forma influenciar este processo (ORMEROD, 2002). Em nossas análises de ciclo celular, hellebrigenina foi capaz de induzir parada no ciclo celular em G2/M (**Tabela 5**) em todas as concentrações testadas provavelmente como consequência da geração e reparo de quebras de fita dupla de DNA. Em geral, a bufalina causa parada do ciclo celular na fase G1/G0 em diferentes linhagens tumorais (HUANG *et al.*, 2012; NASU *et al.*, 2005; TAKAI *et al.*, 2008). No entanto, em células de leucemia, bufalina obteve resultados semelhantes aos nossos em relação ao ciclo celular (NUMAZAWA *et al.*, 1994; JING *et al.*, 1994). Bufotionina, uma alcaloide encontrado em um extrato de pele sapo, também foi capaz de induzir parada do ciclo em G2/M em células de câncer hepático (XIE *et al.*, 2012).

Os checkpoints que verificam dano em DNA foram identificados nos limites das fases G1/S e G2/M bem como durante a fase e potencialmente durante a mitose. No entanto, parada em G2/M é uma característica de composto que induzem quebra de dupla fita (BARTEK & LUKAS, 2007; JEGGO & LOBRICH, 2006).

Dessa forma, para entender melhor a correlação entre um possível efeito de dano no DNA com a parada em G2/M causada por hellebrigenina, nós investigamos a genotoxicidade

desse bufodienolídeo através do ensaio alcalino do cometa, utilizado geralmente para detectar quebra de fitas de DNA (única e dupla) (KING *et al.*, 1993; CAVALCANTI *et al.*, 2006). As quebras de dupla fita da molécula de DNA são lesões difíceis de serem reparadas, podendo culminar na morte celular ou em mutações deletérias, além disso, as quebras de fitas simples podem ser convertidas em quebras duplas durante o progresso da forquilha de replicação. (KHANNA; JACKSON, 2001; KUZMINOV, 2001).

Diferente do que se esperava, a exposição de hellebrigenina em células de HL-60 não resulta em quebras de fita de DNA. O índices de dano ao DNA das culturas tratadas foram semelhantes aos do grupo controle. Apesar dos mecanismos de parada do ciclo celular de hellebrigenina permanecerem desconhecidos, vários pesquisadores tem demonstrado que a bufalina não induziu dano ao DNA (DOMINGUEZ *et al.*, 2001; PASTOR *et al.*, 2002; 2003).

É importante ressaltar que as topoisomerases são os principais alvos para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer devido o papel essencial que essas enzimas desempenham para o processo de proliferação celular. Até o momento, muitos compostos com atividade inibitória de topoisomerase, como a doxorubicina, etoposídeo e camptotecina, têm sido relatados ou comercializados para o tratamento do câncer (CHO *et al.*, 2009). O desenvolvimento de inibidores de topo II é bem atrativo porque é a única enzima disponível que desembaraça os problemas topológicos em cromossomos, que podem surgir durante o termino da replicação, e para deconcatenação dos cromossomos duplicados por introdução quebras momentâneas em fitas duplas de DNA. Além disso, topo II participa de vários processos nucleares que geram problemas de ordem topológica (CHAMPOUX, 2001).

As topoisomerases humanas são geralmente classificadas como tipos I e II, são enzimas nucleares essenciais para a proliferação celular uma vez que resolvem os obstáculos topológicos relacionados com a duplicação do DNA. A topoisomerase do tipo I (topo I) é responsável pela quebra e junção somente de uma fita de DNA duplex aliviando a tensão topológica dos cromossomos. No caso da topo II humana, esse relaxamento ocorre por corte e religação de ambas as fitas de DNA (NITISS, 2009a). Existem diferenças consideráveis entres topo I e topo II. A mais distintas entre essas diferenças é a seguinte: a topo I é uma enzima monomérica e não contem nenhum íon de metal em sua composição; já a topo II é homodimérica e requer magnésio (MgII) e hidrólise de ATP para a enzima exercer rapidamente sua função (NITISS, 2009b).

Uma vez que os inibidores de topoisomerase I causam quebra de apenas uma fita de DNA (single strand breaks – SSBs), e geralmente causam danos as cromátides, enquanto

quebras de dupla fita são associadas com inibidores de topoisomerase II que também podem levar a quebras de cromossomos (BACKER *et al.*, 1990). Enquanto aberrações do tipo cromossômicas resultam de danos de dupla fita não reparados ou reparados incompletamente geralmente gerados *in vivo* em linfócitos G0/G1 por clastógenos independente de fase S, quebras de cromátides costumam surgir *in vitro* durante a fase S de linfócitos em cultura em resposta a modificações e quebra de fita única induzidas *in vivo* por clastógenos dependentes de fase S (ALBERTINI *et al.*, 2000; HAGMAR *et al.*, 2004). Em nossos dados, aberrações cromossômicas não foram observadas em cultura de linfócitos tratados com hellebrigenina.

Os clássicos inibidores de topoisomerase muitas vezes chamados de ‘venenos’ representam alguns dos mais eficientes e prescritos fármacos anticâncer utilizados no tratamentos de neoplasias humanas, atuam matando as células por estabilização dos complexos de clivagem, formados pela droga, enzima e DNA (LIU, 1989). Um outro grupo de drogas vem ganhando notoriedade recentemente por agirem como inibidor catalítico ‘verdadeiro’ por prevenir que a topoisomerase II consiga os suprimentos necessário para realizar suas funções fisiológicas. Esses compostos interferem o ciclo catalítico da enzima, mas diferente dos ‘venenos’ eles não tem a capacidade de se ligar aos complexos de clivagem e dessa forma não induzem quebra de fita de DNA (ANDOH & ISHIDA, 1998; LARSEN *et al.*; 2003). Assim, baseado na similaridade das estruturas químicas entre bufalina e hellebrigenina e a ausência de danos no DNA e anormalidades citogenéticas, nós decidimos investigar afinidade da hellebrigenina e a topoisomerase II humana por docking molecular.

A topo II humana é formada por um domínio de ligação ATP N-terminal, domínio de ligação/quebra de DNA conhecido como domínio central, e uma cauda C-terminal. O domínio de ligação a ATP é bem conservado evolutivamente e pertence a família GHKL (Girase, Hsp90, Histidina Quinase, MutL) (CHO *et al.*, 2010; CORBETT & BERGER, 2004). Topo II utiliza a energia gerada da hidrólise do ATP para completar a replicação. Portanto, tem sido feito esforços para desenvolver inibidores catalíticos de topo II por atenuação da atividade da ATPase pelo bloqueio do ATP no sitio de domínio de ligação a ATP da topo II. Um inibidor de ATPase como um inibidor catalítico de topo II pode ser considerado como uma abordagem benéfica para tratamentos anticâncer em termos de baixa toxicidade de dano ao DNA e o coincidente potencial atividade inibitório de Hsp90 em oncologia (FURET *et al.*, 2009).

O *docking* molecular é uma ferramenta *in silico* utilizada para prever a orientação preferida de uma molécula em relação à outra na formação de um complexo estável em determinado momento. O conhecimento da orientação preferida de determinada molécula

pode ser útil para prever a energia de ligação entre duas moléculas. O *docking* é frequentemente usado para prever a ligação de pequenas moléculas candidatas a droga ao ser alvo proteico ou sua afinidade. Dessa forma o *docking* tem um papel importante no desenvolvimento de novas drogas principalmente sintéticas ou semi-sintéticas (Kitchen *et al.*, 2004). Nossa análise de *docking* molecular nos mostrou conformação de baixa energia para ligação de hellebrigenina e topoisomerase II humana, sendo compatível com a hipótese que o ligante pode ser um possível inibidor catalítico da enzima estudada.

Um balanço entre efeitos terapêuticos e toxicológicos é importante enquanto se avalia o potencial terapêutico de determinada droga. No que se refere aos efeitos adversos da quimioterapia, é essencial saber se o composto exerce efeito prejudicial em células saudáveis como os linfócitos (ZUCOT *et al.*; 2002; ANAZETTI *et al.*, 2003). Nesse contexto, hellebrigenina não se mostrou seletiva para células tumorais, uma vez que o efeito tóxico contra linfócitos periféricos humanos também foi observado em doses similares às encontradas para as células tumorais. Devido à falta de seletividade entre células cancerígenas e células saudáveis, hellebrigenina tem um limitado potencial terapêutico como agente anticâncer. Esses dados reforçam ainda que estudos com hellebrigenina e outros bufodienolídeos relacionados devam ser realizados ressaltando a relação de estrutura-atividade das atividades terapêuticas e toxicológicas.

6 CONCLUSÃO

Os bufodienolídeos extraídos de *Rhinella schneideri* possuem potente atividade citóxica para linhagens tumorais e ausência de genotoxicidade. Hellebrigenina foi capaz de induzir apoptose por meio de ativação de caspases e externalização de fosfatidilserina. O composto foi ainda capaz de se ligar ao sitio de ATPase da topoisomerase II humana, podendo atuar como inibidor catalítico. Dessa maneira, os bufodienolídeos em geral possuem potencial como moléculas anticâncer, suas modificações químicas podem ser importantes na busca por um composto mais seletivo para células tumorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANO, Y.; CHO, Y.; MATSUNAWA, M.; KOMIYAMA, K.; MAKISHIMA, M. Increased nuclear expression and transactivation of vitamin D receptor by the cardiotoxic steroid bufalin in human myeloid leukemia cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 114, p. 144-151. 2009

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). History of cancer. Disponível em: www.cancer.org. Acesso em: 18 Ago. 2010.

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.

ARNI, P.; HERTNER, T. Chromosomal aberrations in vitro induced by aneugens, **Mutat. Res.** v. 379, p. 83-93, 1997.

ARUR S, UCHE UE, REZAUL K, FONG M, SCRANTON V, COWAN AE, MOHLER W, HAN DK. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Dev Cell**. V. 4(4):587-98. 2003.

AWAD, A. B., CHINNAM, M., FINK, C. S., BRADFORD, P. G. β -Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. **Phytomedicine**. v. 14, p; 747-754, 2007.

BASTOS, R. O.; MOTTA, J. A. O.; LIMA, L. P.; GUIMARÃES, L. D. **Anfíbios da Floresta Nacional Silvânia, estado de Goiás**. 1ª edição. Goiânia. 2003. 82p.

BETTIN, C.; GREVEN, H. Bacteria on the skin of *Salamandra salamandra* (L.) (Amphibia, Urodela) with notes on their possible significance. **Zoologischer Anzeiger**. v. 216, p. 267–270, 1986

BICK, R.J., POINDEXTER, B.J., SWENEY, R.R., DASGUPTA, A. Effects of Chan Su, a traditional Chinese medicine, on the calcium transients of isolated cardiomyocytes: cardiotoxicity due to more than NaC, KC-ATPase blocking. **Life Sci**. v. 72, p. 699–709, 2002.

BRATTON DL, FADOK VA, RICHTER DA, KAILEY JM, GUTHRIE LA, HENSON PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. **J Biol Chem**. V.17;272(42):26159-65. 1997.

BUCHAKJIAN, M.R.; KORNBLUTH, S.; The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. **Nat Rev Mol Cell Biol**. V. 11(10):715-27. 2010.

BUDIARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 15, p. 269-290, 1999.

BUDIARDJO, I. *et al.* Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v. 15, p. 269-290, 1999.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR. V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** Savier, São Paulo. 1ª Ed., 2003. 469p

CAVALCANTI, B. C.; BEZERRA, D. P.; MAGALHÃES, H. I. F.; MORAES, M. O.; LIMA, A. S.; SILVEIRA, E. R.; CÂMARA, C. A. G.; V.S. RAO, PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells, **J. Appl. Toxicol.** v. 29, p. 560-568, 2009.

CEVIKBAS A. Antibacterial activity in the skin secretion of the frog *Ranaridibunda*. **Toxicon.** v. 16, p. 195–197, 1978.

CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism, **Annu. Rev. Biochem.** 70 (2001) 369e413;

CHO YS, PARK SY, SHIN HS, CHAN FK. Physiological consequences of programmed necrosis, an alternative form of cell demise. **Mol Cells.** V.29(4):327-32. 2010.

CHO, H. J.; JUNG, Y., KWON, Y. Oxiranylmethoxy or thiiranylmethoxy-azaxanones and -acridone analogues as potential topoisomerase I inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 19, p. 6766-6769 2009.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature.** v. 432, p. 829 – 837, 2004.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biol. Rev.** v. 72, p. 365–379, 1997.

COBERTT, K. D., BERGER, J. M. Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** v. 33, p. 95-118, 2004.

COCHRAN, D. M. Frogs of southeastern Brazil. **Bull US Nat Mus.** v. 206, p. 1-423, 1955.

COLLINS S. J. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. **Blood.** v. 70, p. 1233-1244, 1987.

COSERI, S.; Natural products and their analogues as efficient anticancer drugs. **Mini Rev Med Chem;** v. 9(5):560-71. 2009.

CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. (Ed.). **Anticancer agents from natural products.** Boca Raton, FL: Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, 2005.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J.; Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chem Rev;**, v.109(7): 3012-43. 2009.

CROUCH, N. R., TOIT, K., MULHOLLAND, D. A., DREWES, S. E. Bufadienolides from bulbs of *Urginea lydenburgensis* (Hyacinthaceae: Urgineoideae). **Phytochemistry**. v. 67, p. 2140-2145, 2006.

CROW, J. P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. **Nitric Oxide**. v. 1, p. 147–157, 1997.

CUNHA-FILHO, G. A. *et al.* Toxicity profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* paratoid gland secretion. **Toxicon**, v. 56, n. 3, p. 339-348, 2010.

CUNHA-FILHO, G. A.; RESK, I. S.; CAVACANTI, B. C.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; FERREIRA, J. R. O.; RODRIGUES, F. A. R.; SANTOS, M. L. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* paratoid gland secretion. **Toxicon**. v. 56, p. 339-348, 2010.

CURY-BOAVENTURA, M. F.; POMPÉIA, C.; CURI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. **Clinical nutrition**, v.23, n.4, p.721-732, 2004.

DALY J. W.; MYERS C. W.; WHITTAKER N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. **Toxicon**. v. 25, p. 1023–1095, 1987.

DALY, J. W. Marine toxins and non-marine toxins: convergence or symbiotic organisms, **J. Nat. Prod.** v. 67, p. 1211–1215, 2004.

DALY, J. W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.** v. 92, p. 9–13, 1995.

DANIAL NN.; BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. **Clin Cancer Res**. V.13(24):7254-63. 2007.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, p. 205-219, 2004.

DANIEL, D. *et al.* Apoptosis-mediated selective killing of malignant cells by cardiac steroids: maintenance of cytotoxicity and loss of cardiac activity of chemically modified derivatives. **International immunopharmacology**, v. 3, n. 13-14, p. 1791-801, dez. 2003.

DANIEL, D.; SUSAL, C.; KOPP, B.; OPELZ, G.; TERNESS, P. Apoptosis mediated selective killing of malignant cells by cardiac steroids: maintenance of cytotoxicity and loss of cardiac activity of chemically modified derivatives. **Int. Immunopharmacol.** v. 3, p. 1791-1801, 2003.

DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.* Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v.13, n.8, p.795-808, 1992.

DE ALMEIDA, V. L.; LEITAO, A.; REINA, L. C. B.; MONTARI, C. A.; DONNICI C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova.** v. 28, p. 118-129, 2005.

DOWNES, C. S.; CLARKE, D. J.; MULLINGER, A. M.; GIMÉNEZ-ABIÁN, J. F.; CREIGHTON, A. R.; JOHNSON, R. T. A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells. *Nature (London)*. v. 372, p. 467-470, 1994.

DUELLMAN, W.E. & TRUEB, L. **Biology of amphibians.** 1986. McGraw-Hill, New York.

FARBER, J. L.; KYLE, M. E.; COLEMAN, J. B. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Lab Invest.** v. 62, p. 670-9, 1990.

FICHER, P.; GLOVER, D. M.; LANE, D. P. Targeting cell cycle. **Drug Discov Today Therap Strateg.** v. 4, p. 417-423, 2004.

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

FROST, D. R. 2010. Amphibian Species of the World: an online reference. V. 5.4 (April 2010), acesso em 10 de maio de 2010. <http://resea.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.

FURET, P. *et al.* Discovery of a new class of catalytic topoisomerase II inhibitors targeting the ATP-binding site by structure based design. Part I. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 19, p. 4014-4017, 2009.

G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function, **J. Comput. Chem.** v. 19, p. 1639-1662, 1998.

GARRETT, M. D.; WORKMAN, P. Discovering Novel Chemotherapeutic Drugs for the Third Millennium. **Eur. J. Cancer,** v. 35, p. 2010-2030, 1999.

GIMÉNEZ-ABIÁN, J. F.; CLARKE, D. J.; MULLINGER, A. M.; DOWNES, C. S.; JOHNSON, R. T. A postprophase topoisomerase II-dependent chromatid core separation step in the formation of metaphase chromosomes. **J. Cell Biol.** v. 131, p. 7-17, 1995.

GREEN, D.R.; KROEMER, G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? **The Journal of Clinical Investigation,** v.115, p.2610-2617, 2005.

H. WEI, A.J. RUTHENBURG, S.K. BECHIS, G.L. VERDINE, Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase, **J. Biol. Chem.** v. 280, p. 37041-37047, 2005.

HAN K-Q, HUANG G, GU W, SU Y-H, HUANG X-Q, LING C-Q. Anti-tumour activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic transplantation tumour model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. **World J Gastroenterol.** v. 13, p. 3374-3379, 2007.

- HANAHAN, D., WEINGERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v.100, p.57-70, 2000.
- HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell cycle and cancer. **Science**. v. 266, p. 1821-8, 1994.
- HASHIMOTO, S.; JING, Y.; KAWAZOE, N.; MASUDA, Y.; NAKAJO, S.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y.; NAKAYA, K. Bufalin reduces the level of topoisomerase II in human leukemia cells and affects the cytotoxicity of anticancer drugs. **Leuk. Res.**, v. 21, p. 875-883, 1997.
- HAY, M. E.; FENICAL, W. Chemical Ecology and Marine Biodiversity: Insights and Products From The Sea . **Oceanography**. 1996. 10-20.
- HECK, M. M.; EARNSHAW, W. C. Topoisomerase II: a specific marker or cell proliferation, **J. Cell Biol.** v. 103: p. 2569-2581, 1986.
- HEMPEL, S. L., BUETTNER, G. R., O'MALLEY, Y. Q., WESSELS, D. A., FLAHERTY, D. M. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radic. Biol. Med.** v. 27, p. 146-159, 1999.
- HENRIQUEZ M, ARMISÉN R, STUTZIN A, QUEST AF. Cell death by necrosis, a regulated way to go. **Curr Mol Med**. V.8(3):187-206. 2008.
- HUANG, W.-W. *et al.* Bufalin induces G(0)/G(1) phase arrest through inhibiting the levels of cyclin D, cyclin E, CDK2 and CDK4, and triggers apoptosis via mitochondrial signaling pathway in T24 human bladder cancer cells. **Mutation research**, v. 732, n. 1-2, p. 26-33, 1 abr. 2012.
- HUTCHINSON, D. A., MORI, A., SAVITZKY, A. H., BURGHARDT, G. M., WU, X., MEINWALD, J., SCHROEDER, F.C. Dietary sequestration of defensive steroids in nuchal glands of the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. **Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.** v. 104, p. 2265-2270, 2007.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 98 p, 2011.
- IUCN. 2009. *2009 IUCN Red List of Threatened Species*. www.iucnredlist.org. Em 3 de abril de 2009.
- JING Y.; OHIZUMI H.; KAWAZOE N.; HASHIMOTO S.; MASUDA Y.; NAKAJO, et al. Selective inhibitory effect of bufalin on growth of human tumour cell in vitro: association with the induction of apoptosis in leukemia HL-60 cells. **Jpn J Cancer Res**. v. 85, p. 645-651., 1994A
- JING, Y. *et al.* Cell cycle arrest and protein kinase modulating effect of bufalin on human leukemia ML1 cells. **Anticancer Res**. v. 14, p. 1193-1198, 1994.

JING, Y.; WATABE, M.; HASHIMOTO, S.; NAKAJO, S.; NAKAYA, K. Cell cycle arrest and protein kinase modulating effect of bufalin on human leukemia ML1 cells. **Anticancer Res.** v. 14, p. 1193-1198, 1994.

KAMANO, Y., YAMASHITA, A., NOGAWA, T., MORITA, H., TAKEYA, K., ITOKAWA, H., SEGAWA, T., KRENN, L., KOPP, B. Bufadienolides from animal and plantsources. **Phytochemistry.** v. 48, p. 1–29, 1998.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica & Clínica*, Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 1998, p. 629-655.

KATZUNG, G.B. *Basic and Clinical Pharmacology*, 9th edn. McGraw-Hill Medical, United States of America, 2003. p.1088.

KAWAZOE N,WATABE M, NAKAY K, NAKAJO S, NAKAYA K. Tiam1 is involved in the regulation of bufalin-induced apoptosis in human leukemia cells. **Oncogene.** v. 18, p. 2413–2421, 1999.

KAWAZOE, N.; WATABE, M.; MASUDA, Y.; NAKAJO, S.; NAKAYA, K. Tiam 1 is involved in the regulation of bufalin-induced apoptosis in human leukemia cells. **Oncogene.** v. 18, p. 2413-2421, 1999.

KIM, H. W.; CHO, S. J.; KIM, B. Y.; CHO, S. I.; KIM, Y. K. Pogostemon cablin as ROS scavenger in oxidant-induced cell death of human neuroglioma cells. *eCAM Advance access* published on January 7, 2008.

KIM, H.; OH, S.; KIM, S. S. Recombinant human kringle-2 induces bovine capillary endothelial cell cycle arrest at G0/G1 phase through inhibition of cyclin D1/CDK4 complex: Modulation of reactive oxygen generation and up-regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors. **Angiogenesis**, v.8, n.4, p.307-314, 2005.

KINGSTON, D. G. A natural love of natural products. **J. Org. Chem.**, v. 73, 3975. 2008.

KINGSTON, D. G. I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: WERMUTH, C. G. (Ed.). **The Practice of Medicinal Chemistry**. London: Academic Press Limited, 1996. p. 102-114.

KITCHEN, D. B. *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-49, nov. 2004.

KLAUDE, M.; ERIKSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTROM, G. The Comet assay: mechanisms and technical considerations, **Mutat. Res.** v. 363, p. 89–96, 1996.

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

KROEMER, G.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M.E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKLONNY, M.V.; MALORNI, W.; KNIGHT, R.A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death and Differentiation**, v.12, p.1463-1467, 2005.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles Heel. **Cancer Cell**. v. 13, p. 472-482, 2008

KUMAR, V.; COTRAN, R. S. & ROBBINS, S. L. **Patologia básica**. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994.

KUZMINOV, A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 8241-8246, 2001.

LEBEL, C. P., ISCHIOPOULOS, H., BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2, 7-dichlorofluorescein as indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.** v. 5, p. 227-231, 1992.

LEE DY, YASUDA M, YAMMOTO T, YOSHIDA T, KUROIWA Y. Bufalin inhibits endothelial cell proliferation and angiogenesis in vitro. **Life Sci**. v. 60, p. 127-134, 1997.

LENGAUER, T. RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking". **Curr. Opin. Struct. Biol.** v. 6, p. 402-406, 1996.

LEVIN, D. A. The Chemical Defenses of Plants to Pathogens and Herbivores. **Ecol. Syst.** v. 7, p. 121-59, 1976.

LIU, X. *et al.* DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. **Cell**. v. 89, p. 175-184, 1997.

LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extract: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v. 86, p. 147-157, 1996.

LUO, J.; SOLIMINI, N.; ELLEDGE, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**. v. 6, p. 823-837, 2009.

M.F. Sanner, Python: a programming language for software integration and development, **J. Mol. Graphics Mod.** v. 17, p. 57-61, 1999.

MALLUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**, v. 9, p. 153-166, 2009.

MASUDA Y, KAWAZOE N, NAKAJO S, YOSHIDA T, KUROIWA Y, NAKAYA K. Bufalin induces apoptosis and influences the expression of apoptosis-related genes in human leukemia cells. **Leuk Res.** ; v. 19, p. 549-556, 1995.

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

MEHMET, H. Caspases find a new place to hide. **Nature**, v.403, n.6765, p.29-30, 2000.

MELLIER, G.; HUANG, S.; SHENOY, K.; PERVAIZ, S. TRAILing death in cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v.31, p.93-102, 2010.

MIJATOVIC, T. *et al.* Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1776, n. 1, p. 32-57, set. 2007.

MILITÃO, G. C. G., DANTAS, I. N. F. , PESSOA, C., FALCÃO M. J. C., SILVEIRA E. R., LIMA, M. A. S., CURI, R., LIMA, T., MORAES, M. O., COSTA-LOTUFO, L. V. Induction of apoptosis by pterocarpanes from *Plastymiscium foribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Science**. v. 78, p. 2409-2417, 2006.

MIYAMAE, Y., YAMAMOTO, M., SASAKI, Y. F., KOBAYASHI, H., IGARASHI-SOGA, M., SHIMOI, K., HAYASHI, M. Evaluation of a tissue homogenization that isolates nucleic acid for the in vivo single cell gel electrophoresis (Comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mutat. Res.** v. 418, p. 131–140, 1998.

MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell Res.** v. 20, p. 613-616, 1960.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. V. 65, p. 55-63, 1983.

MURAD, A. M.; KATZ, A.; **Oncologia Bases Clínicas do Tratamento**; Guanabara; Rio de Janeiro, p. 41.

NASU, K. *et al.* Bufalin induces apoptosis and the G0/G1 cell cycle arrest of endometriotic stromal cells: a promising agent for the treatment of endometriosis. **Molecular human reproduction**, v. 11, n. 11, p. 817-23, nov. 2005.

NEWMAN, R. A. *et al.* Robert A. Newman 1 , Peiyong Yang 1 , Alison D. Pawlus 1 , and Keith I. Block 2. **Animals**, p. 36-49, [s.d.].

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.

NICOLETTI, I. *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v.139, n.2, p.271-279, 1991.

NITISS, J. L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. **Nat. Rev. Cancer**. v. 5, p. 327-337, 2009b.

NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nat. Rev. Cancer.** v. 5, p. 338-350, 2009a.

NOGAWA, T. *et al.* Isolation and Structure of Five New Cancer Cell Growth Inhibitory Bufadienolides from the Chinese Traditional Drug Ch' an Su. **Cancer Cell**, n. 480, p. 1148-1152, 2001.

NOGAWA, T., KAMANO, Y., YAMASHITA, A., PETTIT, G.R. Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Ch'an su. **J. Nat. Prod.** v. 64, p. 1148–1152, 2001.

NUMAZAWA *et al.* Involvement of Na⁺,K⁺-ATPase inhibition in K562 cell differentiation induced by bufalin. **J Cell Physiol**, v. 160, p. 113-120, 1994.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat. Rev.** v. 4, p. 592-603, 2004.

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

ORTHOLAND, J. Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Curr. Opin. Chem. Biol. B**, v. 8, n. 3, p. 271-280, 2004.

PASTOR N, CORTE'S F. Bufalin influences the repair of x-ray-induced DNA breaks in Chinese hamster cells. **DNA Repair (Amst)**. v. 2, p. 1353–1360, 2003.

PASTOR, N.; DOMINGUEZ, I.; MATEOS, S.; CORTE'S, F. A comparative study of genotoxic effects of anti-topoisomerase II drugs ICRF-193 and bufalin in Chinese hamster ovary cells. **Mutat Res.** v. 515, p. 171–180, 2002.

PERA, F., MATTIAS, P., DETZER, K. Methods for determining the proliferation kinetics of cells by means of 5-bromodeoxyuridine. **Cell Tissue Kinetics.** v. 10, p. 255-264, 1977.

REED, J.C. Mechanisms of Apoptosis. **American Journal of Pathology**, v.157, p.1415-1430, 2000.

REIS, E. C. **Docking e análise do modo de ligação de três moléculas pequenas, um benzimidazol e dois compostos de crômio nos sulcos do DNA 5'-CGCGAATTCGCG-3.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Materiais) – Pós Graduação em Ciências e Tecnologia de Materiais, Universidade Estadual Paulista, Bauru.

RENZI, D., VALTOLINA, M., FOSTER, R. The evaluation of a multiendpoint cytotoxicity assay system. **Alternatives to Laboratory Animals.** v. 21, p. 89–96, 1993.

RICCI, M. S.; ZONG, W-X. Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. **Oncologist**, v.1, p.342-357, 2006

ROSSI, M.H., BLUMENTHAL, E.E.A., JARED, C. Bufadienolides from the venom of *Bufo paracnemis* (Amphibia, Anura, Bufonidae). **An. Assoc. Bras. Quím.** v. 46, p. 21-26, 1997.

SAVAGE, J. R. K. Classification and relationship of induced chromosome structural changes, **J. Med. Genet.** v. 13, p. 103-122, 1976.

SHAPIRO, H. M. **Practical Flow Cytometry**. New York : Ed Wiley-Liss, 1995.

SINGH, N. P.; MACCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. **Exp. Cell Res.** v. 175, p. 184–191, 1988.

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

SOBER, E. THE TWO FACES OF FITNESS. IN R. SINGH, D. PAUL, C. KRIMBAS, AND J. BEATTY (Eds.), **Thinking about Evolution: Historical, Philosophical, and Political Perspectives**. Cambridge University Press, 2001. pp.309-321.

STEYN, P.S., HEERDEN, F.R. Bufadienolides of plant and animal origin. **Nat. Prod. Rep.** v. 15, p. 397–413, 1998.

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

SUN, L. *et al.* Bufalin Induces Reactive Oxygen Species Dependent Bax Translocation and Apoptosis in ASTC-a-1 Cells. **Apoptosis**, n. 12, p. 1-12, 2009.

SUN, L.; CHEN, T.; WANG, X.; CHEN, Y; WEI, X. Bufalin induces reactive oxygen species dependent bax translocation and apoptosis in ASTC-a-1 cells. **eCAM**. p. 1-12, 2009.

TAKAI, N. *et al.* Bufalin induces growth inhibition , cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. **International Journal of Molecular Medicine**, p. 637-643, 2008.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F.; Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.** v. 35, p. 206–221, 2000.

TOLEDO, R.C., JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comp Biochem Physiol.** v. 111, p. 1–29, 1995.

TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug Discovery Today.** v. 9, p. 450-458, 2004.

TYLER, V. E.; BRADY, L. R.; ROBBERS, J. E. **Pharmacognosy**, 9th edn. Lea & Febiger, Philadelphia, 1988. pp. 1-4.

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

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **J. Immunol. Methods**, v.243, p.167-190, 2000.

WALL, M. E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharmacol.**, v.51, p. 239-254, 1996.

WANG, J.; JIN, Y.; XU, Z.; ZHENG, Z.; WAN, S. Involment of caspase-3 acitivity and survinin downregulation in cinobufocini-induced apoptosis in A 549 cells. **Exp Biol Med**. v. 234, p. 566-572, 2009.

WATABE, M.; MASUDA, Y.; NAKAJO, S.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y.; NAKAYA, K. The cooperative interaction of two different signalling pathways in response to bufalin induces apoptosis in human leukaemia U937 cells. **J. Biol. Chem**. v. 271, p. 14067-14073, 1996.

WATABE, M.; NAKAJO, S.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y.; NAKAYA, K.; Treatment of U937 cells with bufalin induces the translocation of Casein Kinase 2 and modulates the activity of topoisomerase II prior to the induction of apoptosis. **Cell Growth Difference**.; v. 8, p. 871-879, 1997.

WEINBERG, R. A. **The biology of cancer**. Garland Science, New York. 2007

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. Applications of total synthesis toward the discovery of clinically useful anticancer agents. **Chem. Soc. Rev.**, v. 36, p. 1207- 1226, 2007.

World Health Organization. Cancer (WHO). Fact sheet n° 297. April 2009. [homepage on the internet]. Geneva: World Health Organization; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>.

WU, P. L., HSU, Y. L., WU, T. S., BASTOW, K. F.; LEE, K. H. Kalanchosides A-C, new cytotoxic bufadienolides from the aerial parts of *Kalanchoe gracilis*. **Org. Lett**. v. 8, p. 5207- 5210, 2006.

XIE, R.-F. *et al.* Bufothionine, a possible effective component in cinobufocini injection for hepatocellular carcinoma. **Journal of ethnopharmacology**, v. 141, n. 2, p. 692-700, 1 jun. 2012.

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

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

YU, C. *et al.* Apoptotic signaling in bufalin- and cinobufagin-treated androgen-dependent and -independent human prostate cancer cells. **Cancer Science**, v. 99, n. 12, p. 2467-2476, 2008.

YUKITA, A., SAITO, K., KATSUYAMA, M., PETTIT, G.R. QSAR evaluation of the Ch'an Su and related bufadienolides against the colchicine-resistant primary livercarcinoma cell line PLC/PRF/5. **J. Med. Chem.** v. 45, p. 5440–5447, 2002.

ZELNIK R., ZITI L. M., GUIMARÃES, C. V. A chromatographic study of the bufadienolides isolate from the venom of the paratid glands of *Bufo paracnemis* (Lutz, 1925). **Jornal of Chromatography A**. v. 15, p. 9-14, 1964.

ZHANG L, NAKAYA K, YOSHIDA T, KUROIWA Y. Induction by bufalin of differentiation of human leukemia cells HL60, U937, and ML1 toward macrophage/monocyte-like cells and its potent synergistic effect on the differentiation of human leukemia cells in combination with other inducers. **Cancer Res.** v. 52, p. 4634–4641, 1992.

ZHANG LS, NAKAYA K, YOSHIDA T, KUROIWA Y. Bufalin as a potent inducer of differentialion of human myeloid leukemia cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 178, p. 686–693, 1991

ZHAO, J.; LIU, T.; MA, L.; YAN, M.; GU, Z. Y.; HUANG Y, et al. Antioxidant and preventive effects of extracts from *Numphaea candida* flower on *in vitro* immunological liver injury of rat primary hepatocyte cultures. **eCAM** Advance access published on February 5, 2009;

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