

Cod Acesso 129147
Reg: 14057099
Nota: 24/09/2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

FRANCISCO WASHINGTON ARAÚJO BARROS NEPOMUCENO

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE ALCALÓIDES SINTÉTICOS METOXIPIRRÓLICOS**

T 615.1
N362i
Br: 01

**FORTALEZA
2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FRANCISCO WASHINGTON ARAÚJO BARROS NEPOMUCENO

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE ALCALÓIDES SINTÉTICOS METOXIPIRRÓLICOS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa

Co-orientador: Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti

**FORTALEZA
2012**

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

N362i Nepomuceno, Francisco Washington Araújo Barros.
Investigação do potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo* de alcalóides sintéticos metoxipirrolínicos/ Francisco Washington Araújo Barros Nepomuceno – 2012.
175 f.: il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.
Orientação: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa.
Coorientação: Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti.

1. Apoptose 2. Toxicidade 3. Inibidores da Topoisomerase 4. Ensaios de Seleção de Medicamentos Antitumorais I. Título.

CDD 615.1

FRANCISCO WASHINGTON ARAÚJO BARROS NEPOMUCENO

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE ALCALÓIDES SINTÉTICOS METOXIPIRRÓLICOS**

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

Aprovada em: 31 / 08 / 2012

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti (Co-Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará

Profa. Dra. Silene Carneiro do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco

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

A Deus e a meus pais,
pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Claudia Pessoa**, que desde a iniciação científica mostrou que o seu interesse na minha formação não era apenas acadêmica, mas sim, para a vida. Respeito, humildade, coragem e perseverança foram algumas de suas muitas qualidades que identifiquei as quais “invejo”. Como resultado do que vivenciei ao seu lado, posso dizer que: a realização de um sonho pessoal não ocorre sem a orientação de pessoas especiais;

À Profa. Dra. **Leticia Veras Costa-Lotufo**, pelo companheirismo científico e exemplo de ética e responsabilidade;

Ao Prof. Dr. **Manoel Odorico de Moraes**, por ter sido um dos pioneiros na pesquisa oncológica experimental na Universidade Federal do Ceará;

Ao Dr. **Bruno Coêlho Cavalcanti**, por ser companheiro científico na posição de co-orientador deste trabalho, sempre zelando pelo primor da ciência. Agradeço os puxões de orelha, a disponibilidade para ajudar nos experimentos e a gentileza de compartilhar seus conhecimentos. Nossas conversas sobre casamento no Pirão não serão esquecidas;

Às professoras doutoras **Maria Izabel Florindo Guedes e Silene Carneiro do Nascimento**, por cordialmente aceitar em contribuir com sua experiência científica na consolidação deste trabalho;

Aos professores doutores **Roberto César e Thalles Grangeiro**, por terem atendido prontamente o convite para fazer parte de minha banca de doutorado como suplentes. Sei que é uma função delicada, mas, minha admiração e respeito vão além desse aceite;

Ao professor **Jairo Diniz**, por sempre estar disponível para participar dos meus exames de qualificação (mestrado e doutorado) contribuindo com orientações importantes concernentes à didática;

Ao Prof. Dr. **Martin Banwell** da Universidade Nacional Australiana, por ter sintetizado e cedido para estudo as moléculas que foram objeto de análise do presente trabalho;

Ao Prof. Dr. **Yves Pommier** do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, por sua importante colaboração nos estudos referentes as enzimas topoisomerases;

Ao Prof. Dr. **Paulo Michel**, por ser um referencial científico desde a minha iniciação científica. Ele fundamenta e justifica a minha fala quando digo que tive a honra de aprender com pessoas de alto nível científico;

À Profa. Dra. **Patricia Marçal**, pelos inúmeros momentos de amizade. É uma pessoa que inspira perseverança e vontade de vencer. Como você já sabe: sou seu fã!

Ao Prof. Dr. **Hemerson lury**, a lenda autárquica do LOE, pelo apoio em muitos momentos de dificuldade pessoal e acadêmica. Um exemplo de humildade e solidariedade. Hoje ele tá riiiiiiico em João Pessoa.

Ao sr. e sra. Marinho, **José Delano** e **Ana Jérсия**, pela troca de experiências científicas nos bastidores da realização deste trabalho. Um casal muito especial!

À pós-graduanda **Aline Sbardelotto**, que muito contribuiu com o meu modo de ver a vida a partir de seu comportamento e decisões. Segundo ela, as pessoas são mais importantes do que as coisas.

Ao mestre **Felipe Rocha**, por colaborar com a realização de muitos experimentos e tornar o ambiente de trabalho mais divertido e descontraído. Um parceiro!

Ao “grande homem” Dr. **Danilo Damasceno**, por mostrar que é possível ser garotão e cientista ao mesmo tempo. Se você quer um experimento perfeito, chame o Daniloso.

Ao Dr. **Daniel Viana**, por aceitar colaborar com o LOE contribuindo com todo seu conhecimento histopatológico em especial no estudo *in vivo* do presente trabalho.

Aos mais recentes grandes amigos adquiridos no ambiente acadêmico Profa. Dra. **Andrea Linard**, Profa. Dra. **Emília Chaves**, Profa. Dra. **Juliana Celestino** e Profa. Dra. **Jacqueline Freire**, pelo apoio fervoroso nesta fase tão importante da minha vida. Em especial, ao pós-graduando **Howard Ribeiro**, que nunca me deixou esquecer dos meus compromissos para a finalização deste trabalho dizendo: “meu

amigo, meu amigo, vamo trabalhar. Vamo deixar de moleza.” Foi muito importante pra mim. Um parceiro.

Aos Pós-Graduandos do Laboratório de Oncologia Experimental: **Arenice Costa, Adriana Carvalho, Bruno Soares, Cecília Carvalho, Elthon Gois, Evelyne Alves, Evelyne Simões, Igor Baiano, Marcília Costa, Paula Abreu, Kézia Lacerda e Stefânio Barreto**, por fortalecerem a família LOE.

Aos alunos de Iniciação Científica: **André Sales, Marcos Angelim, Sarah Sant’Anna, Sérgio Barros e Threissy Lima**. Em especial a **Daisy Lima** e ao **Igor Cabral**, pela disponibilidade para ajudar nos experimentos mais delicados e trabalhosos do presente trabalho. Vocês são nota 10;

Às secretárias **Adelânia Marinho** e **Sheyla Prado**, pela maneira prestativa e dedicada em ajudar no dia-a-dia do LOE, desde um simples telefonema até conselhos sobre a vida. São as meninas da *Batcaverna*. Ei, gente, cadê a minha estrelinha da água?

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: **Alana, Flávia, Fernando e Haroldo**. Em especial a **Aura Rhanes** e **Márcia Herminia**, pelo apoio fundamental em questões relacionadas à coordenação do programa de pós-graduação.

Aos técnicos: **Maria de Fátima** e **Rogéria Montenegro**. Em especial a **Erivanda França** e **Silvana França**, pela ajuda permanente dentro do laboratório e pelos bons momentos de descontração. Sem a família França, a UFC pára.

A meus irmãos em Cristo Jesus, **Emerson e Keilliane Melo, Edney e Rozana Melo, Aloísio e Kátia Vieira, Marco e Luciana Machado, Marcos Paulo e Ana Paula**, pela forma como cuidam de mim e contribuem com o meu crescimento como pessoa. Amo-os muito!

A minha maravilhosa esposa **Liliane Barros**, pela cumplicidade e maneira como me ensina a cada dia o que significa amar. Espero superar suas expectativas. Quero agradá-la, protegê-la, ser paciente e perseverante. Quero ser seu companheiro em todos os momentos: na saúde, na doença, na pobreza e na riqueza... Não escrevo isto por que é um agradecimento de tese, mas sim, porque te amo. Agora, a gente engravida!

A meus familiares por parte da esposa, **Helena e Luís Nepomuceno (sogros)**, **Hélcio e Denise Santos (cunhada)**, **Luís Eduardo (cunhado)**, **Mirelle e Lara Nepomuceno**, pelo aconchego familiar indispensável para qualquer pessoa. Com eles, percebi que o amor de pai, mãe e irmão pode ir além dos laços co-sanguíneos.

A minha querida mãe, **Maria da Conceição**, que me formou, alimentou, deu amor e até hoje cuida de mim com orações e ações cheias de amor intenso. Grande responsável pelo que sou.

A meu pai, **José Luís Barros**, pelo exemplo de coragem e superação em momentos de dificuldade. Com ele aprendi a ser organizado e articulador. Muito obrigado pai.

A meus irmãos, **Marcos Aurélio, Aleíne, Luciana, Denise, Camila e André**, com os quais cresci e me desenvolvi. Em especial a **Jonas Clei**, que sempre foi um protagonista em me incentivar a seguir a carreira acadêmica. Não esqueço da forma carinhosa de irmão com que me fazia sonhar com as grandes oportunidades oferecidas a quem estuda.

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

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Australian National University - ANA

Banco do Nordeste do Brasil - BNB

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa - FUNCAP

National Cancer Institute - NCI

Universidade Federal do Ceará - UFC

“Amarás o Senhor, teu Deus, de todo o teu coração, de toda a tua alma e de todo o teu entendimento ... Amarás o teu próximo como a ti mesmo.”

Jesus Cristo

(Mt 22: 37-39)

RESUMO

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL IN VITRO E IN VIVO DE ALCALÓIDES SINTÉTICOS METOXIPIRRÓLICOS

Tese de Doutorado. Autor: FRANCISCO WASHINGTON ARAÚJO BARROS NEPOMUCENO. Orientadora: Dra. Claudia do Ó Pessoa. Co-orientador: Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2012.

Os alcalóides naturais que apresentam o núcleo químico 4-metóxi-2,2'-bipirrol tem despertado crescente interesse dos pesquisadores em virtude de seu potencial biológico como antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários, imunossupressores e anticâncer. Oriundos principalmente de organismos marinhos e bactérias seus representantes incluem a classe prodigiosina e tambjamina. O presente estudo avaliou o potencial citotóxico de 7 alcalóides sintéticos pertencentes a classe tambjamina (Tambjamina C, E, F, G, H, I e J) em um painel de 4 linhagens de células tumorais humanas e em células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH) pelo teste do MTT. Com exceção de Tamb E, todos os compostos foram citotóxicos contra todas as linhagens utilizadas, sendo Tamb I e Tamb J as moléculas mais ativas com valores de $CI_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$. O estudo de mecanismo de ação de Tamb I e J (0,3 e 0,6 $\mu\text{g/mL}$), usando células leucêmicas humanas HL-60 como modelo experimental, demonstrou indução de morte celular por apoptose, fundamentalmente, por ativação da via extrínseca caracterizada por fragmentação do DNA, externalização da fosfatidilserina e ativação de caspases (3, 7, 8 e 9) determinadas por ensaios de coloração, fluorescência, citometria de fluxo e eletroforese. Adicionalmente, o composto Tamb J mostrou-se mais potente que Tamb I, especialmente após 24 h de exposição, o que também foi observado quando associado com trastuzumabe nos testes contra células que superexpressam o receptor ErbB-2. Nos ensaios de relaxamento do DNA, Tamb J foi capaz de inibir a atividade catalítica das enzimas topoisomerasas I e II o que explicaria, pelo menos parcialmente, seus efeitos citotóxicos. A avaliação antitumoral em camundongos transplantados com células Sarcoma 180 demonstrou taxas de inibição de crescimento tumoral de 39.9 e 78.8 % com as doses de 10 e 20 mg/kg/dia i.p. de Tamb J, respectivamente, após 7 dias de tratamento. O efeito antitumoral observado foi acompanhado de toxicidade moderada e reversível dos animais, principalmente na dose de 20 mg/kg/dia, caracterizada por redução do ganho de peso, letargia, diarreia, esplenotoxicidade (depleção linfocitária) e genotoxicidade (dano ao DNA e indução de micronúcleos). A grande maioria destas alterações assemelha-se à toxicidade dos quimioterápicos citotóxicos tradicionais que somado com os resultados obtidos nos testes *in vitro* para Tamb J, enfatizam a potencialidade destas moléculas como protótipo para a produção e/ou síntese de novos compostos com propriedades anticâncer.

Palavras-chave: alcalóides metoxipirrólicos; tambjamins; apoptose; atividade antitumoral; toxicidade.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF POTENTIAL ANTITUMOR *IN VITRO* AND *IN VIVO* AND METHOXY-PYRROLIC SYNTHETIC ALKALOIDS

Doctorate Thesis. Author: FRANCISCO WASHINGTON ARAUJO BARROS NEPOMUCENO. Advisor: Dr. Claudia do Ó Pessoa. Co-advisor: Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti. Postgraduate Program on Pharmacology. Faculty of Medicine, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, 2012.

The natural alkaloids that present the chemical core 4-methoxy-2, 2'-bipyrrole has attracted increasing interest from researchers because of their biological potential as antibacterial, antifungal, antiprotozoal, immunosuppressive and anticancer. Mainly from marine organisms and bacteria the class includes prodigiosin and tambjamine. This study investigated the cytotoxic potential of 7 synthetic alkaloids belonging to the tambjamine class (Tambjamine C, E, F, G, H, I and J) in a panel of four human tumor cell lines and peripheral blood mononuclear cells from human (PBMC) by MTT assay. Except for Tamb E, all compounds were cytotoxic against all the lines used, and Tamb I and Tamb J were the most active molecules with IC_{50} values $< 1 \mu\text{g/mL}$. The study of the mechanism of action of Tamb I and J (0.3 and 0.6 $\mu\text{g/mL}$), using human leukemia cells HL-60 as experimental model, demonstrated induction of apoptotic cell death, primarily by activation of the extrinsic pathway characterized by DNA fragmentation, externalization of phosphatidylserine and activation of caspases (3, 7, 8 and 9) determined by staining assays, fluorescence, flow cytometry and electrophoresis. In addition, Tamb J was more potent than Tamb I, especially after 24 h of exposure, which was also observed when combined with trastuzumab on tests against cells that overexpress the ErbB-2 receptor. In tests of DNA relaxation, Tamb J was able to inhibit the catalytic activity of the topoisomerase I and II enzymes which may explain, at least partially, its cytotoxic effects. The antitumor evaluation in mice transplanted with Sarcoma 180 cells demonstrated rates of tumor growth inhibition of 39.9 and 78.8% with doses of 10 and 20 mg/kg/day i.p. of the Tamb J, respectively, after 7 days of treatment. The antitumor effect observed was accompanied by moderate and reversible toxicity of animals, especially at a dose of 20 mg/kg/day, characterized by decreased weight gain, lethargy, diarrhea, spleen toxicity (lymphocyte depletion) and genotoxicity (DNA damage and micronuclei induction). The majority of these modifications are similar to the toxicity observed on the traditional cytotoxic agents, which putting together to the results obtained in vitro tests for Tamb J emphasize the potential of these molecules as template for the production and/or synthesis of new compounds with anticancer properties.

Keywords: methoxy-pyrrolic alkaloids; tambjamines; apoptosis; antitumor activity; toxicity.

LISTA DE FIGURAS

1.	Os marcos do câncer.....	25
2.	Topoisomerases humanas e seu mecanismo de ação.....	31
3.	Relaxamento de DNA por topoisomerases I (Y).....	32
4.	Estrutura química de camptotecina.....	33
5.	Inibidores de topoisomerases tipo I.....	34
6.	Inibidores de topoisomerases tipo II.....	35
7.	Efeito de ansacrina sobre a atividade catalítica das enzimas humanas topoisomerases I e II (Topo I e II h). As imagens mostram o padrão diferenciado de corrida eletroforética de DNA relaxado e super-enovelado.....	37
8.	Ação do agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) sobre diferentes tipos de DNA obtidos pela ação das enzimas topoisomerases.....	38
9.	Núcleo químico característico da classe tambjamina.....	39
10.	Estrutura química da prodigiosina.....	41
11.	Padrão de dano ao DNA para o ensaio cometa.....	68
12.	Fotomicrografia de linfócitos binucleados portando micronúcleos.....	76
13.	Eritrócito normocromático (A), eritrócito policromático(B) e eritrócito policromático micronucleado (C).....	80
14.	Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre a viabilidade de células HL-60 determinado pelo teste do azul de tripan após 3, 6, 12 e 24 h de incubação.....	86
15.	Efeito de tambjamina I (Tamb I - 0,3 µg/mL, C ; 0,6 µg/mL, D) e J (Tamb J - 0,3 µg/mL, E ; 0,6 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HL-60 determinado por coloração com May-Grünwald-Giemsa após 24 h de incubação.....	88
16.	Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre a indução de morte celular de células HL-60 determinado por coloração diferencial com Brometo de Etídio e Laranja de Acridina, após 3, 6, 12 e 24 h de incubação.....	90

17.	Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre o a integridade de membrana citoplasmática de células HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, respectivamente, após 3, 6, 12 e 24 h de incubação.....	92
18.	Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre o a viabilidade de células HL-60 determinado por citometria de fluxo, usando o FSC (<i>Forward scatter</i> – desvio da luz para frente) e SSC (<i>Side Scatter</i> – desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após 3, 6, 12 e 24 h de incubação.....	93
19.	Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre o potencial transmembrânico de mitocôndrias de células HL-60 determinado por citometria de fluxo, usando rodamina 123, após 3, 6, 12 e 24 h de incubação.....	94
20.	Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre a externalização da fosfatidilserina de células HL-60 determinado por citometria de fluxo, usando anexina-V e 7-amino-actinomicina-D (7-AAD), após 24 h de incubação.....	99
21.	Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre a ativação da caspase iniciadora -8 de células HL-60 determinado por citometria de fluxo, usando FLICA e 7-amino-actinomicina-D (7-AAD), após 24 h de incubação.....	101
22.	Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre a ativação da caspase iniciadora -9 de células HL-60 determinado por citometria de fluxo, usando FLICA e 7-amino-actinomicina-D (7-AAD), após 24 h de incubação.....	102
23.	Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre a ativação das caspases efetoras -3/-7 de células HL-60 determinado por citometria de fluxo, usando FLICA e 7-amino-actinomicina-D (7-AAD), após 24 h de incubação.....	103

24.	Ação de tambjamina J sobre a enzima topoisomerase I no relaxamento de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG), por eletroforese horizontal em gel de agarose 1 %.....	106
25.	Ação de tambjamina J sobre a enzima topoisomerase II no relaxamento de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG), por eletroforese horizontal em gel de agarose 1 %.....	107
26.	Efeito de tambjamina I e J na ausência (A) e presença (B) de trastuzumabe (50 µg/mL) sobre a atividade clonogênica de linhagens celulares humanas que expressam o receptor ErbB-2 em níveis diferentes, após 5 h de incubação.....	111
27.	Efeito de tambjamina I e J , na presença e ausência de trastuzumabe (50 µg/mL), sobre o DNA de linhagens celulares humanas que expressam o receptor ErbB-2 em níveis diferentes, após 24 h de incubação.....	112
28.	Efeito de tambjamina I e J , na ausência e presença de trastuzumabe (50 µg/mL), sobre o DNA de linhagens celulares humanas que expressam o receptor ErbB-2 em níveis diferentes, após 72 h de incubação.....	113
29.	Efeito do anticorpo monoclonal trastuzumabe (10, 50 e 100 µg/mL) sobre a indução de formação de micronúcleos (MN) em linhagens celulares humanas que expressam o receptor ErbB-2 em níveis diferentes após 24 h de incubação.....	114
30.	Efeito de tambjamina I (Gráfico A) e J (Gráfico B), na ausência (10) e presença (10+) de trastuzumabe (50 µg/mL) sobre a indução de formação de micronúcleos (MN) em linhagens celulares humanas que expressam o receptor ErbB-2 em níveis diferentes, após 24 h de incubação.....	115
31.	Efeito genotóxico e mutagênico de tambjamina J (Tamb J) em camundongos Swiss machos transplantados com Sarcoma 180 e tratados via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos.....	122

32.	Análise histológica do fígado de camundongos Swiss machos adultos transplantados com Sarcoma 180 e tratados via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia, painel D e E) durante 7 dias consecutivos com tambjamina J (Tamb J).....	123
33.	Análise histológica dos rins de camundongos Swiss machos adultos transplantados com Sarcoma 180 e tratados via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia, painel D e E) durante 7 dias consecutivos com tambjamina J (Tamb J).....	124
34.	Análise histológica do baço de camundongos Swiss machos adultos transplantados com Sarcoma 180 e tratados via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia, painel D e E) durante 7 dias consecutivos com tambjamina J (Tamb J).....	125
35.	Análise histológica do tumor Sarcoma 180 de camundongos Swiss machos adultos tratados via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia, painel E e F) durante 7 dias consecutivos com tambjamina J (Tamb J).....	126
36.	Resumo dos resultados da investigação do potencial antitumoral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos alcalóides sintéticos tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J).....	148

LISTA DE TABELAS

1.	Estimativa para 2012 dos tipos de câncer mais incidentes na população brasileira, exceto pele não melanoma.....	28
2.	Estrutura química dos primeiros 10 alcalóides bipirrólicos descobertos pertencentes à classe tambjamina.....	40
3.	Estrutura química dos alcalóides sintéticos pertencentes à classe tambjamina avaliadas neste estudo.....	53
4.	Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> por meio do teste do MTT.....	54
5.	Linhagens celulares normais humanas utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> por meio do teste do MTT.....	55
6.	Atividade citotóxica de tambjamins (Tambjamins C, E, F, G, H, I e J) em linhagens tumorais humanas e em células normais pelo teste do MTT, após 72 h de incubação.....	83
7.	Atividade hemolítica de tambjamins (Tambjamins C, E, F, G, H, I e J) em eritrócitos de camundongos Swiss (<i>Mus musculus</i>) após 1 e 2 h de incubação....	84
8.	Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 3, 6 e 12 h de incubação.....	96
9.	Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 24 h de incubação.....	97
10.	Efeito de tambjamins I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre o DNA de células HL-60 pelo ensaio cometa, após 24 h de incubação.....	104
11.	Atividade citotóxica de tambjamins I e J , na ausência e presença de trastuzumabe, em linhagens celulares humanas que expressam o receptor ErbB-2 em níveis diferentes pelo teste do MTT, após 24 h e 72 h de incubação.....	110

12. Atividade antitumoral de tambjamina J (**Tamb J**) e seus efeitos sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos Swiss machos transplantados com Sarcoma 180 e tratados via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. O controle negativo recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 10 %). O quimioterápico ciclofosfamida (20 mg/kg/dia) foi usado como controle positivo..... 119
13. Perfil bioquímico plasmático do sangue periférico de camundongos Swiss machos adultos tratados com **tambjamina J** via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. O controle negativo recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 10 %). O quimioterápico ciclofosfamida (20 mg/kg/dia) foi usado como controle positivo..... 120
14. Perfil hematológico do sangue periférico de camundongos albinos Swiss machos adultos tratados com **tambjamina J** via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. O controle negativo recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 10 %). O quimioterápico ciclofosfamida (20 mg/kg/dia) foi usado como controle positivo..... 121

LISTA DE ABREVIATURAS

µg/mL	Micrograma por mililitro
7-AAD	7-amino-actinomicina-d
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	<i>Analysys of variance</i> (análise de variância)
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
AST	Aspartato aminotransferase
BE/LA	Brometo de etídio/laranja de acridina
BrdU	Bromodeoxiuridina
CE₅₀	Concentração capaz de provocar 50 % do efeito máximo
CI₅₀	Concentração Capaz de Inibir 50 % do Crescimento Celular
CMSPH	Células mononucleares de sangue periférico humano
COMPEPE/UFC	Comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Ceará
CPT	Camptotecina
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dox	Doxorrubicina
E.P.M.	Erro padrão da média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FADD	<i>Fas associated protein with death domain</i>
FIC	Fenil isotiocianato
FLICA	<i>Fluorescent labeled inhibitor of caspases</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
h	Hora
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
i.p.	Intraperitoneal

IC 95 %	Intervalo de confiança
ID	Índice de dano
IP	Iodeto de propídeo
IT %	Percentual de inibição do crescimento tumoral
min	Minuto
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
NCI/USA	<i>National Cancer Institute/United States of America</i>
nm	Nanômetro
°C	Grau centígrado
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
PI₃K	Fosfoinositideo 3 quinase
PS	Fosfatidilserina
QDC	Quinases dependentes de ciclina
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SCGE	<i>Single Cell Gel Electrophoresis Assay</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfato</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
Tamb	Tambjamina
Top1	Topoisomerase I
Top2	Topoisomerase II
U	Unidade
UNIFAC-UFC	Unidade de Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará
UV	Ultra-Violeta
VP-16	Etoposido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
1.1	Câncer.....	24
1.1.1	Considerações gerais.....	24
1.1.2	Epidemiologia do câncer.....	26
1.1.3	Estratégias em busca de novas moléculas anticâncer.....	29
1.2	Topoisomerases como alvo terapêutico no câncer.....	30
1.3	Alcalóides tambjamins.....	39
2	OBJETIVOS.....	44
2.1	Objetivo geral.....	44
2.2	Objetivos específicos.....	44
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1	Material.....	46
3.2	Métodos.....	53
3.2.1	Obtenção das tambjamins.....	53
3.2.2	Manutenção das linhagens celulares humanas em cultura	54
3.2.3	Obtenção de células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH).....	55
3.2.4	Obtenção e cuidado dos animais de laboratório	56
3.2.5	Determinação da atividade e da seletividade citotóxica em linhagens celulares humanas (tumoriais e normais) - Teste do MTT..	56
3.2.6	Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos Swiss (<i>Mus musculus</i>) - Teste Hemolítico.....	56
3.2.7	Avaliação do padrão de morte celular e do efeito sobre a progressão do ciclo celular	58
3.2.7.1	Determinação da viabilidade celular - Teste do Azul de Tripan.....	59
3.2.7.2	Análise morfológica - Coloração com May-Grünwald-Giemsa.....	60
3.2.7.3	Análise morfológica - Coloração diferencial com Brometo de Etídio/Laranja de Acridina.....	61
3.2.7.4	Testes utilizando citometria de fluxo.....	62
3.2.7.5	Avaliação do dano no DNA - Ensaio Cometa.....	67

3.2.8	Determinação da ação sobre as enzimas topoisomerase I e II - Ensaio de Relaxamento do DNA.....	69
3.2.9	Avaliação da influência do receptor ErbB-2 sobre o efeito citotóxico, antiproliferativo, genotóxico e mutagênico.....	70
3.2.9.1	Teste do MTT.....	71
3.2.9.2	Teste da Atividade Clonogênica.....	72
3.2.9.3	Teste do Cometa.....	73
3.2.9.4	Teste do Micronúcleo <i>in vitro</i>	75
3.2.10	Identificação do efeito antitumoral e da toxicidade <i>in vivo</i>	77
3.2.10.1	Análise do perfil bioquímico e hematológico.....	78
3.2.10.2	Observações histopatológicas.....	78
3.2.10.3	Determinação do potencial genotóxico - Ensaio Cometa <i>in vivo</i>	79
3.2.10.4	Determinação do potencial mutagênico - Teste do Micronúcleo <i>in vivo</i>	79
4	RESULTADOS.....	82
4.1	Determinação da atividade e da seletividade citotóxica em linhagens celulares humanas (tumorais e normais).....	82
4.2	Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos Swiss (<i>Mus musculus</i>).....	84
4.3	Avaliação do padrão de morte celular e do efeito sobre a progressão do ciclo celular.....	85
4.3.1	Determinação da viabilidade celular.....	85
4.3.2	Análise morfológica.....	86
4.3.3	Testes utilizando citometria de fluxo.....	91
4.3.4	Avaliação do dano no DNA.....	104
4.4	Determinação da ação sobre as enzimas topoisomerase I e II.....	105
4.5	Avaliação da influência do receptor ErbB-2 sobre o efeito citotóxico, antiproliferativo, genotóxico e mutagênico.....	108
4.6	Identificação do efeito antitumoral e da toxicidade <i>in vivo</i>	116
5	DISCUSSÃO.....	128
6	CONCLUSÃO.....	150

7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152
ANEXO A	Trabalho publicado 1: Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Synthetically Derived Tambjamines C and E–J, BE-18591, and a Related Alkaloid from the Marine Bacterium <i>Pseudoalteromonas tunicata</i>.....	172
ANEXO B	Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE - UFC).....	173
ANEXO C	Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA - UFC).....	174

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

1.1.1 Considerações gerais

A descrição mais antiga do câncer foi descoberta no Egito e data de aproximadamente 1600 a.C.. O papiro encontrado continha a descrição de 8 casos de tumores ou úlceras de mama que foram tratados por cauterização. A origem da palavra câncer é creditada ao médico grego Hipócrates (460-370 a.C.), considerado o “pai da medicina”. No grego, a palavra escolhida por Hipócrates significa caranguejo e está associada a uma analogia entre o crescimento infiltrante do câncer e a forma como esse crustáceo se prende ao solo usando suas patas. Hipócrates também usou os termos carcinos e carcinoma para descrever tumores não-ulcerosos e ulcerosos, respectivamente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009).

Atualmente, o câncer é considerado uma doença complexa caracterizada pela instabilidade genética de células que tem a capacidade de se multiplicar descontroladamente. Segundo Hahn e Weinberg (2002), as alterações genéticas (mutações) envolvem a amplificação e/ou supra-expressão de oncogenes aliada a deleção e/ou silenciamento epigenético de genes supressores de tumor. Neste sentido, é possível dizer que as mutações no câncer promovem a reativação ou a modificação de programas celulares que coordenam processos relacionados a embriogênese e a homeostasia como: proliferação, migração, diferenciação e apoptose (LUO *et al.*, 2009).

As células de câncer são diferentes das células normais por apresentarem potencial proliferativo ilimitado, auto-suficiência para os sinais de crescimento e resistência aos sinais antiproliferativos e apoptóticos. Formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), invasão tecidual e capacidade de sofrer metástase são outras propriedades que podem ser acrescentadas (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Recentes trabalhos tem mostrado (**Figura 1**) a adição de outras características que são: fuga do sistema imune (KROEMER; POUYSSEGUR, 2008) e fenótipos de estresse (metabólico, proteotóxico, mitótico, oxidativo e de dano ao DNA) (LUO *et al.*, 2009).

Hanahan e Weinberg (2011), considerando o progresso conceitual no entendimento da biologia do câncer na última década, publicaram um trabalho de revisão que revalida os seis marcos do câncer registrados por eles em 2000, e estabelece a adição de 4 marcos que são: estresse energético, instabilidade genômica, evasão do sistema imune e promoção tumoral por inflamação (Figura 1).

Com esse perfil, as células cancerosas tornam-se menos especializadas em suas funções e, aos poucos, substituem as células normais comprometendo o funcionamento dos órgãos e levando, quase sempre, o indivíduo à morte (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

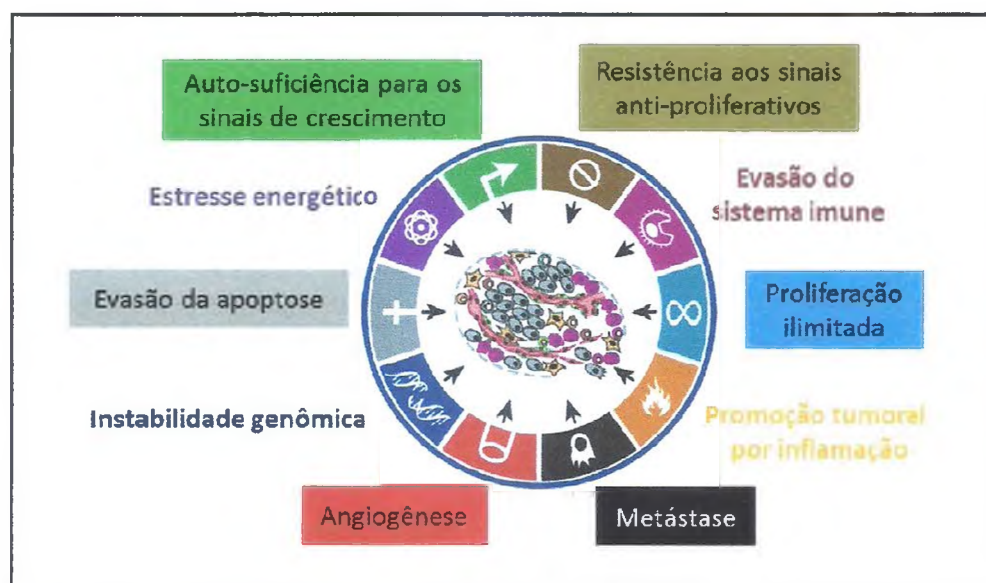


Figura 1 - Os marcos do câncer.

Fonte: adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

A nível molecular, o acúmulo de mutações observado na célula de câncer é capaz de promover defeitos no ciclo celular por desregulação de quinases dependentes de ciclina (QDC). Normalmente, as QDCs são ativadas por ciclinas e coordenam o processo mitótico durante a divisão de uma célula. A progressão correta do ciclo celular é monitorada por pontos de checagem que detectam possíveis erros durante a síntese de DNA ou segregação cromossômica. No ponto de checagem, QDCs específicas são inibidas e o ciclo celular é parado momentaneamente para que o defeito no DNA, caso exista, seja reparado antes da formação das células-filhas. Quando o erro não pode

ser reparado, existem duas opções: ou a célula torna-se senescente, ou sofre morte por apoptose. Em muitos tumores humanos, as QDCs da divisão celular encontram-se continuamente ativadas e, nessa condição, a célula de câncer prolifera indefinidamente e passa adiante suas mutações, bem como, acumula outras aberrações genéticas. Estas evidências demonstram, em parte, a oncogênese molecular e comprovam a origem monoclonal do câncer (MALUMBRES; BARBACID, 2001; MALUMBRES; BARBACID, 2005; KASTAN; BARTEK, 2004; BARTEK *et al.*, 2004; MALUMBRES; BARBACID, 2009; LUO *et al.*, 2009).

A transformação de uma célula normal em célula cancerosa é, geralmente, um processo lento que ocorre em várias etapas. Este processo, conhecido como carcinogênese, pode ser iniciado espontaneamente, por fatores ambientais ou de forma hereditária. Dentre esses, a exposição a fatores ambientais (produtos químicos, radiação e vírus) é a causa mais comum de câncer, com destaque para a carcinogênese química. A carcinogênese química, que tem na poluição, no tabagismo e na dieta seus principais fatores de risco, pode ser didaticamente dividida em 4 etapas: iniciação, promoção, conversão maligna e progressão. Assim, medidas preventivas individuais e coletivas como, por exemplo, o controle do tabagismo, para os cânceres tabaco-relacionados, e a vacinação para a hepatite, para o câncer de fígado, são formas eficazes para se evitar os efeitos maléficos do câncer (DOLL; PETO, 1981; REDDY *et al.*, 2003; RIEGER, 2004).

1.1.2 Epidemiologia do câncer

Como exposto no tópico anterior, o câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas levando ao comprometimento do funcionamento dos órgãos.

Hoje, são conhecidos quase 200 tipos de câncer, correspondendo aos vários sistemas e células do corpo, os quais se diferenciam pela velocidade de multiplicação e a capacidade de invadir tecidos e órgãos, próximos ou distantes de onde se originaram (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Neste sentido, a vigilância, bem como, a avaliação de seu desempenho, é um dos componentes fundamentais para o planejamento e o monitoramento

da efetividade de programas de controle dos diversos tipos de câncer. O estabelecimento de medidas efetivas no controle do câncer necessita de informações de qualidade sobre sua distribuição de incidência e mortalidade, o que possibilita uma melhor compreensão sobre a doença e seus determinantes (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2009).

Em 2008, a Organização Mundial da Saúde estimou que ocorreriam 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Destes, os mais incidentes foram o câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), mama (1,29 milhões) e cólon e reto (1,15 milhões). Devido ao mau prognóstico, o câncer de pulmão foi a principal causa de morte (1,31 milhões), seguido pelo câncer de estômago (780 mil óbitos) e pelo câncer de fígado (699 mil óbitos). Para América do Sul, Central e Caribe, estimou-se em 2008 cerca de um milhão de casos novos de câncer e 589 mil óbitos. Em homens, o mais comum foi o câncer de próstata, seguido por pulmão, estômago e cólon e reto. Nas mulheres, o mais frequente foi o câncer de mama, seguido do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão (WHO, 2008).

Seguindo tendência mundial, notam-se, no Brasil, processos de transição que têm produzido importantes mudanças no perfil das enfermidades que acometem a população, observando-se, a partir dos anos 1960, que as doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte, sendo substituídas pelas doenças do aparelho circulatório e pelas neoplasias. Essa progressiva ascensão da incidência e da mortalidade por doenças crônico-degenerativas, conhecida como transição epidemiológica, tem como principal fator o envelhecimento da população, resultante do intenso processo de urbanização e das ações de promoção e recuperação da saúde (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2011).

No Brasil, tem-se a particularidade de dimensões territoriais muito grandes que levam a marcadas diferenças regionais, sejam nos aspectos culturais, sociais e econômicos; seja na ocorrência das patologias e na distribuição dos fatores de risco associados a essas diferenças.

Assim, torna-se fundamental a existência de Registros de Câncer (de base populacional e hospitalar) com informações padronizadas, atualizadas, com boa qualidade, representativas da população e disseminadas de forma

oportuna, como uma ferramenta poderosa para a vigilância epidemiológica do câncer no país.

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem os casos de câncer da pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2011).

São esperados um total de 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Confirma-se a estimativa que o câncer da pele do tipo não melanoma (134 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (Tabela 1) (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2011).

Os 5 tumores mais incidentes para o sexo masculino (Tabela 1) serão o câncer de pele não melanoma (63 mil casos novos), próstata (60 mil), pulmão (17 mil), cólon e reto (14 mil) e estômago (13 mil). Para o sexo feminino (Tabela 1), destacam-se, entre os 5 mais incidentes, os tumores de pele não melanoma (71 mil casos novos), mama (53 mil), colo do útero (18 mil), cólon e reto (16 mil) e pulmão (10 mil) (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2011).

Tabela 1 - Estimativa para 2012 dos tipos de câncer mais incidentes na população brasileira, exceto pele não melanoma.

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	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%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (2011).

A distribuição dos casos novos de câncer segundo sua localização primária é bem heterogênea entre Estados e Capitais do País. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto que as regiões Norte e Nordeste mostram as menores taxas. Já as taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2011).

Diante desse cenário, fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação 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).

1.1.3 Estratégias em busca de novas moléculas anticâncer

As estratégias para o desenvolvimento de novas drogas anti-câncer tem mudado ao longo dos anos. Os programas de *screening* começaram no início dos anos 50 no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-EUA), e consistiam no teste inicial de novos compostos, principalmente produtos naturais, em camundongos inoculados com leucemias L1210 e P388. Esse modelo foi bastante questionado, uma vez que não era considerado representativo dos tumores humanos, na sua maioria tumores sólidos (SCHWARTSMANN; WORKMAN, 1993).

O modelo foi reconsiderado e, atualmente, os programas de *screening* do NCI-EUA incluem uma etapa inicial de testes *in vitro* em linhagens tumorais humanas utilizando técnicas automatizadas (High throughput screening). Em seguida, os compostos selecionados são submetidos ao teste do Hollow Fiber antes de serem avaliados em modelos xenográficos de tumores humanos. O Hollow Fiber combinado ao modelo xenográfico constituem o modelo básico do teste antitumoral pré-clínico *in vivo*. Todo esse contexto acelerou a pesquisa de novas drogas anticâncer, levando a uma grande demanda por bibliotecas de novas e promissoras moléculas (NEWMAN *et al.*, 2003; CRAGG *et al.*, 2009).

Muitas companhias farmacêuticas são dotadas de estrutura capaz de realizar o *screening* rápido de inúmeros compostos em relação a muitas

atividades biológicas simultaneamente (citotoxicidade, antibacteriana, antiinflamatória e antiviral). Os testes são desenvolvidos com o mínimo de intervenção humana, sendo o trabalho realizado, em sua maioria, por sistemas robóticos acoplados a novas técnicas de fluorescência, ressonância magnética nuclear e de DNA. Os compostos testados são oriundos de 3 fontes principais: material natural (por exemplo, plantas, microorganismos e animais), síntese química regular e química combinatória (MANN, 2002; CRAGG *et al.*, 2009).

Nesse contexto, surge a necessidade continuada do desenvolvimento de bioensaios rápidos e sensíveis para detectar os defeitos específicos moleculares (alvos específicos - biomarcadores) das células de cada tipo de câncer. Dessa maneira, novos ensaios de *screening* anticâncer devem ser produzidos e terapias mais sofisticadas devem ser implementadas, semelhante ao que acontece com a pesquisa voltada ao combate do vírus HIV (POMMIER, 2007).

1.2 Topoisomerasas como alvo terapêutico no câncer

Na década de 1980, muitas drogas anticâncer que interferem no ciclo catalítico das enzimas topoisomerasas humanas foram desenvolvidas. Como exemplo, podemos citar a doxorrubicina, o etoposido e a camptotecina que são utilizados até hoje no tratamento de pacientes com câncer. Desde então, estas enzimas celulares assumiram a categoria de alvo terapêutico no câncer e passaram a fomentar a pesquisa de novas drogas anticâncer em todo o mundo (CUMMINGS; SMYTH, 1993).

Biologicamente, as topoisomerasas são enzimas celulares capazes de alterar a topologia de segmentos do DNA por meio de um ciclo catalítico, resumidamente, dividido em 3 passos sequenciais: clivagem (função nucleasse), passagem e religação (função ligase) da fita de DNA. Sua função é reduzir a tensão no DNA em virtude dos processos biológicos de replicação, transcrição, recombinação e segregação cromossômica no ciclo celular (OSHEROFF; ZECHIEDRICH; GALE, 1991).

O genoma humano codifica seis tipos de topoisomerasas que são agrupados em duas classes (classe tipo I e classe tipo II). A classe tipo I é subdividida em tipo IA (Top3 α e Top3 β) e tipo IB (Top1 e Top1mt), e a classe

tipo II é composta pelas isoformas Top2 α e Top2 β (FORTERRE *et al.*, 2007; SCHOEFFLER; BERGER, 2008; WANG, 2009) (Figura 2).

Independente da classe, todas as topoisomerases clivam a fita do DNA por ataque nucleofílico de um resíduo de tirosina do sítio ativo da enzima ao grupo fosfato do DNA, desfazendo a ligação fosfodiéster que une os nucleotídeos. O corte da fita do DNA permite a sua movimentação, sob o controle da enzima, que é responsável por reduzir a tensão sobre a molécula. Em seguida, a topoisomerase religa a fita, agora relaxada, garantindo a integridade do material genético. É importante registrar que a ligação da enzima com o DNA é de natureza covalente (POMMIER *et al.*, 2010) (Figura 2).

A diferença fundamental entre as enzimas tipo I e tipo II está relacionada ao passo correspondente à clivagem da fita do DNA (Figura 2). As topoisomerases tipo I (ou simplesmente topoisomerases I) clivam uma fita da dupla hélice de DNA por vez o qual é imediatamente relaxado e religado. Já as topoisomerases tipo II (ou simplesmente topoisomerases II) clivam, simultaneamente, as duas fitas da dupla hélice de DNA antes da religação e tem a capacidade de promover o relaxamento de DNA super-enovelado (POMMIER *et al.*, 2010).

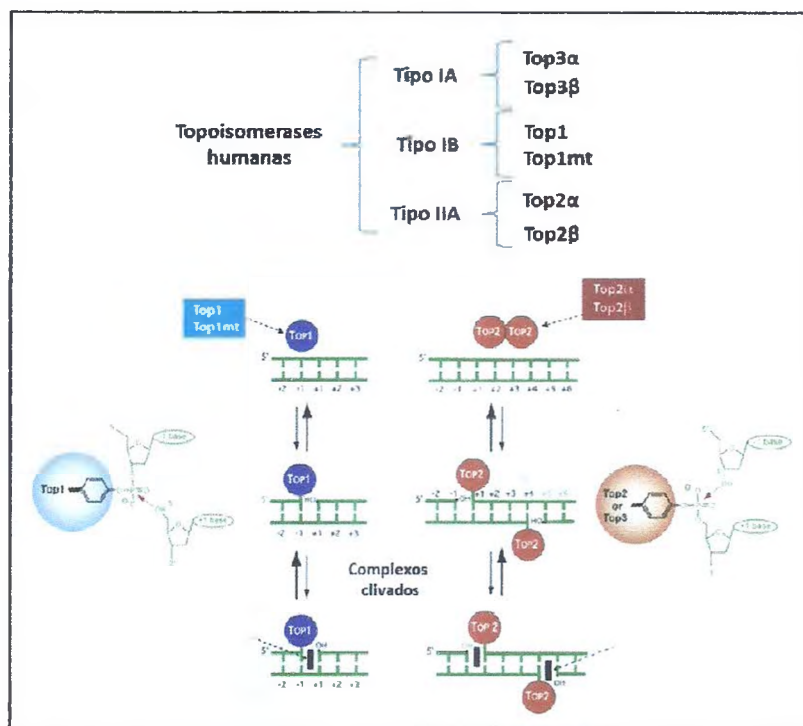


Figura 2 - Topoisomerases humanas e seu mecanismo de ação.

Fonte: adaptado de Pommier *et al.* (2010).

Drogas anticâncer que tem como alvo as enzimas topoisomerases geralmente interferem no ciclo catalítico da enzima no passo correspondente à religação do DNA. Na presença dessas drogas, o processo é interrompido com consequente formação de complexos clivados (DNA + Enzima + Droga) que configuram dano na molécula do DNA. O dano no DNA explica, por sua vez, muitos dos efeitos citotóxicos dessas drogas que levam a célula à morte, dando-lhes o status de “poison”, que do inglês significa veneno (D'ARPA; LIU, 1989).

Em se tratando de topoisomerases I, sabe-se que todos os eucariontes codificam pelo menos a enzima Top1 (Tipo IB) (POMMIER *et al.*, 2010). Esta enzima nuclear é essencial em *Drosophila* e vertebrados, como pode ser observado no trabalho de Morham *et al.* (1996) que registrou a morte precoce de embriões de camundongos “knockout” para Top1 antes do estágio de oito células. Por outro lado, já existem linhagens celulares mantidas em cultura que apresentam uma sub-expressão de Top1 a disposição dos pesquisadores: uma linhagem celular de murino (p388/CPT45), resistente a camptotecina (CPT), e duas linhagens celulares humanas, com expressão da enzima entre 10 - 20 % (ENG *et al.*, 1990; MIAO *et al.*, 2007; TUDURI *et al.*, 2009). É importante registrar que essas linhagens acumulam alterações genômicas espontâneas, bem como, defeitos de replicação. Isto fortalece a importância biológica da enzima nuclear Top1 na manutenção da integridade do DNA (Figura 3).

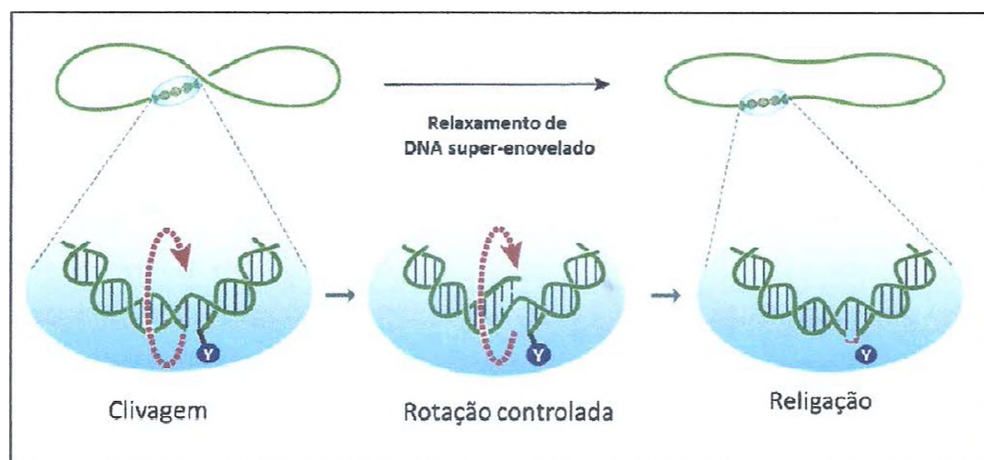


Figura 3 - Relaxamento de DNA por topoisomerases I (Y).

Fonte: adaptado de Pommier *et al.* (2010).

Em 1966, foi isolada e caracterizada a principal droga capaz de interferir seletivamente na ação catalítica de Top1 com consequente formação de complexos clivados de DNA. Trata-se do “poison” camptotecina (CPT) que é um alcalóide originalmente isolado da planta chinesa *Camptotheca acuminata*, o qual demonstrou forte atividade antitumoral em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (**Figura 4**). Em ensaios com camundongos, CPT demonstrou uma considerável atividade no aumento da sobrevivência dos animais tratados com células leucêmicas L1210 ou células leucêmicas P388, quando doses entre 0,5 e 4,0 mg/kg foram administradas. Além disso, a inibição de tumores sólidos, incluindo o tumor de Walker, também foi observada (HSIANG *et al.*, 1985; WALL *et al.*, 1966; WALL; WANI, 1995).

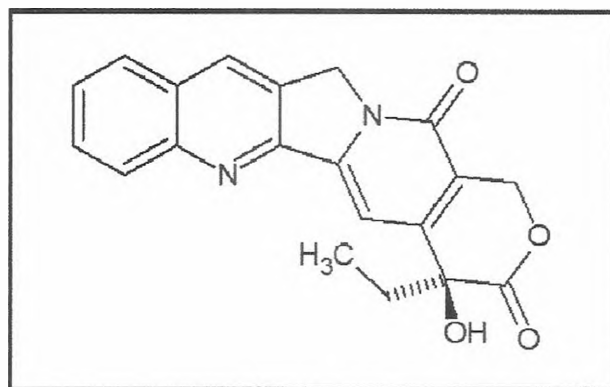


Figura 4 - Estrutura química de camptotecina.

Fonte: adaptado de Pommier *et al.* (2010).

Entretanto, estudos clínicos demonstraram ausência de resposta terapêutica de CPT associada à alta incidência de efeitos adversos (mielossupressão, cistite hemorrágica, náuseas, vômitos e diarreia). Análises químicas e farmacocinéticas identificaram a baixa solubilidade em água e a instabilidade estrutural em pH fisiológico e em plasma (maior limitação) como os principais fatores que explicam este fato (MOUKHARSKAYA; VERSCHRAEGEN, 2012).

Apesar disso, o interesse na classe camptotecina como fonte de drogas anticâncer não parou e muitos derivados de CPT foram desenvolvidos com o intuito de manter o efeito anticâncer e superar as limitações supracitadas.

Nesse sentido, três derivados de CPT estão aprovados para uso clínico que são: topotecano, irinotecano e belotecano. Os derivados gimatecano, lurtotecano e exatecano, por sua vez, ainda estão em triagem clínica. Apesar de todo o esforço, esses derivados, em graus diferentes, ainda conservam a instabilidade em meio fisiológico, mas já apresentam vantagens nos aspectos solubilidade em água e toxicidade (Figura 5) (POMMIER *et al.*, 2010).

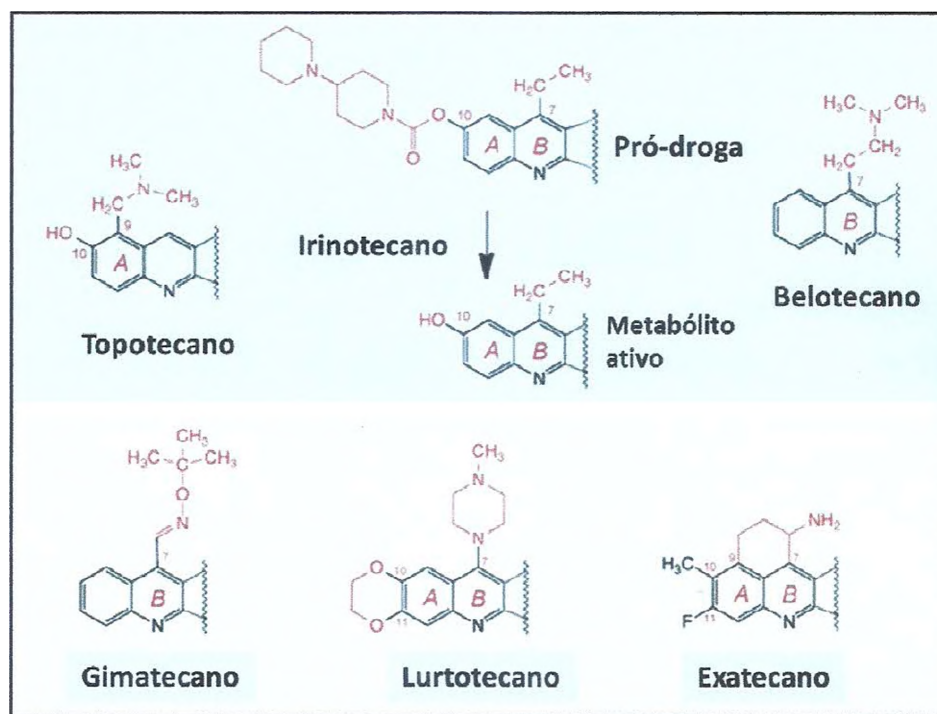


Figura 5 - Inibidores de topoisomerases tipo I.

Fonte: adaptado de Pommier *et al.* (2010).

Outro ponto a ser superado está relacionado com os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células cancerosas com o intuito de reduzir o efeito desses compostos. Nesse aspecto, as células de câncer podem adquirir pelo menos três mecanismos de resistência: super-expressão de bomba de efluxo, redução dos níveis de Top1 e mutações na enzima Top1 (BRANGI *et al.*, 1999; POMMIER *et al.*, 1999).

Em se tratando de topoisomerases II, sabe-se que os humanos tem a capacidade de codificar duas isoenzimas (Top2 α e Top2 β). Estas enzimas são normalmente super-expressas em células em proliferação com os maiores níveis na fase G₂/M do ciclo celular. Top2 α relaxa mais efetivamente DNA

super-enovelado positivamente, enquanto que Top2 β relaxa DNA super-enovelado negativamente. É importante registrar que estas enzimas agem como homodímeros e necessitam de Mg²⁺ e ATP para realizar suas funções biológicas (MCCLENDON; RODRIGUEZ; OSHEROFF, 2005).

As drogas anticâncer que agem sobre as topoisomerases II podem ser classificadas de acordo com o mecanismo de ação. Aquelas que induzem a formação de complexos clivados (DNA + Enzima) por intercalação ou não no DNA são denominadas de "poisons", como descrito anteriormente. Neste caso, ocorre quebra de fita dupla do DNA. Já as drogas que impedem a ligação da enzima com o DNA no início do processo são denominadas de inibidores catalíticos não havendo, portanto, a formação de complexos clivados. Como consequência da tensão em virtude da dinâmica metabólica, o DNA também sofrerá degradação (CUMMINGS; SMYTH, 1993).

Etoposido, teniposido, doxorubicina, daunorrubicina, amsacrina, TAS-103, CP-115,953, elipticina, azatoxina e mitoxantrona são exemplos de inibidores de Top2 por formação de complexos clivados (Figura 6). Por outro lado, ICRF 159 e 187 são classificados como inibidores catalíticos de Top2 (Figura 6) (POMMIER *et al.*, 1984; TEWEY *et al.*, 1984; FORTUNE; OSHEROFF, 2000).

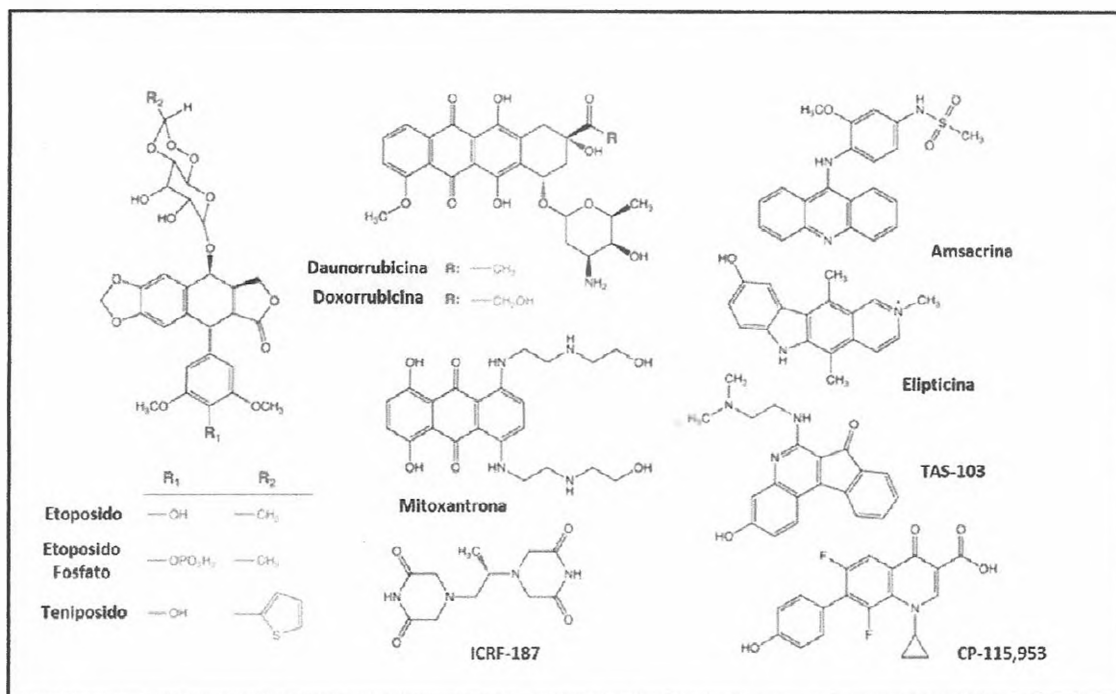


Figura 6 - Inibidores de topoisomerases tipo II.
Fonte: adaptado de Pommier *et al.* (2010).

Similar ao que ocorre com as drogas que inibem Top1, muitos mecanismos de resistência celular já foram descritos para drogas que afetam o metabolismo de Top2. Nitiss (2009a; 2009b) apresenta super-expressão de bomba de efluxo, redução dos níveis de Top2, mudança da localização intracelular da enzima, fosforilação e mutações de Top2 como exemplos desses mecanismos.

Recentemente, os estudos tem buscado associar o uso de inibidores de mecanismos de reparo do DNA com o, de inibidores de topoisomerases. A intenção é elaborar um tratamento mais específicos para células tumorais, já que células normais não possuem mecanismos de reparo de DNA capazes de resolver danos muito severos como os, observados em células tumorais (POMMIER, 2007).

Outra estratégia importante consiste em identificar e utilizar compostos capazes de inibir ambas as enzimas topoisomerases (I e II). Isto tornaria o tratamento mais eficaz, uma vez que a inibição específica de uma das enzimas promove, geralmente, como resistência a super-expressão da outra (SALERNO *et al*, 2010).

Assim, baseado no potencial das enzimas topoisomerases como alvo terapêutico do câncer, mesmo com muitas dificuldades a serem superadas, como os mecanismos de resistência, por exemplo, muitos trabalhos tem sido publicados demonstrando a ação inibitória de diversos compostos sobre essas enzimas. Nesses estudos, observa-se a utilização de DNA isolado submetido a uma corrida eletroforética na presença de topoisomerase e compostos-teste. Após marcação com brometo de etídeo, é possível comparar o padrão de corrida eletroforética que é diretamente relacionado com o tipo de DNA submetido à diferença de potencial. Portanto, a técnica baseia-se na corrida diferencial de DNA super-enovelado, DNA relaxado, complexos clivados de fita simples de DNA e complexos clivados de fita dupla de DNA após interrupção da reação com forte agente desnaturante (Dodecil sulfato de sódio, SDS, por exemplo) (**Figura 7**) (ADJEI *et al.*, 1998; HOLDEN, 2001; OPPEGARD *et al.*, 2009).

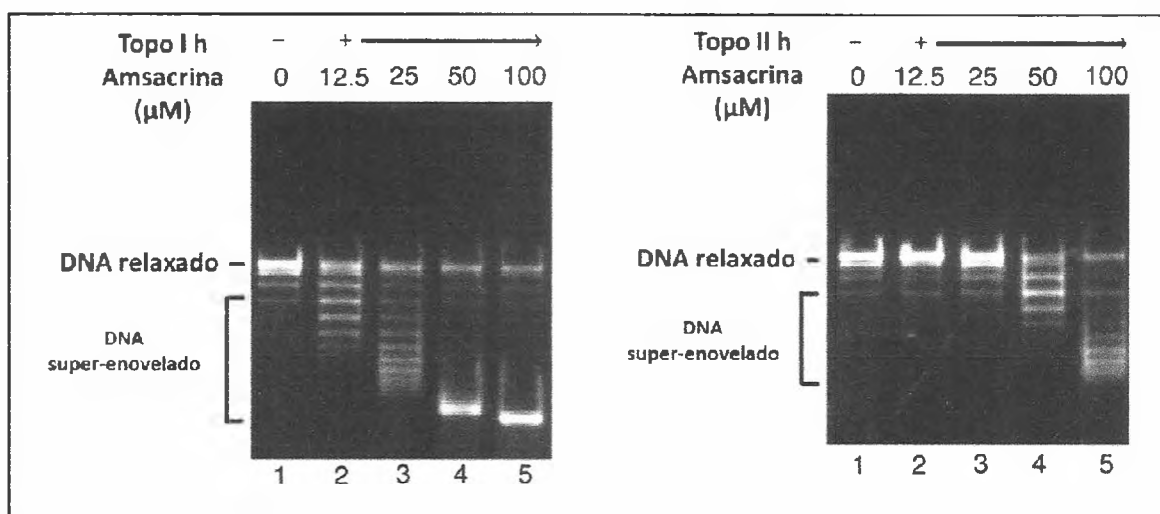


Figura 7 - Efeito de amsacrina sobre a atividade catalítica das enzimas humanas topoisomerases I e II (Topo I e II h). As imagens mostram o padrão diferenciado de corrida eletroforética de DNA relaxado e super-enovelado.

Fonte: adaptado de Opegard *et al.* (2009).

A **Figura 8** consiste em uma tentativa de demonstrar didaticamente a formação desses tipos de DNA após a ação do agente desnaturante SDS.

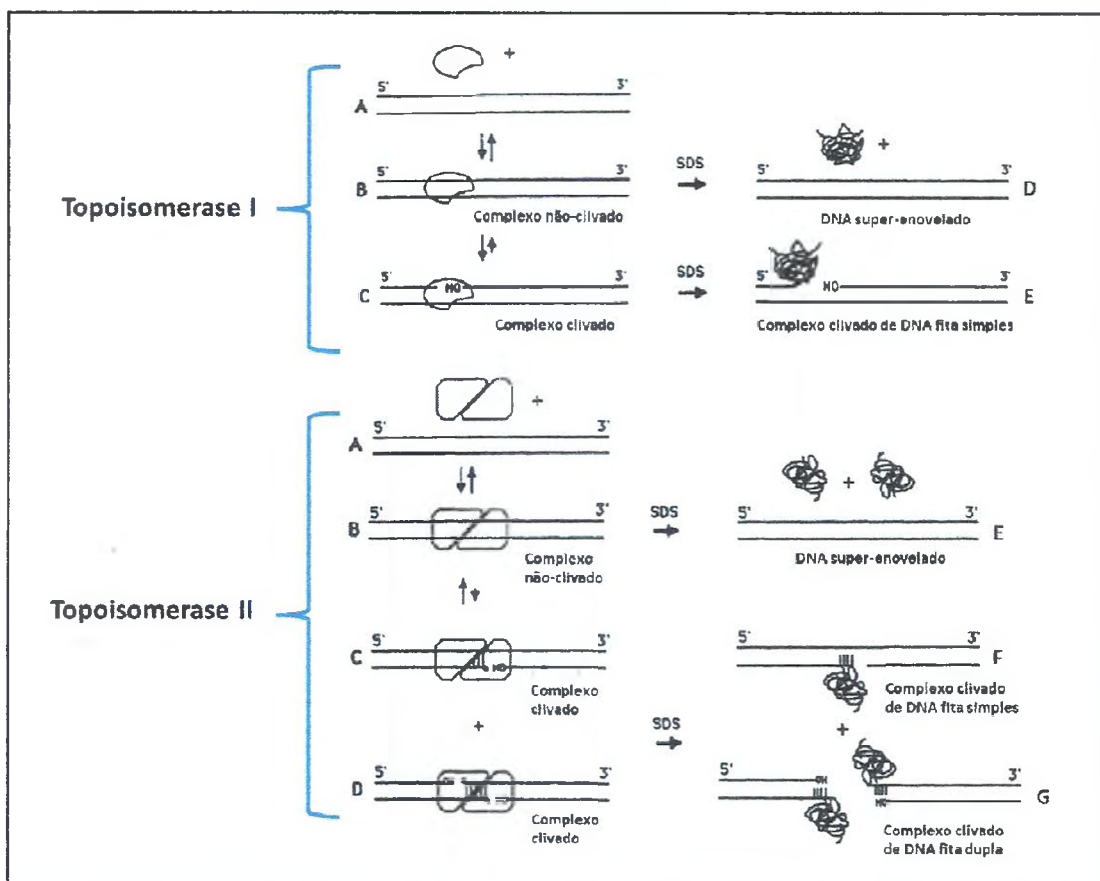


Figura 8 - Ação do agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) sobre diferentes tipos de DNA obtidos pela ação das enzimas topoisomerasas. Topoisomerase I: A, enzima e DNA; B, ligação da enzima ao DNA; C, clivagem de fita simples do DNA pela enzima; D, DNA super-enovelado e E, complexo clivado de fita simples de DNA. Topoisomerase II: A, enzima (homodímero) e DNA; B, ligação da enzima ao DNA; C e D, clivagem de dupla fita do DNA pela enzima; E, DNA super-enovelado; E, complexo clivado de fita simples de DNA e F, complexo clivado de fita dupla de DNA.

Fonte: adaptado de D'arpa e Liu (1989).

1.3 Alcalóides tambjamins

As tambjamins são um pequeno grupo de alcalóides bipirrólicos obtidos originalmente por isolamento a partir de várias fontes marinhas (briozoários, nudibrânquios e ascídias). O nome tambjamina, inclusive, refere-se aos nudibrânquios *Tambja abdere* e *Tambja eliora* dos quais foram isolados os primeiros representantes desta classe química (CARTE; FAULKNER, 1983; LINDQUIST, N.; FENICAL, 1991; BLACKMAN; LI, 1994). Nesses organismos, sabe-se que as tambjamins são metabólitos secundários que desempenham papel importante no mecanismo de defesa química contra a predação (CARTE; FAULKNER, 1986).

Estruturalmente, todos os representantes da classe tambjamina apresentam o núcleo (Z)-1-(4'-metóxi-1H,5'H-2,2'-bipirrol-5'-ilideno)metanamina (Figura 9). Dentro desse núcleo, é possível identificar a função química alcalóide que é caracterizada por ciclo carbônico com o átomo nitrogênio (N) entre carbonos (PINKERTON *et al.*, 2010).

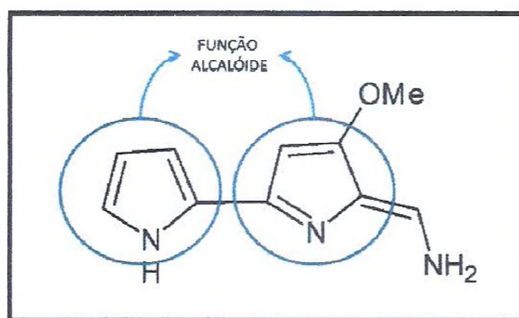
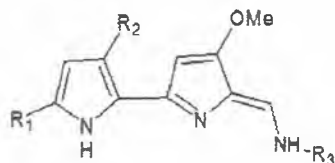


Figura 9 - Núcleo químico característico da classe tambjamina.
Fonte: adaptado de Pinkerton *et al.* (2010).

A **Tabela 2** mostra a estrutura química dos primeiros 10 alcalóides bipirrólicos descobertos pertencentes à classe tambjamina, os quais são simplesmente identificados por letras do alfabeto (A-J).

Tabela 2 - Estrutura química dos primeiros 10 alcalóides bipirrólicos descobertos pertencentes à classe tambjamina.

	R1	R2	R3
Tambjamina A	H	H	H
Tambjamina B	Br	H	H
Tambjamina C	H	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂
Tambjamina D	H	Br	CH ₂ CH(CH ₃) ₂
Tambjamina E	H	H	CH ₂ CH ₃
Tambjamina F	H	H	(CH ₂) ₂ Ph
Tambjamina G	Br	H	CH ₂ CH ₃
Tambjamina H	Br	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃
Tambjamina I	Br	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂
Tambjamina J	Br	H	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃



Fonte: adaptado de Pinkerton; Banwell; Willis (2007).

Com essas características estruturais, as tambjamins possuem propriedades biológicas interessantes a semelhança do que é apresentado pelos alcalóides tripirrólicos da família prodigiosina com atividades citotóxicas e imunossupressoras (MANDERVILLE, 2001).

Como exemplo, podemos citar a tambjamina BE-18591 que demonstrou capacidade de inibir a imunoproliferação e gastrite em coelhos (TANIGAKIA *et al.*, 2002). Adicionalmente, tambjamina I, quando testada contra um painel de 60 linhagens celulares tumorais humanas, apresentou valor médio de CI₅₀ (concentração capaz de inibir 50 % do crescimento celular) de 1,6 µM (MANDERVILLE, 2001).

Semelhantemente, a tambjamina D demonstrou forte atividade citotóxica contra várias linhagens celulares tumorais humanas, efeito antimitótico em ovos de ouriço-do-mar, efeito antifúngico contra *Candida albicans* e atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* (GRANATO *et al.*, 2005). Tambjamina D também demonstrou efeitos citotóxicos e genotóxicos contra células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) (CAVALCANTI *et al.*, 2008).

Alguns estudos tem demonstrado a capacidade das tambjamins de ligar-se ao DNA clivando-o na presença de Cu (II). Isto, provavelmente, explicaria, pelo menos em parte, o potencial citotóxico desses alcalóides (MANDERVILLE, 2001).

Com relação à família prodigiosina mencionada acima, sabe-se que esta corresponde a um grupo de pigmentos vermelhos produzidos por microorganismos (*Serratia spp.* e *Actinomycetos*) que estão relacionados estruturalmente com as tambjamins (FRANCISCO *et al.*, 2007). O seu principal representante, a prodigiosina (**Figura 10**), apresenta propriedades antibacterianas, antifúngicas, antimaláricas e citotóxicas, como pode ser observado na revisão de Montaner e Pérez-Tomás (2003). Dessa maneira, prodigiosina tem sido bastante estudada em virtude de seu potencial como uma droga quimioterapêutica.

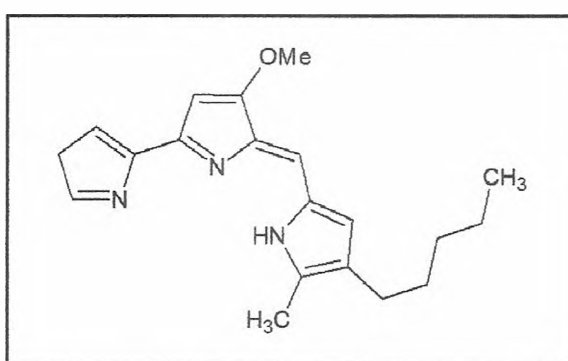


Figura 10 - Estrutura química da prodigiosina.

Fonte: adaptado de Pérez-Tomás *et al.* (2003).

Em se tratando de câncer, prodigiosina tem demonstrado forte efeito citotóxico contra linhagens celulares tumorais humanas hematopoiéticas, gastrointestinais, de mama e de pulmão através de processos indutores de apoptose. Por outro lado, este composto tem-se apresentado pouco tóxico contra linhagens celulares humanas não-neoplásicas (PÉREZ-TOMÁS *et al.*, 2003).

O mecanismo de ação citotóxico da prodigiosina ainda não está totalmente elucidado. Porém, sabe-se que a interação com o DNA celular associado com quebra de fita simples e dupla desta molécula por inibição da atividade catalítica das enzimas topoisomerasas, constituem fenômenos que explicam parcialmente o efeito anticâncer da prodigiosina (MONTANER *et al.*, 2005).

Francisco *et al.* (2007) demonstraram que prodigiosina é um agente sequestrador de prótons capaz de afetar o gradiente de pH intracelular. Neste

estudo, prodigiosina mostrou-se mais potente que o quimioterápico cisplatina com valores de CI_{50} menores que $1,5 \mu\text{M}$ em linhagens celulares humanas de neuroblastoma.

Outro estudo, realizado por Soto-Cerrato *et al.* (2007), revelou que concentrações não-tóxicas de prodigiosina induzem a expressão de p21 conduzindo a um bloqueio do ciclo celular de células MCF-7 com consequente morte celular por apoptose. O estudo também revelou a necessidade da participação do fator de crescimento TGF- β no processo de indução da proteína p21 reforçando o potencial anticâncer daquela molécula.

Recentemente, a primeira síntese total de 7 tambjamins (Tambjamins C, E, F, G, H, I e J) foi desenvolvida pelo grupo de cientistas da *Research School of Chemistry - Institute of Advanced Studies da Australian National University*. Este grupo, coordenado pelo Prof. Dr. Martin Banwell, firmou gentilmente colaboração com nosso grupo de pesquisa e enviou material suficiente para a realização do presente estudo (PINKERTON; BANWELL; WILLIS, 2007).

Neste ponto, é razoável ressaltar a importância da síntese química na produção de material suficiente para a realização de estudos biológicos, uma vez que as fontes marinhas fornecem quantidades limitadas de produtos para esse fim. Além disso, a síntese química como forma de produzir novos compostos biologicamente ativos inspirada em produtos naturais configura-se numa estratégia eficiente na preservação da biodiversidade (BANWELL, 2008; LEYVA; BLUM; LEY, 2008; BARTH; MULZER, 2008).

Os experimentos deste trabalho foram realizados, em sua maioria, no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental vinculado ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Ademais, cabe registrar a também gentil e importante colaboração do Prof. Dr. Yves Pommier (coordenador do *Laboratory of Molecular Pharmacology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health - USA*), nos estudos envolvendo as enzimas topoisomerasas, no intuito de contribuir com a valoração e a aplicabilidade terapêutica dos compostos desenvolvidos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo* dos alcalóides Tambjamina I, *N*-[(*Z*)-(5-bromo-4'-metóxi-1*H*,5'*H*-2,2'-bipirrol-5'-ilideno)metil]-2-metilpropan-1-amina), e Tambjamina J, (*N*-[(*Z*)-(5-bromo-4'-metóxi-1*H*,5'*H*-2,2'-bipirrol-5'-ilideno)metil]-2-metilbutan-1-amina) obtidos por síntese química.

2.2 Específicos

Determinar a citotoxicidade e a seletividade contra linhagens celulares humanas (tumorais e normais);

Determinar a atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus*);

Avaliar o padrão de morte celular envolvido na atividade citotóxica, bem como, o efeito sobre a progressão do ciclo celular usando células tumorais HL-60 (leucemia humana) como modelo;

Determinar a ação sobre a atividade catalítica das enzimas Topoisomerase I e II;

Avaliar a influência do receptor ErbB-2 sobre o efeito citotóxico usando células mamárias HBA4 (baixa expressão de ErbB-2), C3.6 (expressão moderada de ErbB-2) e C5.2 (alta expressão de ErbB-2) como modelo;

Identificar o efeito antitumoral e a toxicidade *in vivo* em camundongos transplantados com células do tumor Sarcoma 180;

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Soluções, reagentes e fármacos

Ácido Acético	-	Vetec®
Ácido Clorídrico	-	Vetec®
Álcool Etílico	-	Vetec®
Alcool Metílico	-	Vetec®
Agarose 1 %	0,5 g de agarose Água deionizada q. s. p. 50 mL	FMC - Bioproducts®
Agarose LMP 1.5 %	1,5 g de agarose PBS q. s. p. 100 mL	Gibco®
Agarose NMP 0.5 %	0,5 g de agarose PBS q. s. p. 100 mL	Gibco®
Alamar Blue (Resazurina)	0,312 mg/mL	Sigma®
Anticorpo anti-BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU BSA 5 % q.s.p. 500 µL de solução	Sigma® Dako®
Anticorpo biotinilado anti- imunoglobulina de camundongo	1 µL de anticorpo anti- imunoglobulina BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução	Sigma®

Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma®
BrdU 10mM	-	Sigma®
Citrato de Sódio	-	Grupo Química®
Ciclofosfamida (Genuxal)	200 mg	Baxter®
Cloreto de Sódio (NaCl)	-	Labsynth®
Diaminobenzidina (DAB)	5 µL de DAB 1 mL de Tris-HCl (Tris 0,05 M) pH= 7,6 2 µL de H ₂ O ₂	Immunotech® Proquímios® Proquímios®
Diacetato de 2'7'- diclorohidrofluoresceína	-	Invitrogen®
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	Vetec®
Doxorrubicina	-	Sigma®
EDTA	-	Qeel®
Estreptavidina – peroxidase	1 µL de Estreptavidina – peroxidase BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução	Sigma® Dako®
Entellan	Meio para montagem rápida de lâminas para análise em microscopia óptico	Merck®
Ficoll	-	Sigma®

Fitohemaglutinina	-	Sigma®
Formaldeído 10 %	100 mL de formaldeído H ₂ O q. s. p. 1 L	Dinâmica®
Halotano (Fluothane)	100 mL	Zeneca®
Heparina	-	Vetec®
Hidróxido de Sódio (NaOH)	-	Vetec®
Iodeto de propídeo 50 µg/mL	1 mg de iodeto de propídeo PBS q.s.p. 50 mL	Boehringer®
Kits para análises bioquímicas	AST, ALT, albumina, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, glucose, amilase, colesterol total e triglicerídeos	Larbolab® Labtest®
Kit <i>Guava Nexin Assay</i>	-	Guava Technologies®
Kit <i>FAM Caspase Activity FLICA Apoptosis Detection</i>	-	Sigma®
Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e esterelizada, filtrado em filtro millipore (0,22 µm) e complementado com SBF 10 %, 1 % de glutamina, 1 % de antibióticos, 1 % de bicarbonato de sódio (0,75	Cultilab®

%) e 25 mM de HEPES

MTT	20 mg de MTT PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® -
N-Lauroylsarcosine	-	Sigma®
Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab® Cultilab®
Ringer-lactato	Cloreto de Sódio = 0,600g Cloreto de Potássio = 0,030g Cloreto de Cálcio 2H ₂ O = 0,020g Lactato de Sódio = 0,30 g Água q. s. p. 100 mL	Laboratórios Biosintética®
Rodamina 123	-	Sigma®
Sulfato de Gentamicina	-	Novafarma®
Solução de Eletroforese	EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH > 13	-
Solução de Lise	NaCl 2,5 M, EDTA 100mM Tris 10 mM, N-Lauroyl sarcosine 1% pH = 10, Triton X-100 1 %, DMSO 10 %	-
Solução de Neutralização	Tris 0,4 M, pH = 7,5	
Solução desnaturante (para análise de incorporação de BrdU)	Formamida 70 % 2x SSC (pH entre 6,5 – 7,5 a 70 °C)	Vetec®

Soro fetal bovino	-	Cultilab®
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Citrato de sódio 0,15 M H ₂ O	-
Tampão de corrida 50 X (TAE)	242 g de TRIS 57,1 mL de ácido acético glacial 100 mL de EDTA 0,5 M	-
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio 2,14 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O 0,276 g de NaHPO ₄ .H ₂ O H ₂ O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	Labsynth® Labsynth® Labsynth® -
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Tris 0,5 M (pH= 7,6) H ₂ O	Labsynth® Proquímios® -
Topoisomerase I and II Drug Screening Kit	-	TopoGEN®
Trastuzumabe (Herceptin)	440 mg	Roche®
Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5 % 0,125 g de EDTA 450 mL de PBS	Cultilab® Proquímios® -
Triton X -100	-	Isofar®
Xilol 10 %	100 mL de formaldeído H ₂ O q. s. p. 1 L	Dinâmica®

Equipamentos

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2®

Agitador de tubo, Donner AD 8850®

Banho-maria, DELTA Modelo 105Di®

Bomba à vácuo, EXIMPUMP®

Citocentrífuga, CT-2000 CIENTEC®

Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206®

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403®

Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin®

Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte mini®

Contador automático de células sanguíneas Coulter Counter T-530®

Deonizador de água Milli-Q, Milipore®

Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter®

Estantes de ventilação, ALESCO®

Fluxo laminar, VECO®

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

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

Microondas, Panasonic®

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

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot®

Micrótomo, Slee Mainz®

pHmetro, Micronal B474®

Pipetas automáticas, Gilson®

Sistema de Eletroforese Horizontal mini Submarine, Amersham Biosciences®

Sistema de Fotodocumentação, Kodak®

Material biológico

Células mononucleares de sangue periférico humano isoladas de voluntários sadios;

Camundongos albinos Swiss *Mus musculus*;

Linhagens celulares tumorais humanas mantidas em cultura (**Tabela 4**);

Linhagens celulares normais humanas mantidas em cultura (**Tabela 5**).

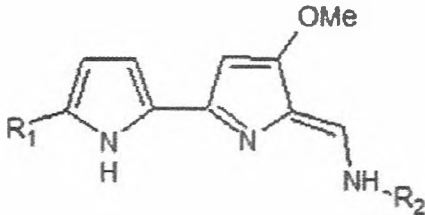
3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção das tambjamins

Os 7 alcalóides pertencentes à classe tambjamina (Tambjamins C, E, F, G, H, I e J) estudados neste trabalho foram sintetizados no Instituto de Estudos Avançados em Química da Universidade Nacional Australiana pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Martin Banwell (PINKERTON; BANWELL; WILLIS, 2007).

A estrutura química desse conjunto de moléculas (Tabela 3) foi determinada com base em dados espectrométricos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , do Infravermelho, do Ultravioleta e de Massa de Alta Resolução, os quais foram corroborados pela literatura.

Tabela 3 - Estrutura química dos alcalóides sintéticos pertencentes à classe tambjamina avaliadas neste estudo.



	R ₁	R ₂
Tambjamina C	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂
Tambjamina E	H	CH ₂ CH ₃
Tambjamina F	H	(CH ₂) ₂ Ph
Tambjamina G	Br	CH ₂ CH ₃
Tambjamina H	Br	CH ₂ CH ₂ CH ₃
Tambjamina I	Br	CH ₂ CH(CH ₃) ₂
Tambjamina J	Br	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃

Fonte: adaptado de Pinkerton; Banwell; Willis, 2007.

As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril na concentração estoque de 5 mg/mL, e devidamente acondicionadas até o momento do uso.

3.2.2 Manutenção das linhagens celulares humanas em cultura

Neste estudo foram utilizadas 4 linhagens celulares tumorais humanas (**Tabela 4**) e 3 linhagens celulares normais humanas (**Tabela 5**).

As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), e mantidas com os meios RPMI 1640 ou DMEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. Diariamente, acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas, utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células soltassem das paredes das garrafas (PESSOA, 2000).

Tabela 4 - Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* por meio do teste do MTT.

Linhagem Celular ^a	Tipo Histológico
HL-60	Leucemia promielocítica
HCT-8	Carcinoma de cólon
SF-295	Glioblastoma
MDAMB-435	Melanoma

^a Cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos - NCI/USA.

Tabela 5 - Linhagens celulares normais humanas utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* por meio do teste do MTT.

Linhagem Celular ^a	Tipo Histológico
HB4A	Epitélio luminal mamário - baixa expressão de receptor ErbB-2
C3.6	Epitélio luminal mamário - expressão moderada de receptor ErbB-2
C5.2	Epitélio luminal mamário - alta expressão de receptor ErbB-2

^a Cedidas pelo Instituto Ludwig para Pesquisa do Câncer, São Paulo, Brasil

3.2.3 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH)

As células mononucleares de sangue periférico humano (linfócitos e monócitos) foram obtidas de voluntários saudáveis segundo procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará - COMEPE/UFC (Protocolo: 281/09, ANEXO B). A coleta do sangue foi realizada em frascos heparinizados por profissionais capacitados, nas dependências da Unidade de Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará (UNIFAC-UFC), utilizando seringas esterilizadas e descartáveis com volume de 5 mL. O material obtido foi imediatamente transportado para o Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC.

CMSPH foram isoladas a partir de 3 mL de sangue acrescidos de 5 mL de PBS. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3 mL de Ficoll, seguida por 30 minutos de centrifugação a 1000 rpm. A suspensão de células presente na região intermediária entre as hemácias e o plasma foi, então, transferida para outro tubo, ao qual foi acrescido PBS até o volume de 11 mL, sendo centrifugado por 20 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuscitado em meio completo (RPMI 1640 acrescido de 20% de soro fetal bovino, 1 % de antibiótico (penicilina-

estreptomina) e 4% de fitohemaglutinina) e contado em câmara de Neubauer para posterior diluição e plaqueamento.

3.2.4 Obtenção e cuidado dos animais de laboratório

Todos os animais utilizados neste estudo foram camundongos adultos machos albinos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN - UFC). Os animais foram mantidos em estantes ventiladas sob condições padrões de temperatura (22 ± 1 °C) e luminosidade (12h de ciclo claro/escuro) e sob regime de ingestão *ad libitum* de ração comercial (Purina, São Paulo) e água clorada durante todo o período do experimento. Todos os protocolos de investigação utilizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (COPEA) da Universidade Federal do Ceará (Processo nº 039/2012, ANEXO C) e estão de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e seguindo padrões internacionais de uso de animais de laboratório (ANDRADE et al., 2002; EEC DIRECTIVE OF 1986, 86/609/EEC).

3.2.5 Determinação da atividade e da seletividade citotóxica em linhagens celulares humanas (tumoriais e normais) - Teste do MTT

Princípio do teste

A determinação da atividade e da seletividade citotóxica das 7 tambjaminas em linhagens celulares humanas (tumoriais e normais) foi realizada pelo Teste do MTT após 72 h de incubação.

Este é um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido por Mosmann em 1983 para estimar a proliferação e a sobrevivência celular. É definido na literatura como apropriado para estimar a citotoxicidade (PESSOA et al., 2000; COSTA-LOTUFO et al., 2004; BEZERRA et al., 2005; BEZERRA et al., 2008) e baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de

cor púrpura. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

Procedimento experimental

As 7 tambjaminas foram testadas em um painel de linhagens celulares de diferentes tipos histológicos (**Tabela 4**) para a determinação de suas CI_{50} (concentração capaz de inibir 50 % do crescimento celular), como descrito a seguir.

As células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL, para células em suspensão, e $0,7 \times 10^5$ células/mL, para células aderidas. Após 24 h, os compostos testes (0,19 a 25 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados aos poços, utilizando o sistema automatizado HTS (*high-throughput screening*), e as placas, incubadas por 69 h. O quimioterápico doxorrubicina (Dox) foi utilizado como controle positivo (0,019 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$) e o controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min) e o sobrenadante foi descartado. Cada poço recebeu 200 μL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio RPMI 1640) e as placas foram reincubadas por 3 h em estufa a 37 °C e a 5 % CO_2 . Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuscitado em 150 μL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 595 nm (MOSMANN *et al.*, 1983).

Análise dos dados

Os compostos foram testados em diluições seriadas e em duplicata ou triplicata. Os valores de CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.2.6 Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus*) - Teste Hemolítico

Princípio do teste

A determinação da atividade hemolítica das 7 tambjamins em eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus*) foi realizada pelo Teste Hemolítico após 1 h e 2 h de incubação.

Segundo Costa-Lotufo *et al.* (2002), este ensaio permite avaliar o potencial dos compostos testes em causar danos à membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total da mesma. Isto é possível pelo fato de que os eritrócitos são células extremamente simples e sensíveis a compostos capazes de promover sua lise, possibilitando a quantificação indireta de células mortas a partir da quantidade de hemoglobina liberada.

Procedimento experimental

O sangue foi coletado de camundongos Swiss (*Mus musculus*) por via plexo orbital e diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm / 5 min) para redução da contaminação plasmática. Em seguida, foram ressuspensos em solução salina para se obter uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2% a qual foi plaqueada em placas de 96 poços. Os compostos testes foram adicionados às placas em concentrações variando de 1,56 a 200 µg/mL. Triton X-100 (1 %) foi utilizado como controle positivo e o controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Após 1 h e 2 h de incubação e sob agitação constante à temperatura ambiente (26 ± 2°C), as placas foram centrifugadas (5000 rpm/3 min) e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro de placa a 540 nm, para a quantificação da hemoglobina liberada.

Análise dos dados

Os compostos foram testados em diluições seriadas e em duplicata ou triplicata. Os valores de CE_{50} (concentração média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.2.7 Avaliação do padrão de morte celular e do efeito sobre a progressão do ciclo celular

Nesta etapa do estudo, células leucêmicas humanas (HL-60) foram utilizadas como modelo. Em cada experimento, as células foram plaqueadas na densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL e incubadas com as tambjamins I e J em diferentes concentrações (0,3 μ g/mL e 0,6 μ g/mL) por 3 h, 6 h, 12 h e 24 h. As concentrações testadas foram determinadas a partir da CI_{50} obtida pelo teste do MTT em células HL-60. O quimioterápico doxorrubicina (0,3 μ g/mL) foi utilizado como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver os compostos testes, o qual foi mantido abaixo de 1%.

3.2.7.1 Determinação da viabilidade celular - Teste do Azul de Tripán

Princípio do teste

O teste do azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis e as não viáveis após a incubação com os compostos testes. O teste baseia-se na capacidade que o corante azul de tripan tem de penetrar em todas as células. Entretanto, apenas as células viáveis conseguem bombear o corante para fora, sendo possível, observar uma marcação azulada para as células não viáveis, que perderam essa capacidade.

O teste do azul de tripan foi realizado, também, antes de cada experimento desta etapa do estudo para verificar a viabilidade celular.

Procedimento Experimental

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 3 h, 6 h, 12 h e 24 h. Após a incubação, 10 μ L do azul de tripan foram adicionados a 90 μ L da suspensão de células em tubo eppendorf. As células viáveis e não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Possíveis diferenças significativas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman-Keuls ($p < 0.05$), utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.2.7.2 Análise morfológica - Coloração com May-Grünwald-Giemsa

Princípio do teste

A coloração utilizada neste experimento permite verificar alterações morfológicas citoplasmáticas, nucleares e de membrana celular. O teste baseia-se na capacidade que a hematoxilina tem de marcar o núcleo celular em azul, por ser um corante alcalino, aliada a afinidade da eosina pelo citoplasma, por ser um corante ácido, conferindo-lhe uma coloração rósea.

Procedimento Experimental

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 3 h, 6 h, 12 h e 24 h. Para observar a morfologia, 50 μ L da suspensão de células foram adicionados à centrífuga de lâmina (cytospin) para promover sua adesão. Após a adesão das células na lâmina, a fixação foi feita com metanol por 30 s, seguida de coloração com May-Grünwald por 10 s, e depois com Giemsa por 10 s.

Análise dos dados

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio óptico para avaliação das suas características morfológicas e comparadas com o controle negativo. O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

3.2.7.3 Análise morfológica - Coloração diferencial com Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

Princípio do teste

O método de coloração pelo brometo de etídio/laranja de acridina (MCGAHON *et al.*, 1995) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose. Este método baseia-se na revelação diferencial das células por fluorescência. A laranja de acridina (LA) é capaz de atravessar membranas intactas e intercala-se ao DNA celular conferindo aparência verde ao núcleo. O brometo de etídio (BE), por sua vez, só consegue intercalar ao DNA e marcar o núcleo em vermelho se a membrana celular estiver danificada. Dessa maneira, as células viáveis, que tem a membrana íntegra, apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. As células em apoptose (membrana ainda íntegra) apresentam manchas verdes brilhantes (condensação da cromatina e fragmentação nuclear) e não são marcadas por BE. Na apoptose, observam-se, também, alterações na membrana celular em decorrência da formação de corpos apoptóticos. O BE é incorporado majoritariamente por células necróticas (membrana danificada) e apresentam, portanto, núcleo corado de vermelho (KUMMAR *et al.* 2004).

Procedimento Experimental

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 3 h, 6 h, 12 h e 24 h. Após a incubação, a suspensão de células foi transferida para tubo eppendorf e centrifugada por 5 min em baixa rotação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 µL de solução de PBS. Em seguida, 1 µL da solução de

BE:LA foi adicionado ao tubo, e uma alíquota dessas células foi transferida para uma lâmina. A lâmina foi montada com lamínula para contagem em microscópio de fluorescência. Foram contadas 300 células de cada amostra para a quantificação percentual dos eventos celulares (viáveis, apoptóticas e necróticas). As lâminas foram fotografadas para o registro visual dos efeitos.

Análise dos Dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Possíveis diferenças significativas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman-Keuls ($p < 0.05$), utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.2.7.4 Testes utilizando citometria de fluxo

a) Determinação da integridade de membrana e viabilidade celular

Princípio do teste

A análise da integridade da membrana plasmática é uma importante ferramenta para estudar o tipo de morte celular, visto que, apenas na necrose, a membrana plasmática está precocemente alterada. O teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo (IP), que é hidrofílico, de penetrar apenas em células cuja membrana esteja rompida. Após a ligação ao DNA, o IP emite alta fluorescência quando é excitado pelo laser de argônio (488 nm). A célula com membrana íntegra emite, portanto, baixa fluorescência.

Neste experimento, também é possível avaliar aspectos morfológicos como volume e granulosidade, que foram também utilizados como parâmetros na determinação da viabilidade celular (MACKLIS; MADISON, 1990). O teste baseia-se no desvio frontal e lateral da luz incidida sobre as células. O desvio frontal determina o volume celular e o lateral mede a granulosidade.

Procedimento experimental

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 3 h, 6 h, 12 h e 24 h. Uma alíquota de 50 μ L foi recolhida da suspensão de células e diluída com a solução de IP (2 μ g/mL em PBS). Após 5 min na ausência de luz a 37 °C, as células (cinco mil eventos) foram analisadas por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006).

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Possíveis diferenças significativas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman-Keuls ($p < 0.05$), utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

b) Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria

Princípio do teste

A mitocôndria está envolvida na via intrínseca da apoptose. Nesse processo, membros da família Bcl-2 ligam-se a membrana externa da mitocôndria formando um poro que permite a saída de vários fatores apoptóticos (p. ex. citocromo c) e de íons H^+ , causando despolarização mitocondrial. Assim, o teste baseia-se na marcação de mitocôndrias com potencial transmembrânico normal pela rodamina 123, um corante fluorescente que tem elevada afinidade por prótons (nucleofílico). As células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto que as mitocôndrias despolarizadas terão menor afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência. Deste modo, este ensaio foi utilizado para investigar a ativação da via apoptótica intrínseca a partir do potencial transmembrânico mitocondrial (MARCHETTI *et al.*, 1996).

Procedimento experimental

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 3 h, 6 h, 12 h e 24 h. Uma alíquota de 50 μ L foi recolhida da suspensão de células e diluída com a solução de rodamina 123 (1 μ g/mL em PBS). Após 15 min na ausência de luz e a 37 °C, as células foram centrifugadas e o precipitado ressuspendido em PBS. O material foi reincubado por 30 minutos e, então, analisado (cinco mil eventos) por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006).

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Possíveis diferenças significativas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman-Keuls ($p < 0.05$), utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

c) Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula

Princípio do teste

Este ensaio foi realizado com o intuito de determinar o conteúdo de DNA nuclear das células. O teste baseia-se na capacidade do corante IP em ligar-se ao DNA celular e emitir fluorescência vermelha em intensidade proporcional ao seu conteúdo. Assim, as diferentes fases do ciclo celular (G_0/G_1 , S e G_2/M) podem ser determinadas a partir do seu conteúdo de DNA. Quando a célula apresenta cromatina condensada e/ou DNA fragmentado (sub- G_1), a quantidade de IP incorporada é menor, e, portanto emitirá baixa fluorescência.

Procedimento experimental

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 3 h, 6 h, 12 h e 24 h. Uma alíquota de 50 μ L foi recolhida da suspensão de células e diluída com a solução de lise contendo IP (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de triton X-100 e 2 μ g/mL iodeto de propídeo em PBS). Após 30 min na ausência de luz e a 37 °C, o material (cinco mil eventos) foi analisado por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006).

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

d) Determinação da externalização da Fosfatidilserina

Princípio do teste

A externalização do fosfolípido de membrana, fosfatidilserina (PS) é, frequentemente, um dos primeiros eventos a ocorrer quando a célula entra em apoptose (VERMES *et al.*, 1995). A externalização do fosfolípido de A determinação da externalização de PS foi realizada com o kit Guava Nexin® Reagent o qual é composto por anexina V conjugada com ficoeritrina e em associação com 7-Amino-Actinomicina-D (7-AAD). A detecção se dá pela alta fluorescência amarela (583 nm) emitida com a ligação covalente da anexina V conjugada com ficoeritrina com a PS. As células em apoptose inicial serão marcadas exclusivamente pela anexina V. A contra coloração para detecção de células em apoptose tardia e necrose foi realizada com 7-AAD, o qual é bastante hidrofílico e só é capaz de se ligar ao DNA das células que tiverem danos na membrana plasmática emitindo, então, alta fluorescência vermelha quando excitado pelo laser de argônio (680 nm).

Procedimento experimental

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 24 h. Uma alíquota de 100 μ L foi recolhida da suspensão de células a qual recebeu 100 μ L do reagente de trabalho. Em seguida, as células foram levemente agitadas e incubadas por 20 min em temperatura ambiente (25 °C) e protegidas da luz antes da análise em citômetro de fluxo.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Possíveis diferenças significativas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman-Keuls ($p < 0.05$), utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

e) Determinação da atividade das Caspases-3, -7, -8 e -9

Princípio do teste

A ativação das caspases-3, -7, -8 e -9 possui papel fundamental no mecanismo de morte celular, sendo responsável pela clivagem de vários componentes relacionados ao reparo e à replicação do DNA. Assim, a quantificação dos níveis de caspases permite avaliar os mecanismos de indução de morte (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).

A determinação da atividade das caspases iniciadoras -8/-9 e efetoras -3/-7 foi realizada com o FAM Caspase Activity FLICA Apoptosis Detection Kit. A detecção se dá pela alta fluorescência verde emitida com a ligação covalente do inibidor de caspases (Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases, FLICA®) que atravessa facilmente a membrana plasmática. As células em apoptose inicial serão marcadas exclusivamente pelo FLICA. A contra coloração para detecção de células em apoptose tardia e necrose foi realizada com IP, o qual é bastante hidrofílico e só é capaz de se ligar ao DNA das células que tiverem

danos na membrana plasmática emitindo, então, alta fluorescência vermelha quando excitado pelo laser de argônio (488 nm).

Procedimento experimental

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 24 h. Uma alíquota de 90 µL foi recolhida da suspensão de células a qual recebeu 10 µL de FLICA 10X. Em seguida, as células foram incubadas por 1 h a 37 °C, 5 % de CO₂, homogeneizando as amostras a cada 20 min. Após a incubação, 80 µL de tampão de lavagem foram adicionados às células, as quais foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 min. O precipitado foi ressuspensionado em uma solução de trabalho (IP 1:200 em tampão de lavagem 1x) antes da análise em citômetro de fluxo.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Possíveis diferenças significativas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman-Keuls ($p < 0.05$), utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.2.7.5 Avaliação do dano no DNA - Ensaio Cometa

Princípio do teste

O ensaio cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) foi desenvolvido por Singh *et al.* (1988) para detectar quebra simples e dupla na molécula de DNA induzida por compostos com potencial genotóxico, tais como agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Este ensaio é muito utilizado em estudos de genética toxicológica como biomonitoramento ambiental e populacional. Entretanto, seus resultados são utilizados como um indicativo e não como um teste mutagênico. O teste pode ser realizado com células animais ou vegetais, tanto *in vitro* como *in vivo* (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; ANDERSON *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2003).

Procedimento Experimental

Células HL-60 foram incubadas por 24 h, em tubos falcon, com os compostos testes em diferentes concentrações (0,3 µg/mL e 0,6 µg/mL). Em seguida, 20 µL da suspensão de células ($\sim 10^6$ células/mL) foram dissolvidos em 0,75 % de agarose de baixo ponto de fusão e imediatamente espalhada sobre uma lâmina pré-tratada com 1,5 % de agarose de ponto de fusão normal. As células foram, então, colocadas em solução de lise por pelo menos 1 h a 4 °C. Em seguida, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com tampão de corrida em pH ~ 13 (HARTMANN; SPEIT, 1997; SINGH; SINGH, 2002). A eletroforese foi conduzida em baixa luminosidade por 20 minutos, usando 14 V e uma corrente de 12 mA (0,5 V/cm). Após a corrida eletroforética, as lâminas foram retiradas e mergulhadas na solução de neutralização por 5 min. As células foram contadas em microscópio de fluorescência após coloração com brometo de etídeo. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (BURLINSON *et al.*, 2007; HARTMANN; SPEIT, 1997; TICE *et al.*, 2000). Foram contados 50 cometas/lâmina e classificados, de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, de acordo com a **figura 11**. Onde, 0 = sem danos (<5%), 1 = baixo nível de danos (5-20%), 2 = médio nível de danos (20-40%), 3 = alto nível de danos (40-95%) e 4 = dano total (95%). O quimioterápico doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usado como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 1%.

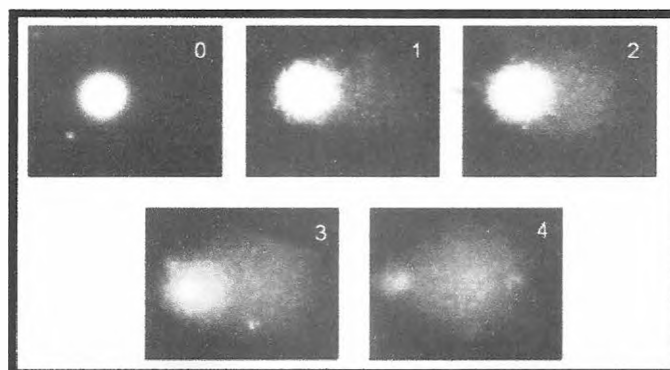


Figura 11 - Padrão de dano ao DNA para o ensaio cometa. Fonte: Collins (2004).

Análise dos dados

Foi calculado o índice de dano (ID) no DNA, o qual foi obtido pela seguinte fórmula: $ID = 400 - \sum \text{Escores}$. Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Possíveis diferenças significativas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman-Keuls ($p < 0.05$), utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.2.8 Determinação da ação sobre as enzimas topoisomerase I e II - Ensaio de Relaxamento do DNA

Princípio do teste

Este ensaio permite avaliar o potencial inibitório dos compostos testes sobre a atividade catalítica das enzimas topoisomerase I e II (Topo I e Topo II). O teste baseia-se na capacidade dessas enzimas de promover o relaxamento de DNA super-enovelado, o qual apresenta padrão de corrida eletroforética diferenciado.

Procedimento Experimental

A ação inibitória de tambjamina J sobre as enzimas Topoisomerase I e II humanas (Topoisomerase I e II Drug Screening Kit, TopoGEN, Inc., Columbus, USA) foi avaliada de acordo com Bezerra *et al.* (2007). Um microlitro (250 ng) de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG, uma derivação do pUC 19) foi incubado com Topo I e II (4 U) a 37 °C por 30 min no tampão de relaxamento (Tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,9, EDTA 1 mM, NaCl 0,15 M, BSA 0,1 %, espermidina, 0,1 mM e glicerol 5 %) na presença de 0,1; 1,0; 10 e 100 μM de Tambjamina J, para um volume final de 20 μL . Camptotecina (CPT; 1 μM) e Etoposido (VP-16; 100 μM) foram usados como controle positivo para Topo I e II, respectivamente. A reação foi interrompida pela adição de 2 μL de SDS 10 % (para facilitar o bloqueio da enzima no complexo de clivagem) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de

proteínase K (para digerir ligações protéicas). Em seguida, as amostras foram misturadas ao tampão de amostra contendo o corante azul de bromofenol (0,25 %). As amostras foram, então, aplicadas no gel de agarose 1 % e a corrida eletroforética foi realizada a 80 V (volts) por 120 min à temperatura ambiente. A revelação do gel foi feita com brometo de etídio e, imediatamente, fotografado sob luz ultravioleta.

Análise dos dados

As imagens obtidas foram avaliadas quanto ao padrão de corrida eletroforética das amostras e comparadas com os controles positivo e negativo.

3.2.9 Avaliação da influência do receptor ErbB-2 sobre o efeito citotóxico, antiproliferativo, genotóxico e mutagênico

O receptor ErbB-2 é uma proteína transmembrana de 185 kDa que está estruturalmente relacionada ao receptor do fator de crescimento epidérmico. A superexpressão do ErbB-2 é observada em 25% - 30% dos cânceres de mama primários. Uma consequência da amplificação do gene ErbB-2 é um aumento da expressão da proteína ErbB-2 na superfície destas células tumorais resultando em um receptor ErbB-2 constitutivamente ativado (VENTER *et al.*, 1987; SLAMON; GODOLPHIN; JONES, 1989).

A avaliação da influência do receptor ErbB-2 sobre o efeito citotóxico, antiproliferativo, genotóxico e mutagênico de tamoxifeno I e J foi realizada por meio dos testes do MTT, da Atividade Clonogênica, do Cometa e do Micronúcleo, respectivamente. Células mamárias HBA4 (baixa expressão de ErbB-2), C3.6 (expressão moderada de ErbB-2) e C5.2 (alta expressão de ErbB-2) foram utilizadas como modelo (STAMPS *et al.*, 1994; HARRIS *et al.*, 1999). Os testes foram realizados na presença ou ausência de trastuzumabe que é um anticorpo monoclonal capaz de ligar-se ao receptor ErbB-2 inativando-o. Como consequência, a sinalização intracelular para a proliferação resultante deste receptor é bloqueada (HUDIS, 2007; GOEL *et al.*, 2011).

3.2.9.1 Teste do MTT

Princípio do teste

A determinação da atividade citotóxica de tambjamina I e J em linhagens celulares humanas que expressam o receptor ErbB-2 em níveis diferentes (HBA4, baixa expressão; C3.6, expressão moderada; e C5.2, alta expressão de ErbB-2) foi realizada pelo Teste do MTT após 24 h e 72 h de incubação.

Como descrito no item 3.2.5, este é um ensaio quantitativo *in vitro* apropriado para estimar a citotoxicidade de um composto teste frente a linhagens celulares baseado na capacidade que células viáveis tem de converter metabolicamente o sal MTT em formazan (PESSOA *et al.*, 2000; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2008).

Procedimento experimental

As células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de $0,7 \times 10^5$ células/mL. Após 24 h, os compostos testes (0,13 a 67,88 μM) foram adicionados aos poços na presença ou ausência de trastuzumabe, utilizando o sistema automatizado HTS (*high-throughput screening*), e as placas, incubadas por 24 h e 69 h. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min) e o sobrenadante foi descartado. Cada poço recebeu 200 μL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio RPMI 1640) e as placas foram reincubadas por 3 h em estufa a 37 °C e a 5 % CO_2 . Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensionado em 150 μL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 595 nm (MOSMANN *et al.*, 1983).

Análise dos dados

Os compostos foram testados em diluições seriadas e em duplicata ou triplicata. Os valores de CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) e seus respectivos erros padrões da média (E.P.M.) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.2.9.2 Teste da Atividade Clonogênica

Princípio do teste

Este ensaio baseia-se na capacidade que células de crescimento aderido em cultura tem de formar colônias (atividade clonogênica) quando plaqueadas em densidades baixas (SALMON, 1984; FIEBIGA; MAIERA; BURGER, 2004).

Neste caso, a incubação com os alcalóides sintéticos tambjamins I e J permite avaliar se estes compostos são capazes de interferir na atividade clonogênica das linhagens celulares utilizadas.

Procedimento experimental

Células em crescimento exponencial foram tratadas com os compostos testes (5, 10 e 20 μ M) durante 5 h na presença de trastuzumabe (50 μ g/mL). Em seguida, as células foram tripsinizadas e lavadas com PBS gelado. Após a lavagem, foram plaqueadas 1000 células por poço (em triplicata) em placas de 6 poços para determinar a capacidade de formar colônia. Após 6 dias de incubação, as colônias foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa, contadas, e sua sobrevivência calculada como porcentagem relativa ao controle negativo. Trastuzumabe foi adicionado a cada 2 dias durante o período de incubação.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Possíveis diferenças significativas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman-Keuls ($p < 0.05$), utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.2.9.3 Teste do Cometa

Princípio do teste

Como descrito no item 3.2.8.5, este é um ensaio quantitativo *in vitro* apropriado para estimar o potencial genotóxico de um composto teste em linhagens celulares animais ou vegetais (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; ANDERSON *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2003).

Procedimento experimental

Células foram tratadas com os compostos testes (5, 10 e 20 μM) na presença ou ausência de trastuzumabe (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h e 72 h. As células também foram tratadas com trastuzumabe isolado nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 h e 72 h. Em seguida, 20 μL da suspensão de células ($\sim 10^6$ células/mL) foram dissolvidos em 0,75 % de agarose de baixo ponto de fusão e imediatamente espalhada sobre uma lâmina pré-tratada com 1,5 % de agarose de ponto de fusão normal. As células foram, então, colocadas em solução de lise por pelo menos 1 h a 4 °C. Em seguida, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com tampão de corrida em pH ~ 13 (HARTMANN; SPEIT, 1997; SINGH; SINGH, 2002). A eletroforese foi conduzida em baixa luminosidade por 20 minutos, usando 14 V e uma corrente de 12 mA (0,5 V/cm). Após a corrida eletroforética, as lâminas foram retiradas e mergulhadas na solução de neutralização por 5 minutos. As células foram contadas em microscópio de fluorescência após coloração com brometo de etídeo. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores

previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (BURLINSON *et al.*, 2007; HARTMANN; SPEIT, 1997; TICE *et al.*, 2000). Foram contados 50 cometas/lâmina e classificados, de acordo com a porcentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, de acordo com a **figura 11**. Onde, 0 = sem danos (<5%), 1 = baixo nível de danos (5-20%), 2 = médio nível de danos (20-40%), 3 = alto nível de danos (40-95%) e 4 = dano total (95%). O quimioterápico doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usado como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 1%.

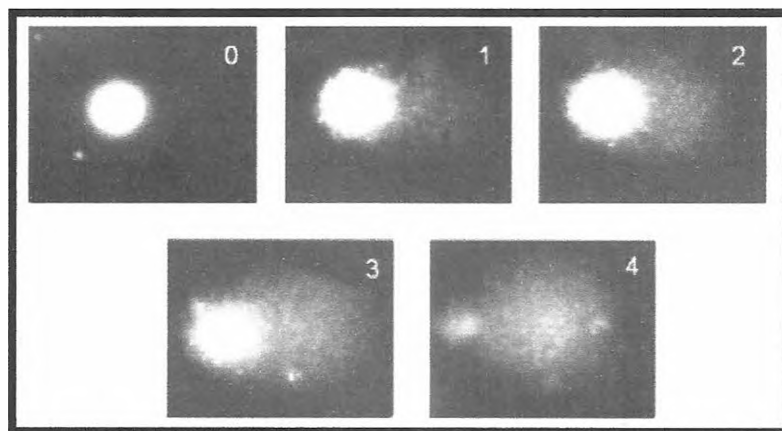


Figura 11 - Padrão de dano ao DNA para o ensaio cometa

Fonte: Collins (2004).

Análise dos dados

Foi calculado o índice de dano (ID) no DNA, o qual foi obtido pela seguinte fórmula: $ID = 400 - \sum \text{Escores}$. Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Possíveis diferenças significativas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman-Keuls ($p < 0.05$), utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.2.9.4 Teste do Micronúcleo *in vitro*

Princípio do teste

O micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de danos cromossômicos ou dano no aparelho mitótico. É importante ressaltar que os micronúcleos são formados durante a mitose, independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo celular (FENECH, 1997; CLARE *et al.*, 2006).

O teste do micronúcleo com o emprego da citocalasina B pode ser utilizado para monitoramento genotóxico de populações, para a avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos e para estudos específicos como a variação interindividual da radiosensibilidade e predição da radiosensibilidade de tumores (SHIBAMOTO *et al.*, 1991; BURRIL *et al.*, 2000; KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003).

Procedimento experimental

Após tratamento com os compostos testes (10 μ M por 24 h) na presença ou ausência de trastuzumabe (50 μ g/mL), as culturas foram lavadas duas vezes com meio e citocalasina-B (3 μ g/mL) foi adicionado 44 h após o início do cultivo. Doxorubicina (D) foi utilizada como controle positivo (0,3 μ g/mL) e o DMSO (0,1%) como controle negativo. As células também foram tratadas com trastuzumabe isolado nas concentrações de 10, 50 e 100 μ g/mL por 24 h.

Após 72 h do momento de adição das drogas, as culturas foram centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspensionado em solução hipotônica de cloreto de potássio 0,075 M (37 °C), tendo permanecido na incubadora por 20 min a 37 °C. Após o tratamento hipotônico, a suspensão celular foi centrifugada (1000 rpm por 5 min), sendo o sobrenadante desprezado em seguida. O pellet foi fixado com uma solução fixadora (metanol/ácido acético, 3:1) mantida previamente gelada (4°C). O processo de fixação foi realizado três vezes. Na última, o pellet foi ressuspensionado em 1 mL da solução de fixação gelada até a preparação das lâminas.

Em seguida, duas a quatro gotas (dependendo da quantidade do material) da suspensão celular foram transferidas para lâminas limpa e seca. Após a montagem das lâminas, estas foram coradas com uma solução de Giemsa (5%) por 7 min. Foram montadas cinco lâminas para cada cultura.

As lâminas previamente codificadas foram analisadas em teste cego, em microscópio óptico binocular com aumento de 1000 vezes. Os critérios adotados de identificação dos micronúcleos foram os descritos por Fenech (2000). Assim, somente células binucleadas (1000 células/lâmina) com núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais e com o mesmo padrão de coloração foram analisadas (**Figura 12**).

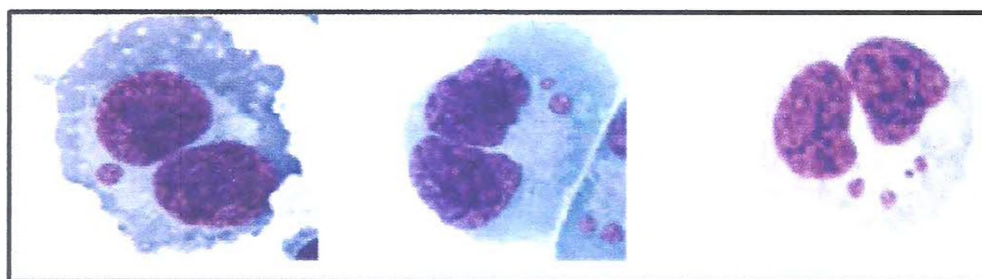


Figura 12 - Fotomicrografia de linfócitos binucleados portando micronúcleos.

Fonte: Fenech *et al.*, 2003.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Possíveis diferenças significativas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman-Keuls ($p < 0.05$), utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.2.10 Identificação do efeito antitumoral e da toxicidade *in vivo*

A identificação do efeito antitumoral e da toxicidade *in vivo* de tambjamina J foi realizada em camundongos transplantados com células do tumor Sarcoma-180.

Neste ensaio, camundongos machos adultos sadios foram divididos aleatoriamente em grupos de 10 animais com pesos variando entre 22 - 25 g ($p > 0.05$). O tumor Sarcoma-180 foi utilizado com 10 dias de implantação na cavidade peritoneal do animal doador. O animal doador foi sacrificado por deslocamento cervical, sendo realizada assepsia com álcool iodado. Em seguida, retirou-se o líquido ascítico da cavidade abdominal e preparada uma suspensão de células com 5 mL de Ringer lactato, 200 μ L de gentamicina (5 mg/mL) e 500 μ L do líquido ascítico, para posterior contagem de células. Nos animais receptores, foram injetadas 2×10^6 células/0,5 mL na região axilar esquerda dos camundongos (PEREIRA & CHAVES, 1983; MAGALHÃES *et al.*, 2010). Após 24 h de inoculação, o tratamento foi iniciado e realizado durante 7 dias consecutivos, utilizando como controle negativo o veículo de diluição (DMSO 10 % em água destilada) e como controle positivo, o quimioterápico ciclofosfamida (20 mg/kg/dia). Para o alcalóide sintético tambjamina J, foram estabelecidas as doses de 10 e 20 mg/kg/dia, ambas administradas via intraperitoneal (i.p.). Concomitantemente à administração, um grupo de animais livres de tumor e droga (saudáveis) foi mantido durante o experimento para posterior comparação com os demais grupos de experimentação.

Os animais foram pesados no início e no final do experimento e observados quanto ao aparecimento de qualquer sinal de toxicidade, como diarreia, ereção de pêlos, letargia e convulsões. No 8º dia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo seus órgãos (rins, baço, fígado e estômago) e tumores dissecados para avaliação do peso relativo e da atividade antitumoral, respectivamente. O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

Onde:

A = média dos pesos dos tumores no grupo controle;

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

3.2.10.1 Análise do perfil bioquímico e hematológico

Antes do sacrifício, os animais foram submetidos a um jejum de 8 h antes da coleta de sangue via plexo orbital (WAYNFORTH, 1980). Os camundongos foram anestesiados com halotano e o sangue foi coletado com pipetas heparinizadas e tubos estéreis.

Para a determinação dos parâmetros bioquímicos, o plasma foi obtido por centrifugação a 2000 rpm por 10 min, o qual foi submetido a técnicas padronizadas de kits comerciais baseados em métodos cinéticos, enzimáticos e colorimétricos através de espectrofotometria segundo as orientações do fabricante (Labtest® ou Larbolab®). O plasma coletado foi utilizado para a análise das funções hepática [aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), uréia nitrogenada sanguínea] e renal (creatinina).

Para a avaliação hematológica foram contabilizados hemácias, plaquetas, leucócitos totais e diferenciados, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a variação da distribuição do tamanho eritrocitário (*Red cell Distribution Width* – RDW) usando um contador automático de células sanguíneas.

3.2.10.2 Observações histopatológicas

Imediatamente após a retirada dos fêmures, foi realizada a dissecação dos rins, baço, fígado, coração, pulmões e estômago para avaliação do peso relativo. Todos esses órgãos foram armazenados em formol 10 % para posterior análise macroscópica e microscópica como descrito anteriormente.

Imediatamente após a dissecação, os órgãos e os tumores foram armazenados em formol 10 % para posterior análise macroscópica em relação à cor, tamanho e presença de focos hemorrágicos. Em seguida, os tumores foram desidratados com álcool, clarificados com xilol, embebidos em parafina e secções de 3-5 µm de espessura foram preparadas em lâminas. Após completa reidratação, as lâminas foram lavadas com água destilada, coradas com Hematoxilina/Eosina (H/E) e examinadas em microscópio óptico (400x).

3.2.10.3 Determinação do potencial genotóxico - Ensaio Cometa *in vivo*

Um total de 200 μ L de sangue periférico de cada animal foi retirado e acrescentou-se Ficoll para permitir o isolamento de CMSP. Depois de isoladas, 20 μ L de células mononucleares foram transferidas para tubos eppendorf contendo 110 μ L de agarose 0.5 % de baixo ponto de fusão para preparo das lâminas (3 lâminas por amostra). Os passos seguintes foram seguidos como descrito item 3.2.10.3.

3.2.10.4 Determinação de potencial mutagênico - Teste do Micronúcleo *in vivo*

Todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 24 h após o término do tratamento, imediatamente após a coleta de sangue. Os fêmures foram retirados, limpados e as epífises proximais foram seccionadas. A medula óssea foi retirada fazendo uso de seringas de 5 mL previamente preenchida com 0,5 mL de soro fetal bovino. Posteriormente, a agulha foi firmemente inserida na abertura do fêmur e o soro fetal bovino foi injetado de modo a deslocar a medula para dentro de um tubo Falcon contendo 3 mL de soro fetal bovino. Após a obtenção do material medular, este foi centrifugado (1000 rpm por 5 min), o sobrenadante foi descartado e o precipitado, homogeneizado. Uma gota da suspensão de células foi transferida para uma lâmina limpa e seca, sendo, em seguida, realizado o esfregaço. Foram preparadas duas lâminas por cada animal. Vinte e quatro horas após a confecção das lâminas, o material foi fixado e corado pelo método de Leishman. As lâminas foram montadas com entellan (SCHMID, 1975).

Toda a análise foi realizada em teste cego, utilizando microscópio óptico binocular, com objetivas de 20X e 40X. Foram considerados MNs as estruturas tipicamente arredondadas, com diâmetro de 1/5 a 1/20 do diâmetro dos eritrócitos jovens identificados pela coloração azulada (SCHMID, 1975; HEDDLE *et al.*, 1983). Um total de 1000 eritrócitos policromáticos (EPC) foi quantificado por lâmina (duas lâminas/animal) (HEDDLE *et al.*, 1973) (Figura 13).

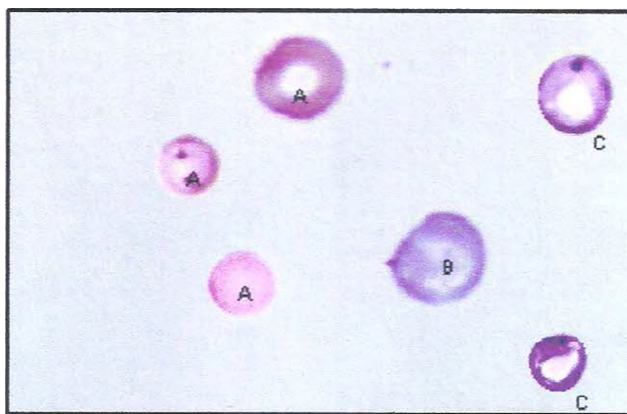


Figura 13 - Eritrócito normocromático (A), eritrócito policromático (B) e eritrócito policromático micronucleado (C). Fonte: Ribeiro *et al.*, 2003.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média. Possíveis diferenças significativas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman-Keuls ($p < 0.05$), utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da atividade e da seletividade citotóxica em linhagens celulares humanas (tumorais e normais)

Inicialmente, a citotoxicidade de tambjaminsas (Tambjaminsas C, E, F, G, H, I e J) foi determinada pelo teste do MTT em um painel de 5 linhagens celulares humanas (4 linhagens tumorais e 1 linhagem normal) após 72 horas de incubação. A CI_{50} (concentração capaz de inibir 50 % do crescimento celular) dos compostos testados está apresentada na **Tabela 6**.

Os resultados indicam que os compostos testados, com exceção de Tambjamina E ($CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$), apresentaram forte atividade citotóxica contra todas as linhagens celulares tumorais humanas utilizadas (HL-60, MDAMB-435, HCT-8 e SF-295) com valores de CI_{50} variando de 0,35 (0,32 - 0,38) $\mu\text{g/mL}$ a 3,42 (2,59 - 4,52) $\mu\text{g/mL}$.

Em células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH), o valor de CI_{50} encontrado para todos os compostos testados variou de 0,77 (0,55 - 1,08) $\mu\text{g/mL}$ a 4,16 (3,52 - 4,93) $\mu\text{g/mL}$. Com exceção de Tambjamina E ($CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$), o resultado revela baixa seletividade dos compostos para células tumorais humanas, uma vez que o índice de seletividade (CI_{50} em CMSPH / Média da CI_{50} em células tumorais) variou de 1,4 a 2,6.

Doxorrubicina, usada como controle positivo, também apresentou forte atividade citotóxica (CI_{50} variando de 0,02 a 0,48 $\mu\text{g/mL}$) contra as linhagens celulares tumorais humanas utilizadas acompanhada de baixa seletividade (índice de seletividade de 1,2) quando comparada com a ação em células normais.

Tabela 6 - Atividade citotóxica dos alcalóides sintéticos tambjamins (Tambjamins C, E, F, G, H, I e J) em linhagens tumorais humanas e em células normais pelo teste do MTT, após 72 h de incubação.

mbjamina	Linhagens Tumorais				CMSPH ^a	Índice de Seletividade (IS) ^b
	HL-60	MDAMB435	HCT-8	SF295		
	CI ₅₀ - µg/mL (µM) (IC 95 %)					
C	0,70 (2,29)	3,42 (11,20)	1,41 (4,62)	1,64 (5,37)	2,53 (8,28)	1,4
	0,59-0,82	2,59-4,52	1,25-1,59	1,45-1,86	1,74-3,68	
E	>25 (90,15)	>25 (90,15)	>25 (90,15)	>25 (90,15)	>25 (90,15)	Nd ^c
F	0,80 (2,26)	2,27 (6,42)	1,04 (2,94)	1,08 (3,06)	3,25 (9,20)	2,5
	0,67-0,95	1,78-2,91	0,83-1,30	0,87-1,35	2,38-4,37	
G	0,82 (2,51)	1,19 (3,65)	0,65 (1,99)	0,59 (1,81)	2,10 (6,44)	2,6
	0,75-0,88	0,98-1,44	0,57-0,73	0,50-0,69	1,45-3,04	
H	2,12 (6,23)	2,57 (7,55)	2,46 (7,23)	1,31 (3,85)	4,16	2,0
	1,87-2,41	2,26-2,93	2,07-2,92	1,15-1,48	(12,23)	
					3,52-4,93	
I	0,61 (1,72)	0,83 (2,34)	0,52 (1,47)	0,41 (1,16)	1,11 (3,13)	1,9
	0,49-0,77	0,71-0,96	0,46-0,59	0,35-0,48	0,83-1,50	
J	0,49 (1,33)	0,61 (1,66)	0,35 (0,95)	0,35 (0,95)	0,77 (2,09)	1,7
	0,41-0,60	0,52-0,72	0,32-0,38	0,28-0,43	0,55-1,08	
Dox	0,02 (0,04)	0,48 (0,88)	0,23 (0,42)	0,04 (0,08)	0,23 (0,42)	1,2
	0,01-0,02	0,34-0,66	0,19-0,25	0,03-0,05	0,02-0,56	

A tabela apresenta os valores de CI₅₀ (concentração capaz de inibir 50 % do crescimento celular) em µg/mL (µM) e o intervalo de confiança de 95 % (IC 95 %). Os dados foram obtidos de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo teste do MTT. ^a CMSPH = células mononucleadas de sangue periférico humano. ^b O índice de seletividade (IS) foi determinado a partir da razão entre a CI₅₀ em CMSPH e a média da CI₅₀ em células tumorais humanas. Doxorubicina (Dox) foi usada como controle positivo. ^c Nd = não determinado.

4.2 Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus*)

A atividade hemolítica dos 7 alcalóides sintéticos tambjamins (Tambjamins C, E, F, G, H, I e J) foi determinada em eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus*) após 1 e 2 h de incubação. A CE_{50} (concentração capaz de promover 50 % do efeito máximo) dos compostos testados está apresentada na Tabela 7.

Os resultados indicam que os compostos testados não foram capazes de causar lise dos eritrócitos nas concentrações testadas até 200 $\mu\text{g/mL}$. Isto sugere que a citotoxicidade dos compostos, provavelmente, não está relacionada com um processo de dano direto a membrana celular, mas sim, a uma via de morte celular mais específica.

Tabela 7 - Atividade hemolítica de tambjamins (Tambjamins C, E, F, G, H, I e J) em eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus*) após 1 e 2 h de incubação.

Tambjamina	CE_{50} - $\mu\text{g/mL}$ (μM)	
	1 h	2 h
C	>200 (654,94)	>200 (654,94)
E	>200 (721,19)	>200 (721,19)
F	>200 (565,91)	>200 (565,91)
G	>200 (613,14)	>200 (613,14)
H	>200 (587,85)	>200 (587,85)
I	>200 (564,59)	>200 (564,59)
J	>200 (543,09)	>200 (543,09)

A tabela apresenta os valores de CE_{50} (concentração capaz de promover 50 % do efeito máximo) em $\mu\text{g/mL}$ (μM) e o intervalo de confiança de 95 % (IC 95 %). Os dados foram obtidos de 2 experimentos independentes realizados em duplicata pelo teste Hemolítico.

4.3 Avaliação do padrão de morte celular e do efeito sobre a progressão do ciclo celular

A partir dos dados de citotoxicidade, decidiu-se estudar o padrão de morte celular induzido pelos compostos tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J), bem como, seus efeitos sobre a progressão do ciclo celular. A linhagem tumoral HL-60 (células leucêmicas humanas) foi utilizada como modelo para a continuidade do estudo, por ser uma linhagem de crescimento rápido, fácil manutenção e bem descrita na literatura para estudos anticâncer *in vitro*. As concentrações testadas dos compostos (Tamb I e J: 0,3 e 0,6 µg/mL; Doxorubicina: 0,3 µg/mL) foram escolhidas com base nos resultados do MTT nas quais foi possível avaliar o mecanismo de ação dos mesmos.

Nesta etapa do estudo, foram realizados ensaios de coloração, em citometria de fluxo e por eletroforese.

4.3.1 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade de células HL-60 foi determinada pelo teste do azul de tripan após 3, 6, 12 e 24 h de incubação com os compostos testes.

Os resultados indicam que Tamb I e Tamb J foram capazes de reduzir a viabilidade celular significativamente ($p < 0,05$) a partir de 6 h de incubação. Após este tempo, na concentração de 0,3 µg/mL, Tamb J reduziu o número de células viáveis em 37,05 %. Enquanto que na concentração de 0,6 µg/mL, a redução observada foi de 35,88 % e 40,95 % para Tamb I e Tamb J, respectivamente (**Figura 14**).

Em 12 h de incubação, na concentração de 0,3 µg/mL, Tamb I e Tamb J reduziram o número de células viáveis em 30,50 % e 31,32 %, respectivamente. Enquanto que na concentração de 0,6 µg/mL, a redução observada foi de 42,37 % e 56,83 % para Tamb I e Tamb J, respectivamente (**Figura 14**).

Em 24 h de incubação, a redução no número de células viáveis foi de 20,84 % e 36,17 % para Tamb I e Tamb J, respectivamente, na concentração de 0,3 µg/mL. Enquanto que na concentração de 0,6 µg/mL, a redução da

viabilidade celular foi bem superior com valores de 49,27 % e 59,94 % para Tamb I e Tamb J, respectivamente.

O controle positivo doxorrubicina (D, 0,3 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a viabilidade de células HL-60 a partir de 12 h de incubação. Neste tempo, a redução observada foi de 29,77 %. Porém, em 24 h, a redução do número de células viáveis foi mais elevada (53,55 %) demonstrando uma tendência de efeito tempo-dependente ($p < 0,05$).

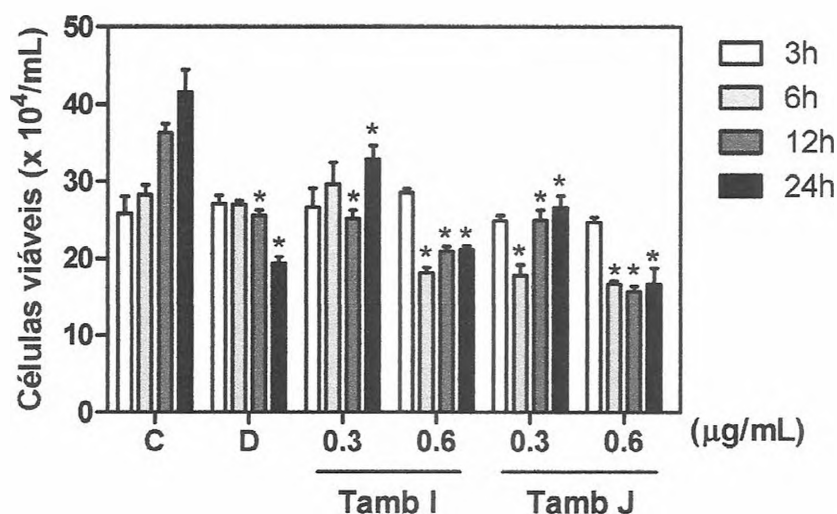


Figura 14 - Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre a viabilidade de células HL-60 determinado pelo teste do azul de tripan após 3, 6, 12 e 24 h de incubação.

O controle negativo e o controle positivo doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) estão apresentados por C e D, respectivamente. O gráfico apresenta os valores correspondentes à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

1.3.2 Análise morfológica

A morfologia de células HL-60 foi avaliada por métodos de coloração (May-Grünwald-Giemsa e brometo de etídeo/laranja de acridina) após 3, 6, 12 e 24 h de incubação com os compostos testes.

A análise morfológica da coloração com May-Grünwald-Giemsa permitiu observar que as células não-tratadas (controle negativo) apresentaram núcleos

volumosos, citoplasma homogêneo e integridade de membrana celular, característico de células viáveis. Já as células tratadas com Tamb I e Tamb J exibiram redução do volume celular, formação de blebb, corpos apoptóticos, fragmentação do DNA nuclear e alguns restos celulares, característicos de morte celular por indução de apoptose. Os efeitos foram mais intensos com o aumento da concentração testada (0,3 e 0,6 $\mu\text{g/mL}$). O controle positivo doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) também promoveu alterações morfológicas típicas de apoptose após o período de incubação (**Figura 15**).

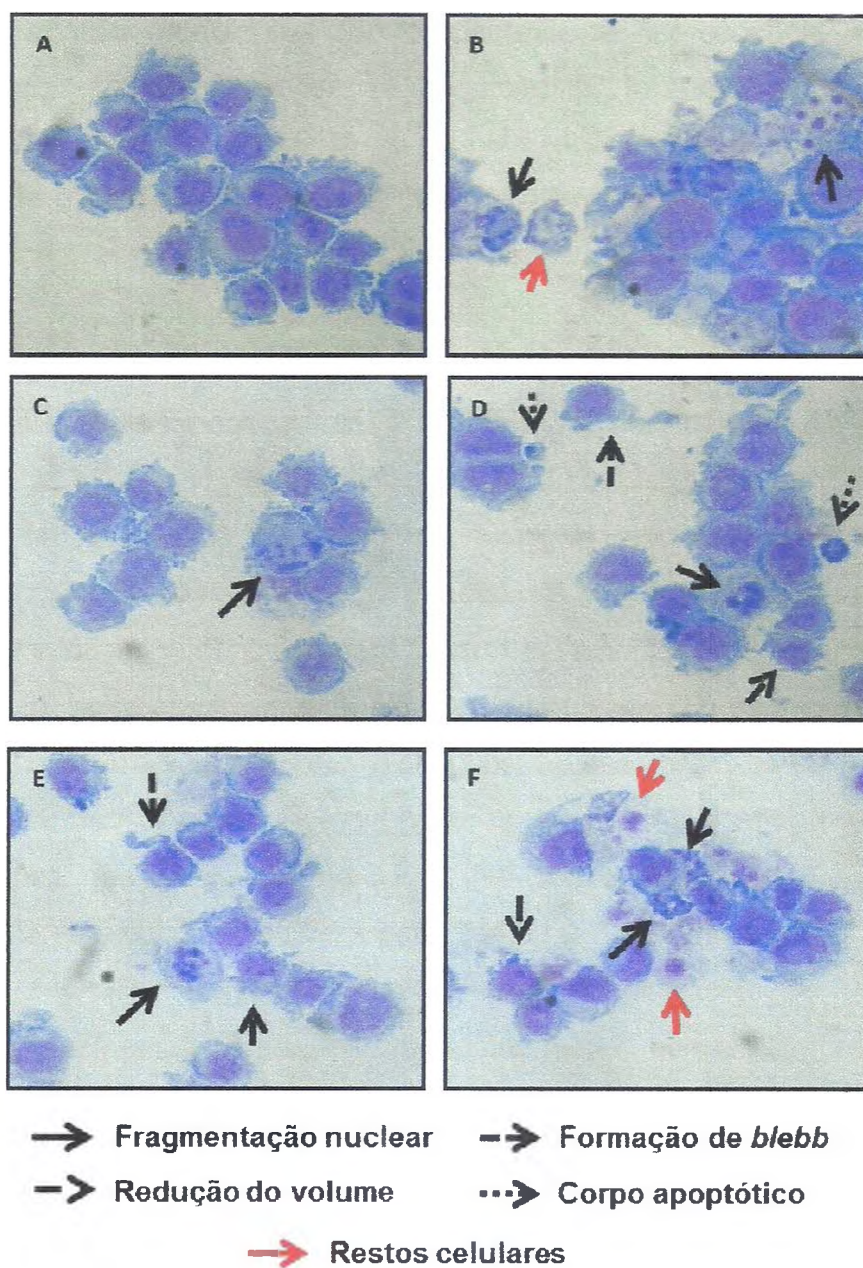


Figura 15 - Efeito de tambjamina I (Tamb I - 0,3 µg/mL, C; 0,6 µg/mL, D) e J (Tamb J - 0,3 µg/mL, E; 0,6 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HL-60 determinado por coloração com May-Grünwald-Giemsa após 24 h de incubação.

O controle negativo e o controle positivo doxorrubicina (0,3 µg/mL) estão representados em (A) e (B), respectivamente. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica (x400). As setas indicam os aspectos apoptóticos observados.

Na análise morfológica por microscopia de fluorescência utilizando o corante brometo de etídeo/laranja de acridina, foi possível observar um aumento significativo ($p < 0,05$) de células apoptóticas de modo tempo-dependente e com tendência a um efeito concentração-dependente. Após 3 h de incubação, apenas Tamb J, na concentração de $0,6 \mu\text{g/mL}$, foi capaz de induzir de modo significativo morte por apoptose ($18,53 \pm 6,09 \%$). Já após 6 h de incubação, Tamb I e Tamb J induziram morte por apoptose de modo significativo apenas na concentração de $0,6 \mu\text{g/mL}$ com percentuais de $18,20 \pm 4,92 \%$ e $23,87 \pm 3,67 \%$, respectivamente. Após 12 h, as tambjaminsas, de modo mais intenso e significativo, induziram apoptose em ambas as concentrações testadas. Na concentração de $0,3 \mu\text{g/mL}$, o percentual de células apoptóticas encontrado para Tamb I e Tamb J foi de $15,20 \pm 1,34 \%$ e $27,80 \pm 0,87 \%$, respectivamente. Na concentração de $0,6 \mu\text{g/mL}$, obedecendo a mesma ordem dos compostos testes, os valores foram $35,00 \pm 2,13 \%$ e $42,00 \pm 1,42 \%$. Após 24 h de incubação, houve morte por apoptose a qual foi mais intensa que no tempo de 12 h. Na concentração de $0,3 \mu\text{g/mL}$, os percentuais de células apoptóticas para Tamb I e Tamb J foram $35,22 \pm 2,64 \%$ e $48,39 \pm 3,27 \%$, respectivamente. Na concentração de $0,6 \mu\text{g/mL}$, obedecendo a mesma ordem dos compostos testes, os valores foram $69,44 \pm 1,28 \%$ e $82,56 \pm 1,21 \%$ (**Figuras 16**).

O aumento do número de células apoptóticas descrito acima foi acompanhado de redução significativa ($p < 0,05$) do número de células viáveis. Além disso, houve discreta alteração significativa no número de células necróticas apenas para o composto Tamb J nos tempos de 6 e 12 h e na concentração de $0,6 \mu\text{g/mL}$.

O controle positivo doxorrubicina ($0,3 \mu\text{g/mL}$) induziu morte por apoptose a partir de 12 h de incubação. O controle negativo apresentou ocasionais células apoptóticas e raras células necróticas (**Figuras 16**).

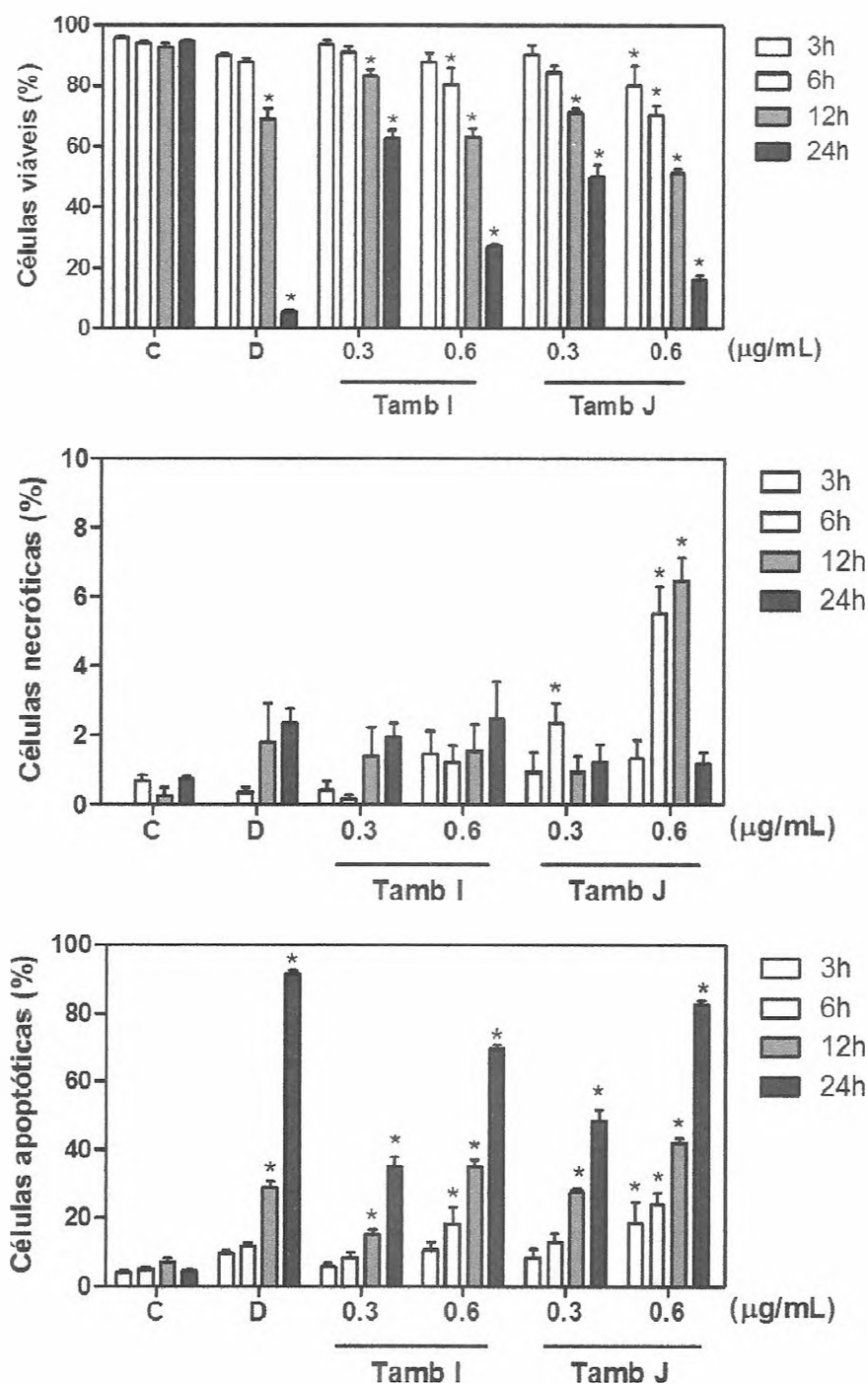


Figura 16 - Efeito de tambjamins (**Tamb I** e **Tamb J**) sobre a indução de morte celular de células HL-60 determinado por coloração diferencial com Brometo de Etídio e Laranja de Acridina, após 3, 6, 12 e 24 h de incubação de incubação.

O controle negativo e o controle positivo doxorrubicina (0,3 µg/mL) estão representados por C e D, respectivamente. O gráfico apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

4.3.3 Testes utilizando citometria de fluxo

a) Determinação da integridade de membrana e viabilidade celular

A integridade da membrana de células HL-60 foi determinada por citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo como agente fluorogênico, após 3, 6, 12 e 24 h de incubação com os compostos testes.

Os resultados indicam que, após 3 h de incubação, as tambjamins, nas concentrações testadas, não reduziram significativamente ($p < 0,05$) o número de células com membrana íntegra em relação ao controle negativo ($98,12 \pm 0,22$ %). Após 6 h de incubação, Tamb I e Tamb J reduziram de modo significativo ($p < 0,05$) o número de células com membrana íntegra apenas na concentração de $0,6 \mu\text{g/mL}$ com percentuais de $95,63 \pm 0,63$ % e $96,21 \pm 0,77$ %, respectivamente. O mesmo ocorreu após 12 h de incubação, quando observaram-se valores de $93,07 \pm 0,83$ % e $91,79 \pm 0,53$ % para células com membrana íntegra após exposição a Tamb I e Tamb J, respectivamente. Em 24 h, Tamb I e Tamb J também afetaram de modo significativo a integridade da membrana celular apenas na concentração de $0,6 \mu\text{g/mL}$. Obedecendo a mesma ordem dos compostos, os valores determinados foram $94,14 \pm 0,58$ % e $87,03 \pm 2,57$ %. O controle positivo doxorrubicina ($0,3 \mu\text{g/mL}$) não foi capaz de alterar de modo significante a membrana de células HL-60 nos tempos de incubação avaliados (**Figura 17**).

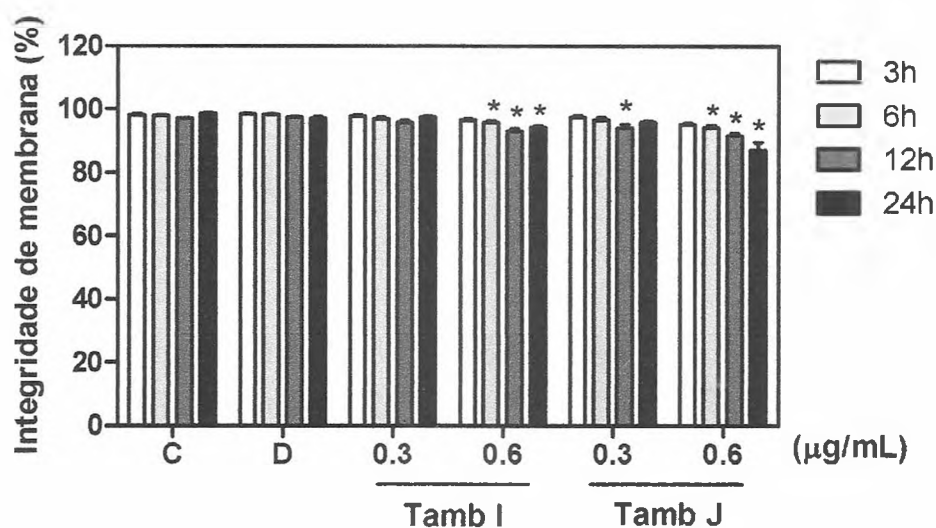


Figura 17 - Efeito de tambjamina I (**Tamb I**) e J (**Tamb J**) sobre o a integridade de membrana citoplasmática de células HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, respectivamente, após 3, 6, 12 e 24 h de incubação. O controle negativo e o controle positivo doxorrubicina (0,3 µg/mL) estão representados por C e D, respectivamente. O gráfico apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo no respectivo tempo de incubação por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

A complementação do estudo morfológico de células HL-60 foi estabelecida pela análise do volume e da granulosidade celular por citometria de fluxo, após 3, 6, 12 e 24 h de incubação com os compostos testes. Estes parâmetros foram utilizados na determinação da viabilidade celular.

Os resultados indicam que as tambjaminsas, após 3 h de incubação, não reduziram significativamente ($p < 0,05$) o número de células com padrão morfológico viável. Após 6 h de exposição, uma redução significativa foi observada apenas na concentração de 0,6 µg/mL para os compostos Tamb I e Tamb J com valores de células viáveis de $27,07 \pm 0,23 \times 10^4$ células/mL e $23,88 \pm 0,78 \times 10^4$ células/mL, respectivamente. Após 12 h, a redução significativa ($p < 0,05$) do número de células viáveis ocorreu também apenas na concentração de 0,6 µg/mL com valores de $24,06 \pm 0,53 \times 10^4$ células/mL e $26,47 \pm 1,36 \times 10^4$ células/mL para Tamb I e Tamb J, respectivamente. Após 24 h de incubação, a redução significativa observada no número de células viáveis

apresentou uma tendência de efeito concentração-dependente. Neste tempo de exposição e na concentração de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, os valores encontrados para Tamb I e Tamb J foram $59,97 \pm 1,89 \times 10^4$ células/mL e $49,35 \pm 4,59 \times 10^4$ células/mL, respectivamente. Já na concentração de 0,6 $\mu\text{g/mL}$, os valores registrados para células viáveis foram $44,35 \pm 2,23 \times 10^4$ células/mL e $49,35 \pm 4,59 \times 10^4$ células/mL, respectivamente. O controle positivo doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) promoveu redução no número de células viáveis a partir de 12 h de incubação com valor, para este tempo, de $26,67 \pm 0,86 \times 10^4$ células/mL. Após 24 h de exposição, o valor encontrado para doxorrubicina foi de $21,47 \pm 2,80 \times 10^4$ células/mL (Figura 18).

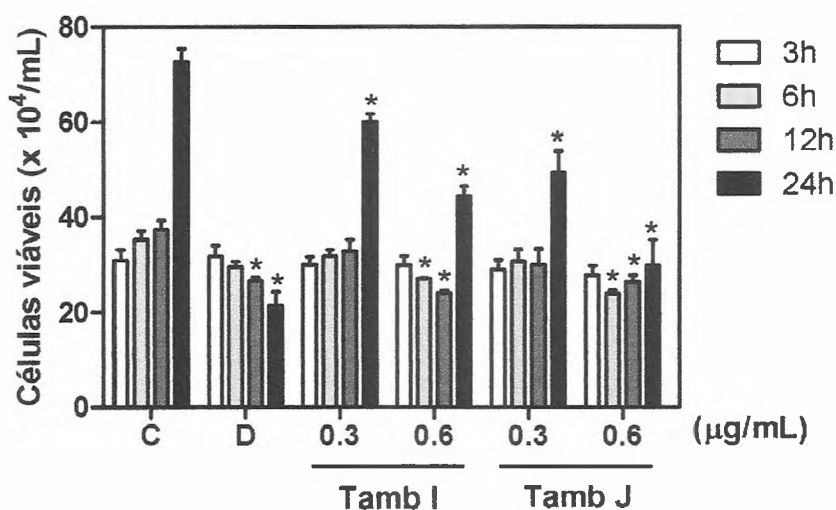


Figura 18 - Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre a viabilidade de células HL-60 determinado por citometria de fluxo, usando o FSC (*Forward scatter* – desvio da luz para frente) e SSC (*Side Scatter* – desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após 3, 6, 12 e 24 h de incubação.

O controle negativo e o controle positivo doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) estão representados por C e D, respectivamente. O gráfico apresenta os valores correspondentes à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo no respectivo tempo de incubação por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

b) Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria

O potencial transmembrânico da mitocôndria de células HL-60 foi determinado por citometria de fluxo utilizando a rodamina 123 como agente fluorogênico, após 3, 6, 12 e 24 h de incubação com os compostos testes.

Os resultados indicam que Tamb I e Tamb J, nas concentrações testadas, não foram capazes de promover despolarização mitocondrial significativa ($p < 0,05$) de células HL-60 até 24 h de incubação (**Figura 19**).

O controle positivo doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de promover significativa despolarização mitocondrial a partir de 12 h de incubação. Após 12 e 24 h, o percentual de células com mitocôndrias despolarizadas encontrado foi de $12,78 \pm 3,93 \%$ e $36,06 \pm 3,14 \%$, respectivamente (**Figura 19**).

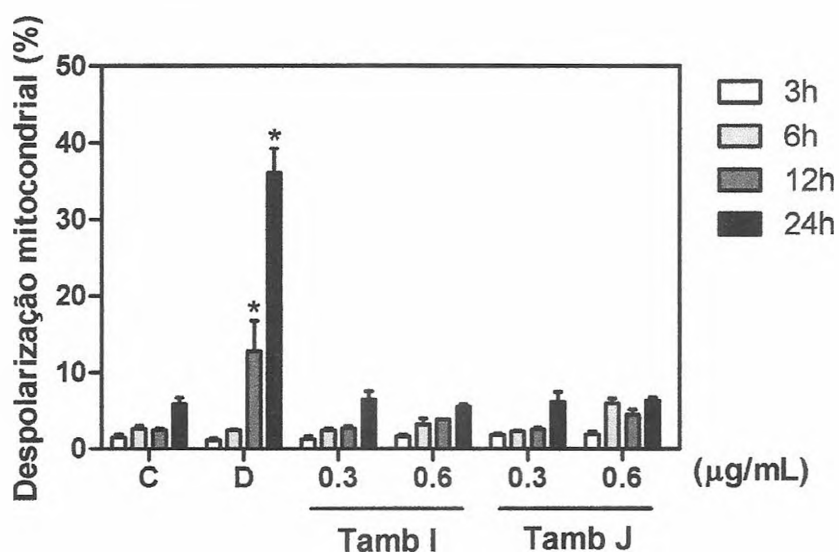


Figura 19 - Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre o potencial transmembrânico de mitocôndrias de células HL-60 determinado por citometria de fluxo, usando rodamina 123, após 3, 6, 12 e 24 h de incubação.

O controle negativo e o controle positivo doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) estão representados por C e D, respectivamente. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo no respectivo tempo de incubação por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

c) Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula

O conteúdo de DNA nuclear de células HL-60, que reflete as fases do ciclo celular, foi determinado por citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo como agente fluorogênico, após 3, 6, 12 e 24 h de incubação com os compostos testes.

Os resultados indicam que as tambjamins em nenhum tempo de incubação promoveu alteração nas fases do ciclo celular (G_1 , S e G_2/M) quando comparado com o controle negativo (**Tabela 8 e 9**).

Entretanto, foi possível observar um aumento significativo ($p < 0,05$) de DNA sub- G_1 (DNA fragmentado ou condensado) para Tamb I e Tamb J com tendência a efeito tempo e concentração-dependente. Após 3 h de incubação, as tambjamins testadas não foram capazes de induzir fragmentação significativa do DNA. Após 6 h, Tamb I induziu fragmentação significativa ($p < 0,05$) do DNA apenas na concentração de $0,6 \mu\text{g/mL}$. Nesta concentração, o valor encontrado foi de $35,52 \pm 4,04 \%$. Tamb J, por sua vez, promoveu fragmentação significativa do DNA em ambas as concentrações testadas ($0,3$ e $0,6 \mu\text{g/mL}$) com valores de DNA fragmentado de $34,12 \pm 2,84 \%$ e $49,14 \pm 4,03 \%$, respectivamente. Após 12 h de exposição, Tamb I induziu fragmentação do DNA apenas na concentração de $0,6 \mu\text{g/mL}$ com valor de $39,85 \pm 1,05 \%$ de DNA fragmentado. Já Tamb J promoveu fragmentação significativa em ambas as concentrações testadas. Obedecendo a mesma ordem das concentrações, os valores encontrados foram $34,45 \pm 2,39 \%$ e $51,52 \pm 3,42 \%$. Após 24 h, Tamb I foi capaz de induzir fragmentação do DNA de $32,17 \pm 1,53 \%$ e $48,12 \pm 6,15 \%$ nas concentrações testadas de $0,3$ e $0,6 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. De modo semelhante, houve fragmentação do DNA de $36,74 \pm 1,38 \%$ e $65,30 \pm 6,68$ por exposição a $0,3$ e $0,6 \mu\text{g/mL}$ de Tamb J, respectivamente (**Tabela 18 e 19**).

O controle positivo doxorrubicina ($0,3 \mu\text{g/mL}$) foi capaz de promover significativa ($p < 0,05$) fragmentação do DNA a partir de 12 h de incubação. Após 12 e 24 h, o percentual de DNA fragmentado encontrado foi de $30,87 \pm 4,73 \%$ e $69,17 \pm 7,25 \%$, respectivamente (**Tabela 8 e 9**).

Tabela 8 - Efeito de tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J) sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 3, 6 e 12 h de incubação.

Substâncias	Concentrações (µg/mL)	Conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G ₁	G ₁	S	G ₂ /M
3 h de incubação					
Controle	-	13,22 ± 1,75	18,14 ± 1,29	75,19 ± 1,79	7,04 ± 0,61
Doxorrubicina	0,3	12,21 ± 1,18	16,43 ± 0,62*	76,57 ± 1,41	7,06 ± 1,06
Tamb I	0,3	15,63 ± 2,44	16,51 ± 0,83*	77,18 ± 1,73	5,72 ± 0,47
	0,6	25,68 ± 4,75	14,42 ± 1,22	79,16 ± 1,58	6,16 ± 0,85
Tamb J	0,3	22,97 ± 3,84	12,35 ± 1,55	79,37 ± 1,96	7,51 ± 0,58
	0,6	32,56 ± 4,90	13,17 ± 1,32	81,37 ± 2,16	6,78 ± 1,20
6 h de incubação					
Controle	-	15,22 ± 2,28	15,47 ± 2,09	75,36 ± 2,68	7,60 ± 0,53
Doxorrubicina	0,3	16,72 ± 1,78	11,42 ± 1,13	83,06 ± 1,53	5,52 ± 0,44
Tamb I	0,3	22,58 ± 3,51	16,14 ± 2,62	76,46 ± 2,98	7,39 ± 0,47
	0,6	35,52 ± 4,04*	15,58 ± 3,22	75,74 ± 4,05	8,51 ± 1,45
Tamb J	0,3	34,12 ± 2,84*	15,92 ± 2,52	76,91 ± 3,08	7,10 ± 0,73
	0,6	49,14 ± 4,03*	14,82 ± 2,43	75,41 ± 4,27	8,55 ± 1,27
12 h de incubação					
Controle	-	18,27 ± 1,69	16,42 ± 0,82	76,11 ± 0,82	7,47 ± 0,30
Doxorrubicina	0,3	30,87 ± 4,73*	8,46 ± 0,33	89,03 ± 1,09	2,51 ± 1,07
Tamb I	0,3	23,10 ± 0,56	18,31 ± 0,72	74,13 ± 1,35	8,45 ± 0,67
	0,6	39,85 ± 1,05*	19,45 ± 0,62	73,95 ± 1,35	7,29 ± 0,89
Tamb J	0,3	34,45 ± 2,39*	16,42 ± 0,67	74,62 ± 0,62	8,96 ± 0,34
	0,6	51,52 ± 3,42*	17,76 ± 1,23	76,70 ± 1,85	6,08 ± 0,57

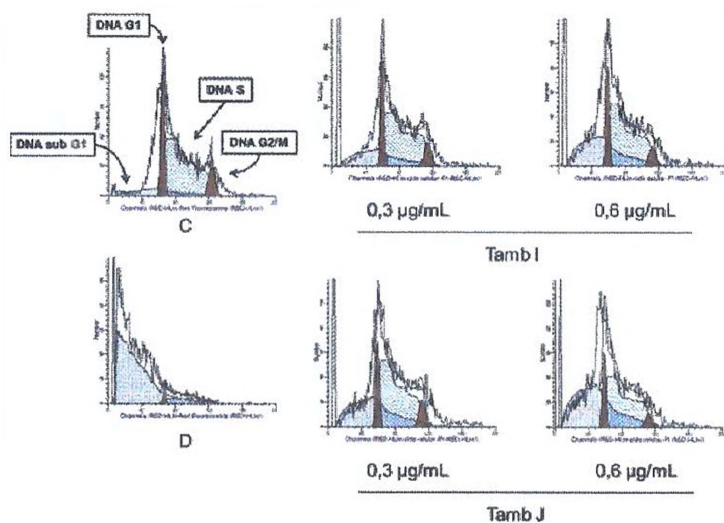
A tabela apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. *, p<0,05 quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. Doxorrubicina foi usada como controle positivo.

Tabela 8 - Efeito de tambjamina I (**Tamb I**) e J (**Tamb J**) sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 3, 6 e 12 h de incubação.

Substâncias	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G ₁	G ₁	S	G ₂ /M
3 h de incubação					
Controle	-	13,22 \pm 1,75	18,14 \pm 1,29	75,19 \pm 1,79	7,04 \pm 0,61
Doxorrubicina	0,3	12,21 \pm 1,18	16,43 \pm 0,62*	76,57 \pm 1,41	7,06 \pm 1,06
Tamb I	0,3	15,63 \pm 2,44	16,51 \pm 0,83*	77,18 \pm 1,73	5,72 \pm 0,47
	0,6	25,68 \pm 4,75	14,42 \pm 1,22	79,16 \pm 1,58	6,16 \pm 0,85
Tamb J	0,3	22,97 \pm 3,84	12,35 \pm 1,55	79,37 \pm 1,96	7,51 \pm 0,58
	0,6	32,56 \pm 4,90	13,17 \pm 1,32	81,37 \pm 2,16	6,78 \pm 1,20
6 h de incubação					
Controle	-	15,22 \pm 2,28	15,47 \pm 2,09	75,36 \pm 2,68	7,60 \pm 0,53
Doxorrubicina	0,3	16,72 \pm 1,78	11,42 \pm 1,13	83,06 \pm 1,53	5,52 \pm 0,44
Tamb I	0,3	22,58 \pm 3,51	16,14 \pm 2,62	76,46 \pm 2,98	7,39 \pm 0,47
	0,6	35,52 \pm 4,04*	15,58 \pm 3,22	75,74 \pm 4,05	8,51 \pm 1,45
Tamb J	0,3	34,12 \pm 2,84*	15,92 \pm 2,52	76,91 \pm 3,08	7,10 \pm 0,73
	0,6	49,14 \pm 4,03*	14,82 \pm 2,43	75,41 \pm 4,27	8,55 \pm 1,27
12 h de incubação					
Controle	-	18,27 \pm 1,69	16,42 \pm 0,82	76,11 \pm 0,82	7,47 \pm 0,30
Doxorrubicina	0,3	30,87 \pm 4,73*	8,46 \pm 0,33	89,03 \pm 1,09	2,51 \pm 1,07
Tamb I	0,3	23,10 \pm 0,56	18,31 \pm 0,72	74,13 \pm 1,35	8,45 \pm 0,67
	0,6	39,85 \pm 1,05*	19,45 \pm 0,62	73,95 \pm 1,35	7,29 \pm 0,89
Tamb J	0,3	34,45 \pm 2,39*	16,42 \pm 0,67	74,62 \pm 0,62	8,96 \pm 0,34
	0,6	51,52 \pm 3,42*	17,76 \pm 1,23	76,70 \pm 1,85	6,08 \pm 0,57

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. *, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. Doxorrubicina foi usada como controle positivo.

Tabela 9 - Efeito de tambjamina I (**Tamb I**) e J (**Tamb J**) sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HL-60 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 24 h de incubação.



Substâncias	Concentrações (µg/mL)	Conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G ₁	G ₁	S	G ₂ /M
24 h de incubação					
Controle	-	17,43 ± 0,79	17,00 ± 1,70	76,00 ± 1,80	6,99 ± 0,28
Doxorrubicina	0,3	69,17 ± 7,25*	15,17 ± 5,62	76,97 ± 4,38	7,87 ± 2,70
Tamb I	0,3	32,17 ± 1,53*	14,38 ± 1,72	80,26 ± 1,89	5,36 ± 0,41
	0,6	48,12 ± 6,15*	16,41 ± 0,75	81,07 ± 1,08	2,52 ± 0,58
Tamb J	0,3	36,74 ± 1,38*	14,18 ± 1,30	81,68 ± 1,41	4,15 ± 0,55
	0,6	65,30 ± 6,68*	13,41 ± 0,92	83,69 ± 1,25	2,89 ± 0,65

A tabela apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. *, p<0,05 quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. Doxorubicina foi usada como controle positivo. À esquerda da tabela, estão apresentados os histogramas referentes ao DNA de células do controle negativo (C), do tratamento com doxorubicina (D) e do tratamento com tambjamins I e J obtidos pelo programa *ModFit LT 3.1 software*.

d) Determinação da externalização da Fosfatidilserina

A externalização da fosfatidilserina de células HL-60 foi determinada por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com ficoeritrina em associação com 7-Amino-Actinomicina-D como agentes fluorogênicos, após 24 h de incubação com os compostos testes (**Figura 20**).

Os resultados indicam que as tambjamins foram capazes de promover externalização da fosfatidilserina de modo significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo ($4,12 \pm 0,73$ %). Na concentração de $0,3 \mu\text{g/mL}$, Tamb I e Tamb J induziram externalização de $14,78 \pm 1,10$ % e $26,61 \pm 3,65$ %, respectivamente. Já na concentração de $0,6 \mu\text{g/mL}$, o efeito foi mais intenso para ambos os compostos. Tamb I e Tamb J promoveram externalização de fosfatidilserina de $46,42 \pm 3,97$ % e $66,36 \pm 6,10$ %.

O controle positivo doxorrubicina ($0,3 \mu\text{g/mL}$) também foi capaz de promover externalização significativa de fosfatidilserina após 24 h de incubação. O percentual encontrado foi de $85,27 \pm 2,92$ % (**Figura 20**).

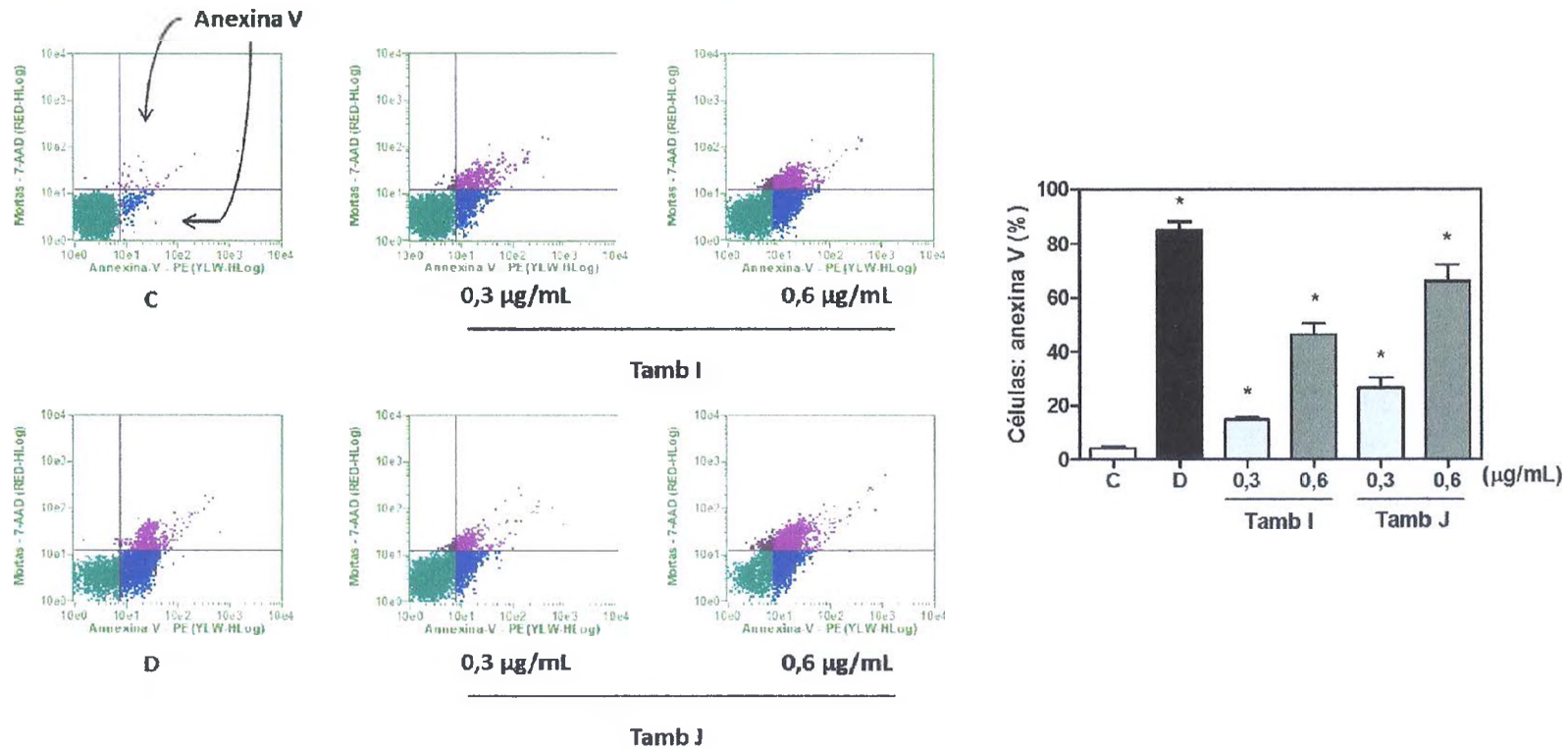


Figura 20 - Efeito de tambjamina I (**Tamb I**) e J (**Tamb J**) sobre a externalização da fosfatidilserina de células HL-60 determinado por citometria de fluxo, usando anexina-V e 7-amino-actinomicina-D (7-AAD), após 24 h de incubação.

O controle negativo e o controle positivo doxorrubicina (0,3 µg/mL) estão representados por C e D, respectivamente. O gráfico apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, p<0,05 quando comparado com o controle negativo no respectivo tempo de incubação por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. A esquerda do gráfico, estão apresentados os dotplots referente às células obtidos pelo programa *Guava Express Plus software*.

e) Determinação da atividade das Caspases -3, -7, -8 e -9

A atividade das caspases iniciadoras -8/-9 e efetoras -3/-7 de células HL-60 foi determinada por citometria de fluxo utilizando FLICA como agente fluorogênico, após 24 h de incubação com os compostos testes.

Referente à caspase iniciadora -8, os resultados indicam que as tambjamins foram capazes de ativar de modo significativo ($p < 0,05$) esse marcador celular em ambas as concentrações testadas (0,3 e 0,6 $\mu\text{g/mL}$). Na concentração de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, a ativação encontrada foi de $7,72 \pm 0,69 \%$ e $10,65 \pm 0,61 \%$ para Tamb I e Tamb J, respectivamente. Já na concentração de 0,6 $\mu\text{g/mL}$, os valores encontrados foram maiores para ambos os compostos testados. Obedecendo a mesma ordem dos compostos, houve ativação de caspase -8 em $27,60 \pm 1,45 \%$ e $57,42 \pm 1,50 \%$, respectivamente (**Figura 21**).

Na avaliação da caspase iniciadora -9, os resultados indicam que as tambjamins também promovem ativação significativa ($p < 0,05$) deste marcador em ambas as concentrações testadas (0,3 e 0,6 $\mu\text{g/mL}$). Na menor concentração, Tamb I e Tamb J ativaram caspase -9 em $12,63 \pm 1,94 \%$ e $15,44 \pm 3,10 \%$ de células, respectivamente. Na maior concentração, houve ativação em $27,20 \pm 4,02 \%$ e $56,14 \pm 6,55 \%$ de células por Tamb I e Tamb J, respectivamente (**Figura 22**).

Em relação às caspases efetoras -3/-7, os resultados indicam que as tambjamins promoveram ativação significativa ($p < 0,05$) desses marcadores celulares nas concentrações testadas. Na concentração de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, Tamb I e Tamb J promoveram a ativação de caspases -3/-7 em $7,87 \pm 0,77 \%$ e $8,77 \pm 1,70 \%$ de células, respectivamente. Na concentração de 0,6 $\mu\text{g/mL}$, o efeito foi mais evidente com porcentagem de $24,10 \pm 4,76 \%$ e $40,34 \pm 3,69 \%$ de células com caspases ativas, respectivamente (**Figura 23**).

O controle positivo doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) também foi capaz de promover ativação significativa de caspases iniciadoras -8/-9 e efetoras -3/-7 após 24 h de incubação. O percentual de ativação encontrado para as caspases -8, -9 e -3/-7 foi de $13,42 \pm 0,41 \%$, $40,62 \pm 4,00 \%$ e $26,13 \pm 2,54 \%$, respectivamente (**Figura 21, 22 e 23**).

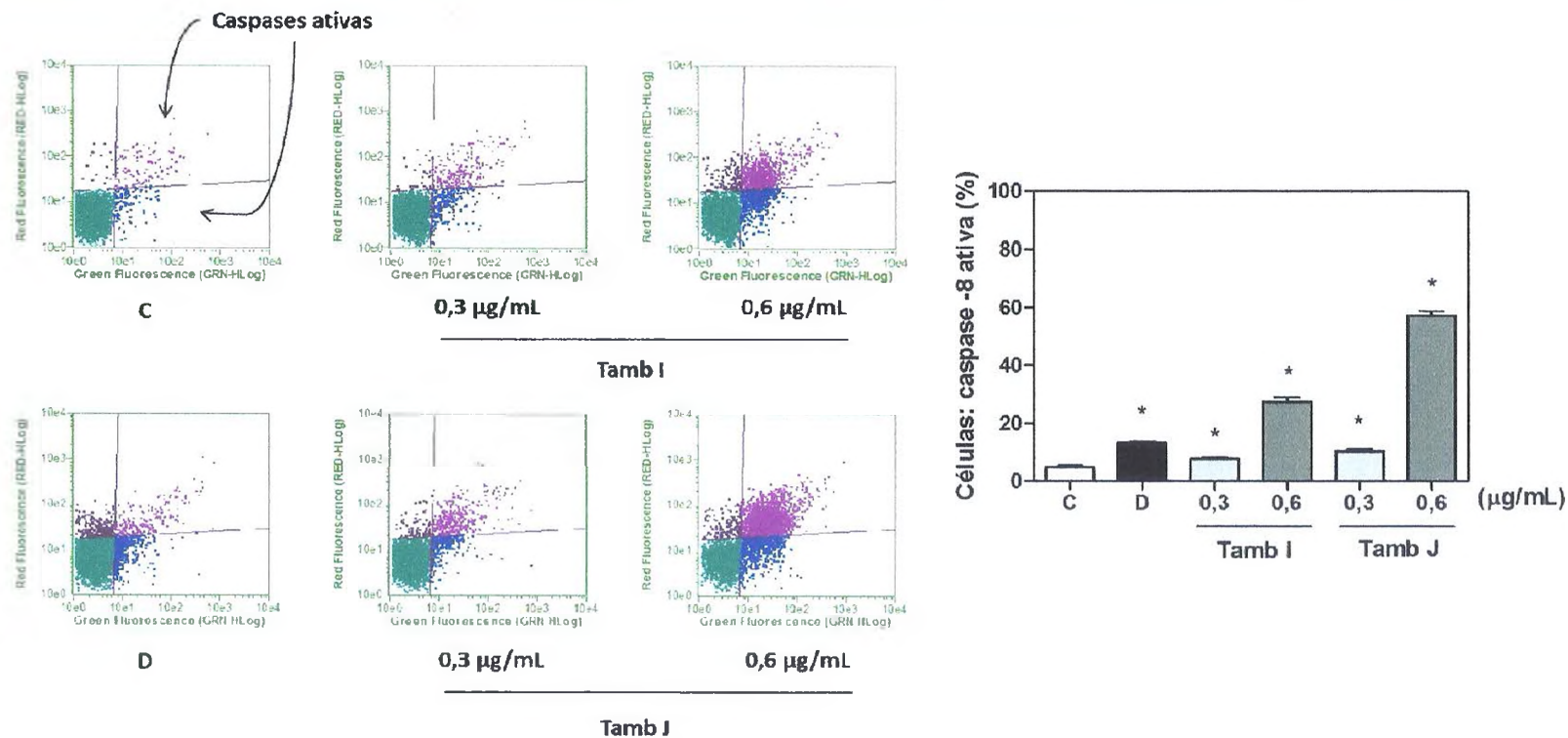


Figura 21 - Efeito de tambjamina I (**Tamb I**) e J (**Tamb J**) sobre a ativação da caspase iniciadora -8 de células HL-60 determinado por citometria de fluxo, usando FLICA e 7-amino-actinomicina-D (7-AAD), após 24 h de incubação.

O controle negativo e o controle positivo doxorubicina (0,3 µg/mL) estão representados por C e D, respectivamente. O gráfico apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo no respectivo tempo de incubação por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. A esquerda do gráfico, estão apresentados os dotplots referente às células obtidos pelo programa *Guava Express Plus software*.

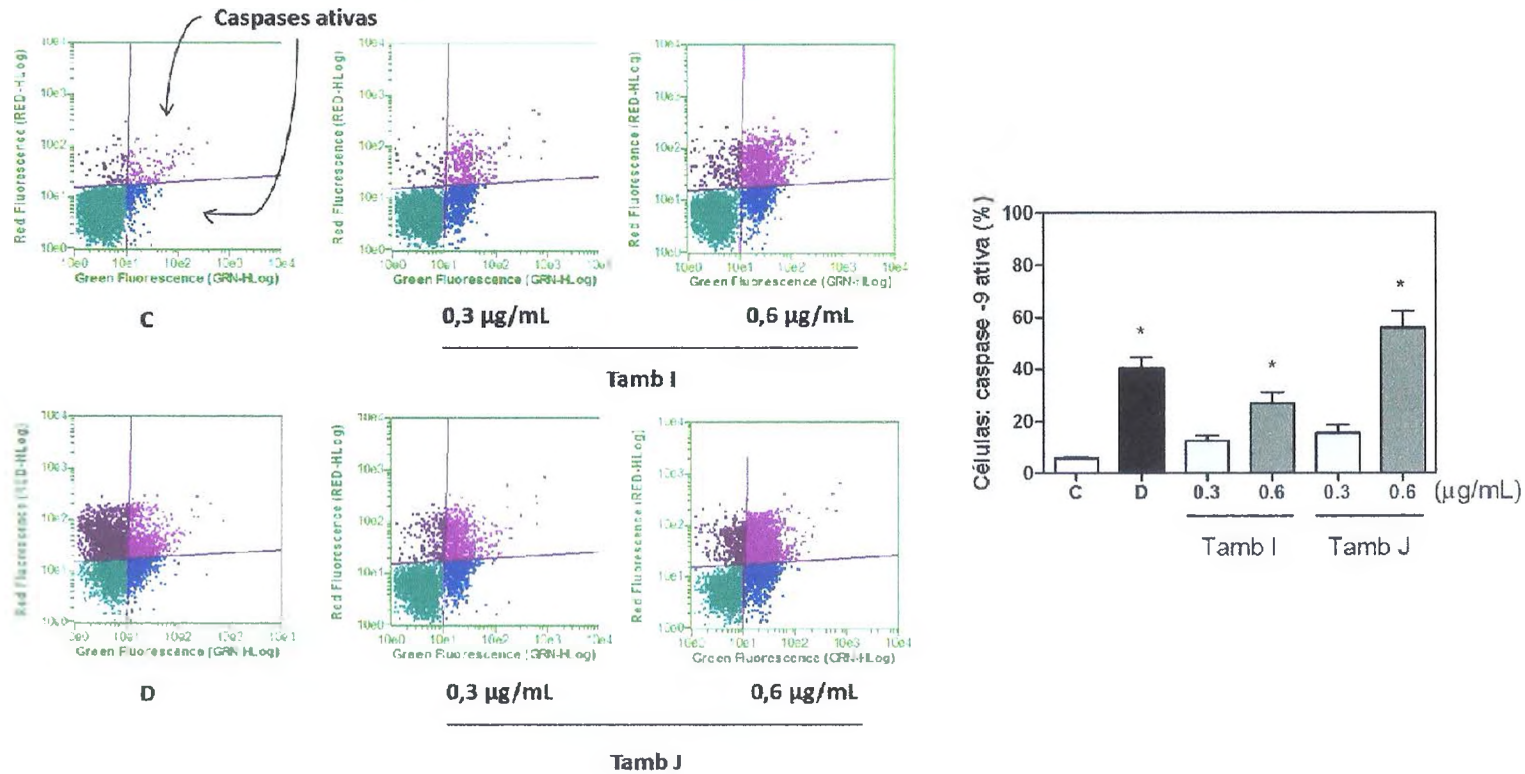


Figura 22 - Efeito de tambjamina I (**Tamb I**) e J (**Tamb J**) sobre a ativação da caspase iniciadora -9 de células HL-60 determinado por citometria de fluxo, usando FLICA e 7-amino-actinomicina-D (7-AAD), após 24 h de incubação.

O controle negativo e o controle positivo doxorrubicina (0,3 µg/mL) estão representados por C e D, respectivamente. O gráfico apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo no respectivo tempo de incubação por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. A esquerda do gráfico, estão apresentados os dotplots referente às células obtidos pelo programa *Guava Express Plus software*.

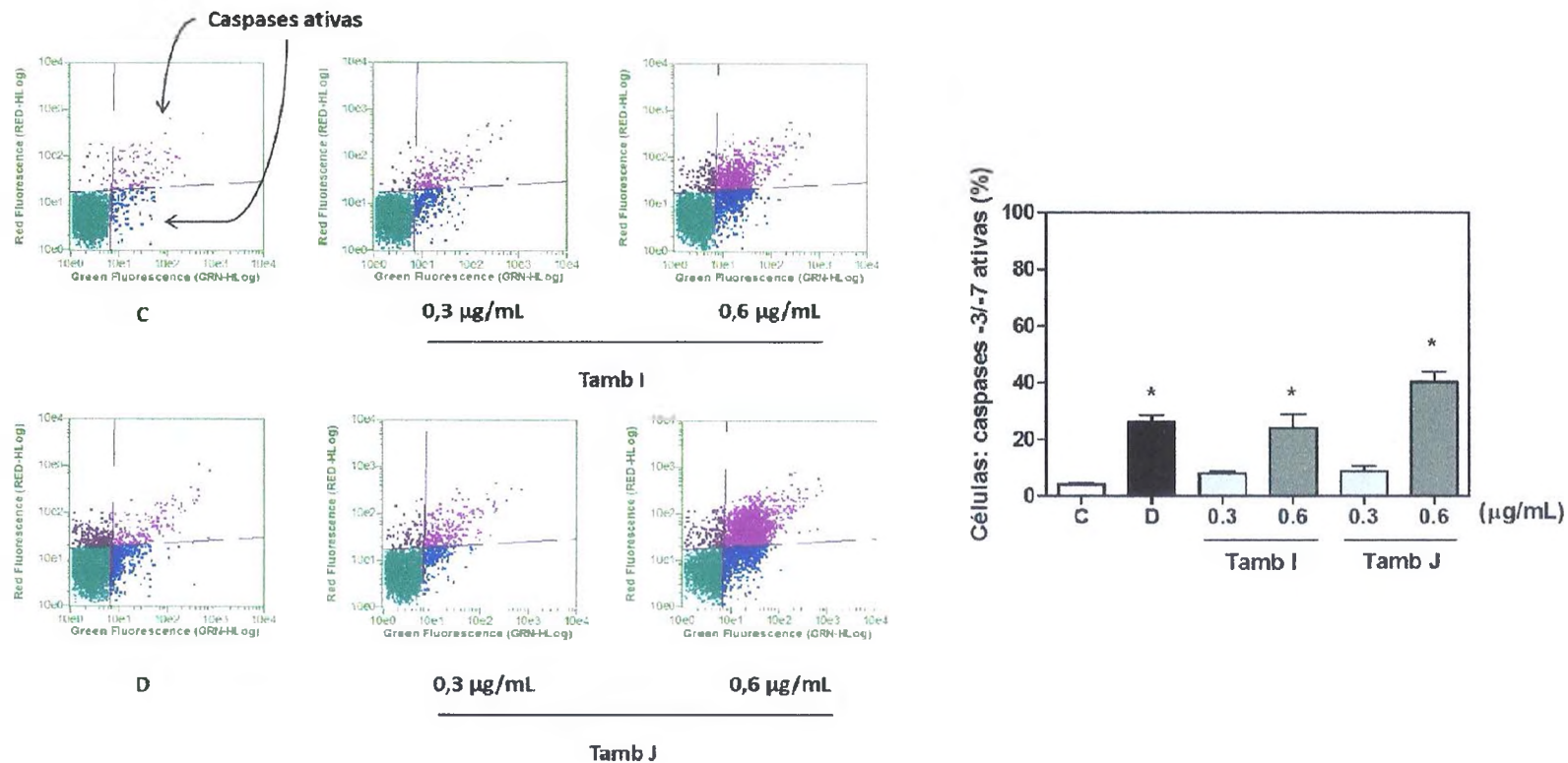


Figura 23 - Efeito de tambjamina I (**Tamb I**) e J (**Tamb J**) sobre a ativação das caspases efetoras -3/-7 de células HL-60 determinado por citometria de fluxo, usando FLICA e 7-amino-actinomicina-D (7-AAD), após 24 h de incubação.

O controle negativo e o controle positivo doxorrubicina (0,3 µg/mL) estão representados por C e D, respectivamente. O gráfico apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, p<0,05 quando comparado com o controle negativo no respectivo tempo de incubação por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. A esquerda do gráfico, estão apresentados os dotplots referente às células obtidos pelo programa *Guava Express Plus software*.

4.3.4 Avaliação do dano no DNA

O dano no DNA de células HL-60 foi avaliado por meio do ensaio Cometa após 24 h de incubação.

Os resultados indicam que as tambjamins promoveram dano significativo ($p < 0,05$) no DNA nas duas concentrações testadas (0,3 e 0,6 $\mu\text{g/mL}$) em relação ao controle negativo ($\text{ID} = 5,25 \pm 1,49$). Os valores para o índice de dano (ID) de Tamb I e Tamb J, na concentração de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, foram $42,25 \pm 2,39$ e $71,25 \pm 3,22$, respectivamente. Já na maior concentração, os valores de ID, obedecendo a mesma ordem dos compostos, foram $51,75 \pm 2,50$ e $85,40 \pm 2,25$, respectivamente (**Tabela 10**).

O controle positivo doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) também foi capaz de promover dano significativo ($p < 0,05$) no DNA de células HL-60 após 24 h de incubação. O valor encontrado foi de $247,60 \pm 7,47$ (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Efeito de tambjamina I (**Tamb I**) e J (**Tamb J**) sobre o DNA de células HL-60 pelo ensaio cometa, após 24 h de incubação.

Substâncias	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Índice de Dano (ID)
Controle	-	$5,25 \pm 1,49$
Doxorrubicina	0,3	$247,60 \pm 7,47^*$
Tamb I	0,3	$42,25 \pm 2,39^*$
	0,6	$51,75 \pm 2,50^*$
Tamb J	0,3	$71,25 \pm 3,22^*$
	0,6	$85,40 \pm 2,25^*$

A tabela apresenta os valores correspondentes à média \pm E.P.M. de dois experimentos independentes realizados em duplicata. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. *, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

4.4 Determinação da ação sobre as enzimas topoisomerase I e II

A ação do alcalóide sintético tambjamina J sobre as enzimas topoisomerase I e II foi determinada pelo ensaio de relaxamento do DNA.

Observando o padrão de corrida eletroforética no ensaio com topoisomerase I (**Figura 24**), nota-se que Tamb J, linhas 4-7, foi capaz de inibir a formação de complexos clivados na concentração de 100 μM . Nesta concentração, como consequência, é possível observar ausência de DNA relaxado. Esta observação baseia-se no padrão de corrida eletroforética da linha 2 do gel (DNA superhelicoidizado + Topo I) que é decorrente da presença de bandas inferiores de DNA, que na eletroforese tendem a correr mais rapidamente. O padrão de corrida para o DNA superhelicoidizado pode ser observado na linha 1, que corresponde ao branco do teste (DNA superhelicoidizado + veículo). O controle positivo CPT (1 μM) induziu formação intensa de complexos clivados como pode ser observado na linha 3 do gel.

A análise do resultado do ensaio com topoisomerase II (**Figura 25**) indica que Tamb J (linhas 4-7), na concentração de 10 μM , foi também capaz de inibir a formação de complexos clivados com consequente inibição do relaxamento do DNA. O controle positivo VP-16 (100 μM) induziu formação intensa de complexos clivados como pode ser observado na linha 3 do gel. O padrão de corrida para DNA superhelicoidizado e relaxado podem ser observados nas linhas 1 (DNA superhelicoidizado + veículo) e 2 (DNA superhelicoidizado + Topo II), respectivamente.

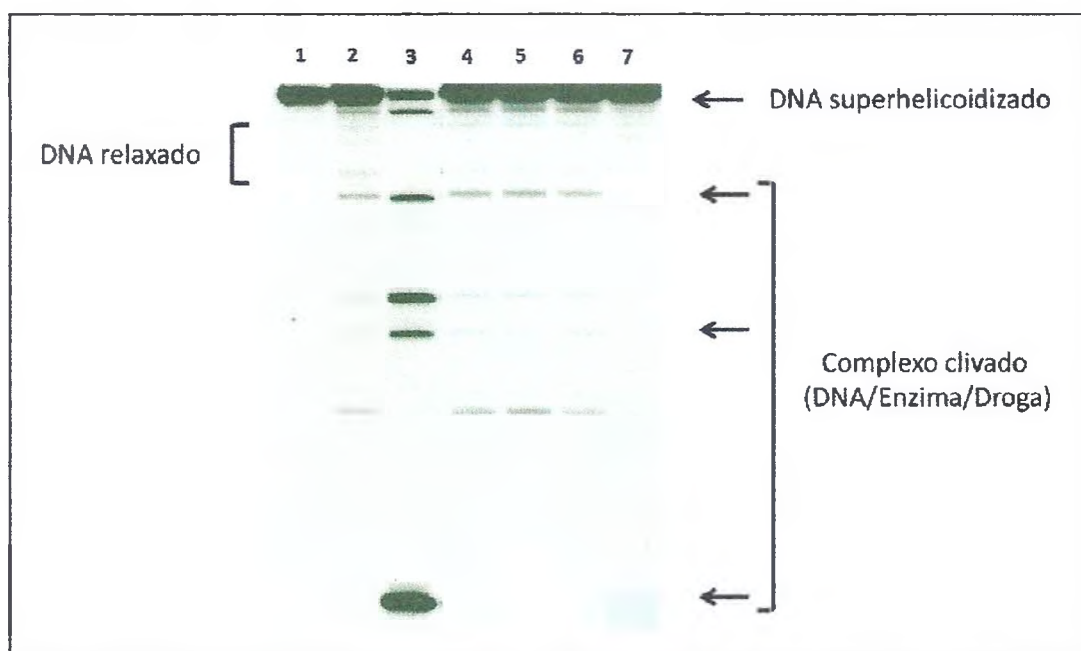


Figura 24 - Ação de tambjamina J sobre a enzima topoisomerase I no relaxamento de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG), por eletroforese horizontal em gel de agarose 1 %.

Linha 1, 250 ng de pRYG incubados somente na presença do solvente (DMSO 10 %) (branco); Linha 2, 250 ng de pRYG na presença do solvente (DMSO 10 %) e 4 U de Topoisomerase I (controle negativo); Linha 3, Camptotecina 1 μ M (controle positivo); Linha 4-7, 250 ng de pRYG com 4 U de Topoisomerase I na presença de 0,1; 1,0; 10 e 100 μ M de Tamb J, respectivamente. Revelação por brometo de etídio.

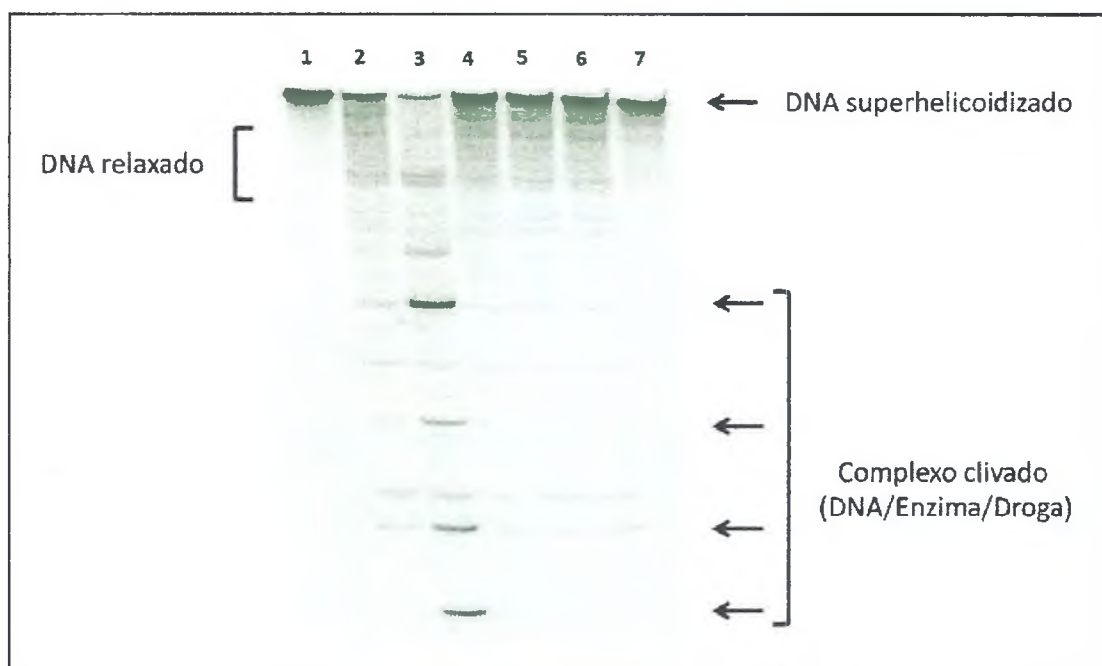


Figura 25 - Ação de tambjamina J sobre a enzima topoisomerase II no relaxamento de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG), por eletroforese horizontal em gel de agarose 1 %.

Linha 1, 250 ng de pRYG incubados somente na presença do solvente (DMSO 10 %) (branco); Linha 2, 250 ng de pRYG na presença do solvente (DMSO 10 %) e 4 U de Topoisomerase II (controle negativo); Linha 3, VP-16 100 μ M (controle positivo); Linha 4-7, 250 ng de pRYG com 4 U de Topoisomerase II na presença de 0,01; 0,1; 1,0 e 10 μ M de Tamb J, respectivamente. Revelação por brometo de etídio.

4.5 Avaliação da influência do receptor ErbB-2 sobre o efeito citotóxico, antiproliferativo, genotóxico e mutagênico

A avaliação da influência do receptor ErbB-2 sobre o efeito citotóxico, antiproliferativo, genotóxico e mutagênico dos alcalóides sintéticos tambjamina I e J foi realizada por meio dos testes do MTT, da Atividade Clonogênica, do Cometa e do Micronúcleo, respectivamente.

No teste do MTT, os resultados demonstram que após 24 h de exposição a associação tambjamina/trastuzumabe foi mais ativa que tambjamina isolada em todas as linhagens celulares utilizadas. O efeito citotóxico da associação tambjamina/trastuzumabe foi mais forte nas linhagens C3.6 e C5.2 que apresentam expressão mediana e alta de receptor ErbB-2, respectivamente. Tambjamina I, nessas linhagens e na presença de trastuzumabe, apresentou CI_{50} de $7,21 \pm 0,11 \mu\text{M}$ e $4,20 \pm 0,17 \mu\text{M}$. Já o composto Tamb J, nessas linhagens e também na presença de trastuzumabe, foi um pouco mais ativo com valores de CI_{50} de $3,86 \pm 0,75 \mu\text{M}$ e $2,15 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Após 72 h de incubação, observou-se efeito citotóxico semelhante ao encontrado no tempo de 24 h com discreto aumento de atividade. Tambjamina I, nas linhagens C3.6 e C5.2 e na presença de trastuzumabe, apresentou valores de CI_{50} de $2,71 \pm 0,55 \mu\text{M}$ e $1,57 \pm 0,11 \mu\text{M}$, respectivamente. Nessas linhagens e também na presença de trastuzumabe, Tamb J apresentou valores de CI_{50} de $1,98 \pm 0,33 \mu\text{M}$ e $1,16 \pm 0,01 \mu\text{M}$, respectivamente (**Tabela 11**).

No teste da atividade clonogênica, a análise dos resultados indica que a associação tambjamina/trastuzumabe foi capaz de inibir significativamente ($p < 0,05$) a formação de colônias em todas as concentrações testadas e em todas as linhagens celulares utilizadas. Em comparação com o tratamento sem trastuzumabe, observou-se efeito antiproliferativo mais evidente da referida associação, principalmente, nas linhagens que apresentam expressão mediana e alta de receptor ErbB-2 (C3.6 e C5.2, respectivamente). Nessas linhagens, Tamb I, na concentração de $5 \mu\text{M}$ associado com trastuzumabe, inibiu a formação de colônia em 51,00 % e 75,25 %, respectivamente. Na mesma condição experimental, Tamb J inibiu em 48,75 % e 74,75 %, respectivamente. Já na concentração de $10 \mu\text{M}$, as associações Tamb I/Trastuzumabe e Tamb J/Trastuzumabe inibiram a formação de colônia em 72,50 %/80,75 % e 67,25

%/84,75 %, respectivamente. Na concentração de 20 μM , as associações, obedecendo a mesma ordem, reduziram a proliferação em 84,50 %/93,00 % e 82,75 %/93,50 %, respectivamente (**Figura 26**).

Em relação ao teste do Cometa, foi observado que, após 24 h de incubação, trastuzumabe (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e tambjamins I e J isolados (5, 10 e 20 μM) não foram capazes de causar dano significativo ($p < 0,05$) no DNA de nenhuma linhagem celular utilizada. Entretanto, a associação tambjamina/trastuzumabe foi capaz de promover dano significativo no DNA principalmente nas linhagens C3.6 e C5.2 e nas concentrações de 10 e 20 μM . Na concentração de 10 μM , Tamb I/Trastuzumabe demonstrou índice de dano em C3.6 e C5.2 de $20,00 \pm 1,86$ e $18,33 \pm 2,14$, respectivamente. Nesta concentração, a associação Tamb J/Trastuzumabe apresentou índice de dano de $25,33 \pm 2,60$ e $31,00 \pm 1,03$, respectivamente. Já na concentração de 20 μM , mantendo a mesma ordem das linhagens, Tamb I/Trastuzumabe apresentou $20,00 \pm 1,41$ e $21,83 \pm 2,36$ como índices de dano, respectivamente. Por sua vez, Tamb J/Trastuzumabe demonstrou índices de dano de $36,83 \pm 2,72$ e $40,17 \pm 2,75$ em C3.6 e C5.2, respectivamente. Após 72 h de exposição, o resultado foi similar ao encontrado no tempo de 24 h. Porém, houve aumento do efeito, principalmente, nas linhagens C3.6 e C5.2 tratadas com tambjamins associadas com trastuzumabe nas concentrações de 10 e 20 μM . Neste tempo de exposição e na concentração de 10 μM , Tamb I/Trastuzumabe promoveu dano no DNA de C3.6 e C5.2 de $42,17 \pm 3,61$ e $33,83 \pm 2,23$, respectivamente. Já a associação, Tamb J/Trastuzumabe induziu dano de $44,83 \pm 2,21$ e $49,83 \pm 3,34$, considerando a mesma ordem das linhagens. Já na concentração de 20 μM , a associação Tamb I/Trastuzumabe apresentou valores de $64,17 \pm 4,30$ e $57,17 \pm 2,02$ de indução de dano para C3.6 e C5.2, respectivamente. Tamb J/Trastuzumabe, por sua vez, demonstrou indução de dano de $69,50 \pm 3,02$ e $73,83 \pm 2,30$, respectivamente (**Figura 27 e 28**).

Por fim, a análise do resultado do teste do Micronúcleo revelou que trastuzumabe e tambjamins isolados não foram capazes de induzir formação significativa ($p < 0,05$) de micronúcleo (MN) quando comparados com o controle negativo. Porém, a associação tambjamina (10 μM)/trastuzumabe (50 $\mu\text{g/mL}$)

promoveu dano cromossômico significativo nas linhagens C3.6 e C5.2. A associação com Tamb I, nessas linhagens, induziu formação de MN de $16,75 \pm 2,32$ e $27,75 \pm 3,40$, respectivamente. Já a associação com Tamb J apresentou efeito mais forte com valores de indução de MN de $38,50 \pm 2,27$ e $47,25 \pm 2,32$, respectivamente. O controle positivo doxorrubicina ($0,3 \mu\text{g/mL}$) induziu significativa formação de MN em todas as linhagens celulares utilizadas com valores de $62,00 \pm 3,81$; $56,75 \pm 1,75$ e $59,50 \pm 4,87$ para HBA4, C3.6 e C5.2, respectivamente (Figura 29).

Tabela 11 - Atividade citotóxica de tambjamina I e J, na ausência e presença de trastuzumabe, em linhagens celulares humanas que expressam o receptor ErbB-2 em níveis diferentes pelo teste do MTT, após 24 h e 72 h de incubação.

Tambjamins	Trastuzumabe (50 $\mu\text{g/mL}$)	Linhagens celulares ($CI_{50} \pm \text{E.P.M.}; \mu\text{M}$)			
		HBA4	C3.6	C5.2	
MTT 24 h	I	-	$19,47 \pm 1,75$	$12,50 \pm 0,21$	$10,39 \pm 0,22$
		+	$13,52 \pm 0,10$	$7,21 \pm 0,11$	$4,20 \pm 0,17$
	J	-	$8,98 \pm 0,55$	$5,21 \pm 0,10$	$4,17 \pm 0,33$
		+	$6,46 \pm 0,33$	$3,86 \pm 0,75$	$2,15 \pm 0,01$
MTT 72 h	I	-	$9,79 \pm 0,53$	$4,94 \pm 0,39$	$4,51 \pm 0,25$
		+	$5,42 \pm 1,10$	$2,71 \pm 0,55$	$1,57 \pm 0,11$
	J	-	$5,51 \pm 0,35$	$3,70 \pm 0,36$	$2,76 \pm 0,10$
		+	$7,49 \pm 2,45$	$1,98 \pm 0,33$	$1,16 \pm 0,01$

A tabela apresenta os valores de CI_{50} (concentração capaz de inibir 50 % do crescimento celular) em μM e o erro padrão da média (E.P.M.) obtidos de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo teste do MTT. HBA4, baixa expressão; C3.6, expressão moderada; e C5.2, alta expressão de ErbB-2.

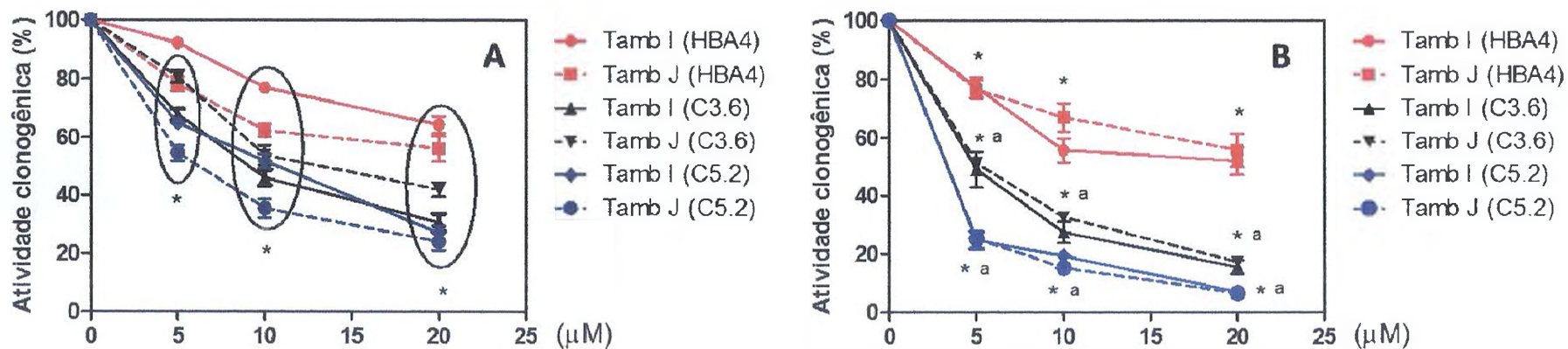


Figura 26 - Efeito de tambjarnina I e J na ausência (A) e presença (B) de trastuzumabe (50 µg/mL) sobre a atividade clonogênica de linhagens celulares humanas que expressam o receptor ErbB-2 em níveis diferentes, após 5 h de incubação.

O gráfico apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. do percentual de atividade clonogênica relativo ao controle negativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. HBA4, baixa expressão; C3.6, expressão moderada; e C5.2, alta expressão de ErbB-2. *, p<0,05 quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. ^a, p<0,05 quando comparado com o tratamento de HBA4 na respectiva concentração por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

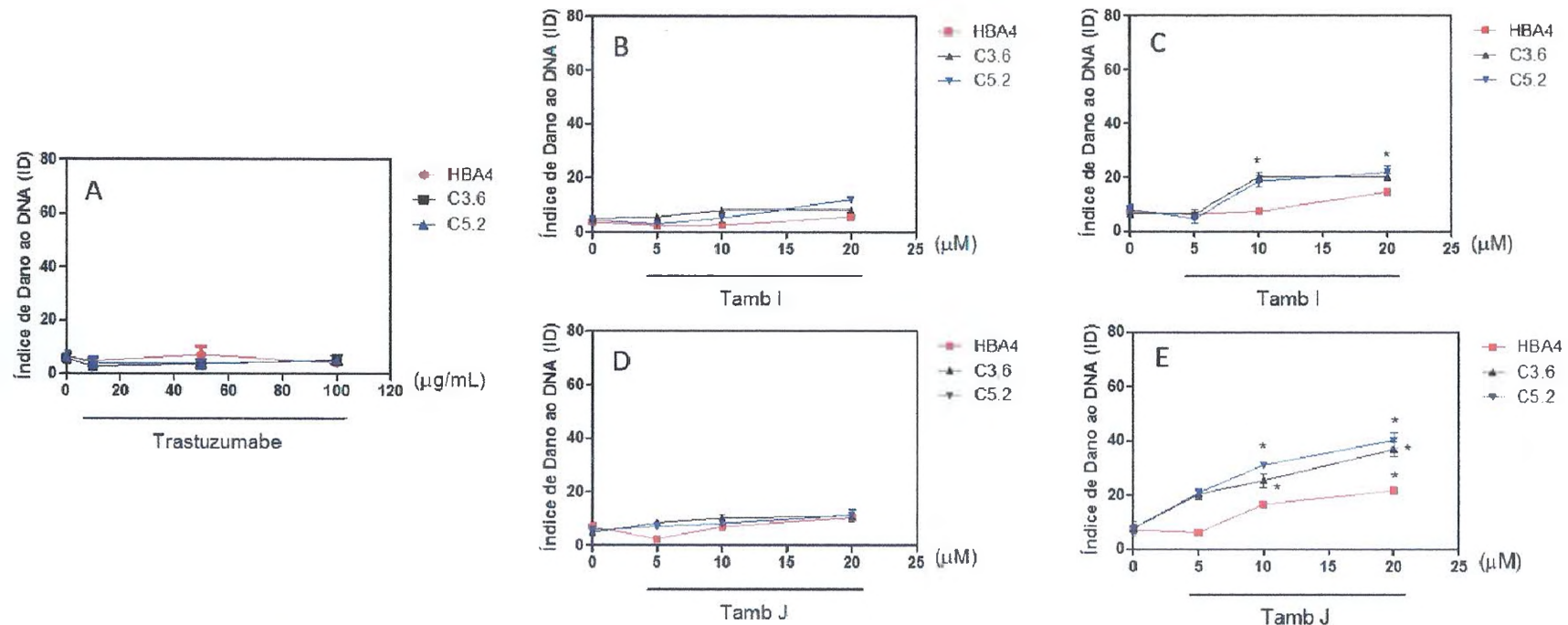


Figura 27 - Efeito de tambjamina I e J, na presença e ausência de trastuzumabe (50 µg/mL), sobre o DNA de linhagens celulares humanas que expressam o receptor ErbB-2 em níveis diferentes, após 24 h de incubação.

HBA4, baixa expressão; C3.6, expressão moderada; e C5.2, alta expressão de ErbB-2. Gráfico A: tratamento com trastuzumabe (10, 50 e 100 µg/mL); Gráfico B: tratamento com Tamb I (5, 10 e 25 µM); Gráfico C: tratamento com Tamb I (5, 10 e 25 µM) na presença de trastuzumabe (50 µg/mL); Gráfico D: tratamento com Tamb J (5, 10 e 25 µM); Gráfico E: tratamento com Tamb J (5, 10 e 25 µM) na presença de trastuzumabe (50 µg/mL). Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. do índice de dano no DNA de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

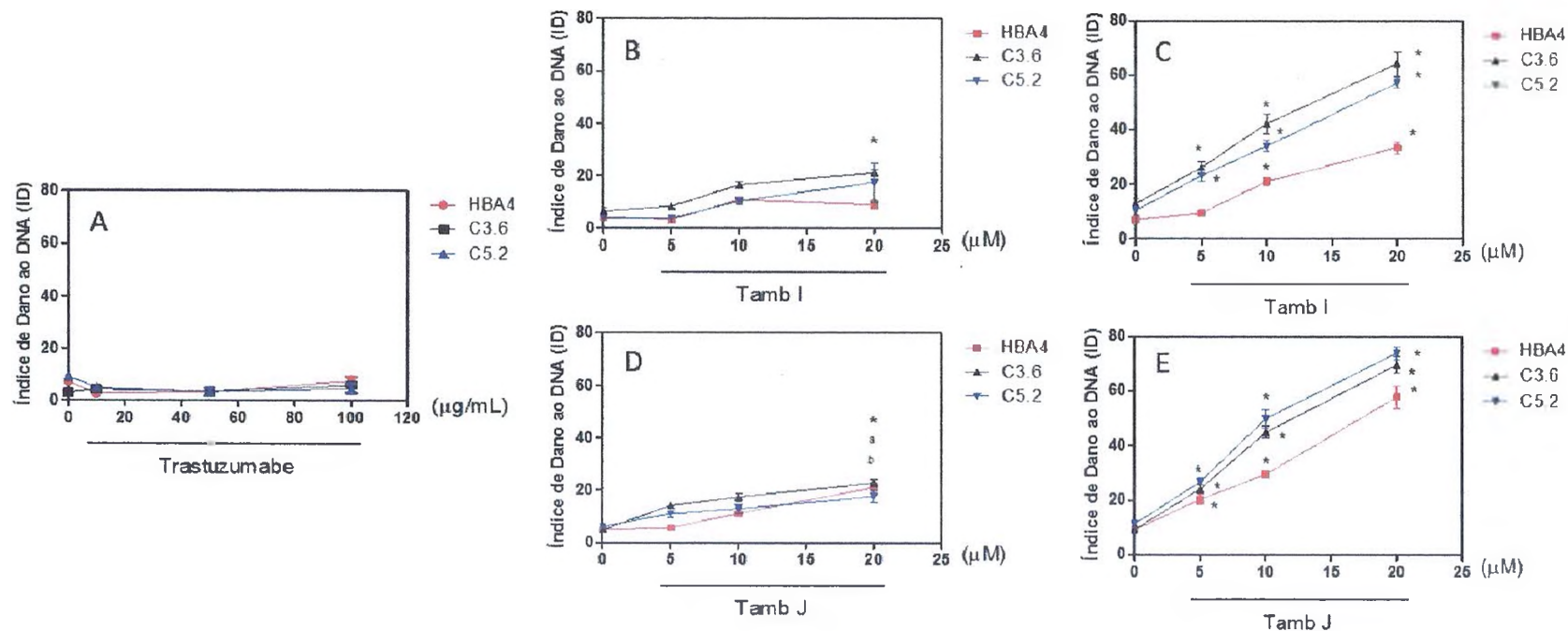


Figura 28 - Efeito de tambjamina I e J, na ausência e presença de trastuzumabe (50 µg/mL), sobre o DNA de linhagens celulares humanas que expressam o receptor ErbB-2 em níveis diferentes, após 72 h de incubação.

HBA4, baixa expressão; C3.6, expressão moderada; e C5.2, alta expressão de ErbB-2. Gráfico A: tratamento com trastuzumabe (10, 50 e 100 µg/mL); Gráfico B: tratamento com Tamb I (5, 10 e 25 µM); Gráfico C: tratamento com Tamb I (5, 10 e 25 µM) na presença de trastuzumabe (50 µg/mL); Gráfico D: tratamento com Tamb J (5, 10 e 25 µM); Gráfico E: tratamento com DNA Tamb J (5, 10 e 25 µM) na presença de trastuzumabe (50 µg/mL). Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. do índice de dano no DNA de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

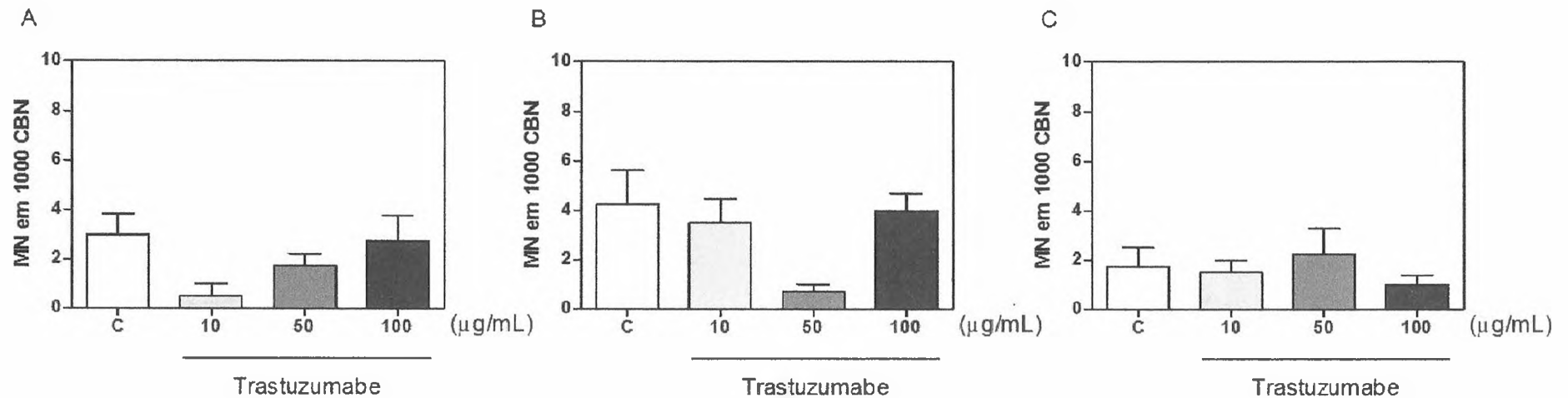


Figura 29 - Efeito do anticorpo monoclonal trastuzumabe (10, 50 e 100 µg/mL) sobre a indução de formação de micronúcleos (MN) em linhagens celulares humanas que expressam o receptor ErbB-2 em níveis diferentes, após 24 h de incubação.

O controle negativo está representado por C. Gráfico A: HBA4, baixa expressão; Gráfico B: C3.6, expressão moderada; e Gráfico C: C5.2, alta expressão de ErbB-2. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. do número de MNs em 1000 células binucleadas de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

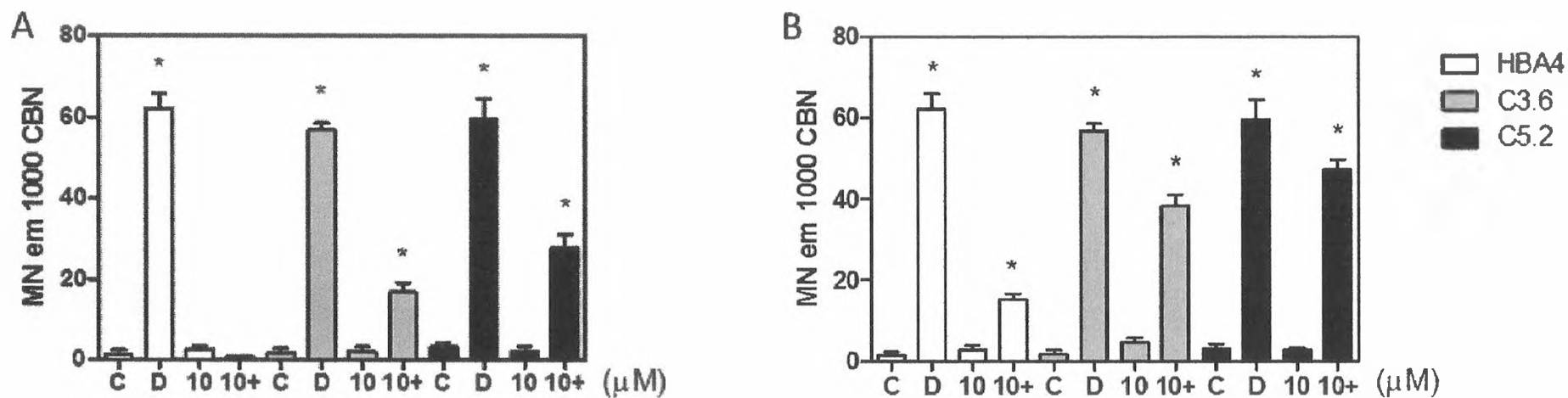


Figura 30 - Efeito de tamoxifina I (Gráfico A) e J (Gráfico B), na ausência (10) e presença (10+) de trastuzumabe (50 $\mu\text{g/mL}$) sobre a indução de formação de micronúcleos (MN) em linhagens celulares humanas que expressam o receptor ErbB-2 em níveis diferentes, após 24 h de incubação.

O controle negativo e o controle positivo doxorrubicina estão representados por C e D, respectivamente. Gráfico A: HBA4, baixa expressão; Gráfico B: C3.6, expressão moderada; e Gráfico C: C5.2, alta expressão de ErbB-2. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média \pm E.P.M. do número de MNs em 1000 células binucleadas de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

4.6 Identificação do efeito antitumoral e da toxicidade *in vivo*

O efeito antitumoral e a toxicidade *in vivo* do alcalóide sintético tambjamina J foram identificadas em camundongos transplantados com células do tumor Sarcoma-180 após 7 dias de tratamento.

Os resultados indicam que tambjamina J foi capaz de inibir de modo significativo ($p < 0,05$) o crescimento tumoral nas doses testadas. Em comparação com o grupo controle negativo, as doses de 10 e 20 mg/kg/dia inibiram o crescimento tumoral em 39,87 % e 78,82 %, respectivamente. Similar à dose de 20 mg/kg/dia de tambjamina J, o controle positivo ciclofosfamida (20 mg/kg/dia) também inibiu significativamente o crescimento tumoral com valor de inibição de 82,87 % (**Tabela 12**).

O peso relativo úmido dos órgãos dos animais submetidos ao protocolo de avaliação do efeito antitumoral revelou que tambjamina J promoveu redução significativa ($p < 0,05$) apenas do baço na dose de 20 mg/kg/dia. O controle positivo ciclofosfamida (20 mg/kg/dia) foi capaz de reduzir de modo significativo o baço ($0,26 \pm 0,02$) e o rim ($1,74 \pm 0,09$) quando comparado com o grupo controle negativo. Em comparação com o grupo de animais saudáveis, não houve alteração significativa no peso relativo úmido dos órgãos analisados em nenhum composto e dose testados (**Tabela 12**).

Em relação ao ganho de peso, tambjamina J e ciclofosfamida, ambas na dose de 20 mg/kg/dia, promoveram redução significativa ($p < 0,05$) no ganho de peso dos animais quando comparados ao grupo controle negativo ($8,33 \pm 1,05$ g). Os valores encontrados foram $3,57 \pm 1,43$ g e $1,67 \pm 1,05$ g, respectivamente. Entretanto, na dose de 10 mg/kg/dia, Tamb J não afetou significativamente o ganho de peso corpóreo ($5,00 \pm 1,29$ g) (**Tabela 12**). Durante o tratamento, observou-se que Tamb J, após as administrações, promoveu piloereção e letárgia (sinais de dor); diarreia e entumescimento do abdome.

A análise dos parâmetros bioquímicos demonstrou, por sua vez, que não houve alteração significativa ($p < 0,05$) desses parâmetros em nenhum composto e dose testados, quando comparado ao grupo controle negativo e de animais saudáveis (**Tabela 13**).

Em se tratando da análise dos parâmetros hematológicos, nenhum composto nas doses testadas promoveu alteração significativa dos elementos avaliados em relação ao grupo controle negativo. Por outro lado, em comparação com o grupo dos animais saudáveis, tambjamina J promoveu, nas doses testadas (10 e 20 mg/kg/dia), redução significativa ($p < 0,05$) de hemoglobina ($10,18 \pm 0,44$ e $11,32 \pm 0,93$ g/dL), aumento de RDW ($16,05 \pm 1,25$ % e $16,13 \pm 1,25$ %), aumento de leucócitos segmentados ($39,83 \pm 3,51$ % e $46,00 \pm 2,94$ %), redução de linfócitos ($59,83 \pm 3,67$ % e $52,50 \pm 2,67$ %) e aumento de monócitos ($1,17 \pm 0,48$ %, apenas na dose de 20 mg/kg/dia). O controle positivo ciclofosfamida (20 mg/kg/dia) também promoveu redução de hemoglobina ($11,33 \pm 0,25$ g/dL), aumento de RDW ($14,80 \pm 0,48$ %), aumento de leucócitos segmentados ($36,00 \pm 3,17$ %) e redução de linfócitos ($63,29 \pm 3,01$ %) (**Tabela 14**).

No teste do cometa alcalino em células mononucleares de sangue periférico dos animais, apenas ciclofosfamida e Tamb J, na dose de 20 mg/kg/dia, foram capazes de promover dano ao DNA. Os valores de índice de Dano encontrados foram $52,50 \pm 6,30$ e $23,67 \pm 2,78$, respectivamente. Tambjamina J, na dose de 10 mg/kg/dia, não promoveu dano significativo ao DNA das células analisadas ($5,67 \pm 1,33$) quando comparado com o controle negativo ($7,50 \pm 0,92$) (**Figura 31**).

Semelhantemente, alterações cromossômicas na forma de micronúcleo (MN) foram detectadas em eritrócitos isolados da medula óssea de camundongos tratados com ciclofosfamida e Tamb J na dose de 20 mg/kg/dia. Os valores encontrados foram $24,83 \pm 2,86$ e $6,83 \pm 1,14$, respectivamente. Por sua vez, tambjamina J, na dose de 10 mg/kg/dia, não promoveu alterações cromossômicas significativas ($0,50 \pm 0,34$) em eritrócitos na forma de MN quando comparado com o controle negativo ($1,00 \pm 0,45$) (**Figura 31**).

A análise histológica dos órgãos do grupo controle negativo demonstra sinais de baixa toxicidade: fígado com arquitetura bem preservada, regiões centrolobulares e espaços-porta bem definidos, leve degeneração hidrópica dos hepatócitos (aumento do tamanho de volume e palidez citoplasmática) e pequenos infiltrados linfoplasmocitários irregularmente distribuídos (**Figuras 32**); rins com arquitetura preservada, estrutura glomerular e tubular bem preservados e discreta tumefação turva irregularmente distribuída por alguns

túbulos (**Figura 33**); baço com arquitetura geral preservada, sinais de hiperplasia de polpa branca, moderada hematopoese extramedular (evidência de elementos celulares das linhagens mielóide e eritróide) e hemossiderose em múltiplas áreas do órgão (**Figura 34**). De modo semelhante, os órgãos analisados do grupo saudável e do grupo controle positivo (ciclofosfamida 20 mg/kg/dia) também revelaram sinais de baixa toxicidade (**Figura 32-35**).

A histologia do fígado dos animais tratados com Tamb J revela que o composto nas doses testadas (10 e 20 mg/kg/dia) não foi capaz de alterar significativamente o órgão quando comparado com o controle negativo (**Figura 32**).

A microscopia dos rins dos animais tratados com Tamb J, por sua vez, também revela que o composto nas doses testadas (10 e 20 mg/kg/dia) não foi capaz de alterar significativamente o órgão quando comparado com o controle negativo (**Figura 33**).

O baço dos animais tratados com Tamb J na dose de 10 mg/kg/dia não foi alterado significativamente quando comparado com os animais do grupo controle negativo. Já na dose de 20 mg/kg/dia de Tamb J observou-se depleção linfocitária evidenciada pela rarefação de células linfóides nas polpas vermelha e branca, com corpúsculos de Malpighi mal definidos (**Figura 34**).

Por fim, os tumores dos animais do grupo controle negativo (**Figura 35**) e dos grupos tratados com Tamb J 10 e 20 mg/kg/dia (**Figura 35**) apresentaram características de processo neoplásico maligno pouco diferenciado com células pleomórficas (poligonais, redondas e disformes), pouco coesas, com citoplasma eosinofílico, por vezes, mostrando pequenos vacúolos, com núcleos de contornos irregulares, cromatina distribuída de forma bizarra pelo núcleo formando áreas grosseiras, além de núcleolos evidentes e múltiplos. Aumento da relação núcleo/citoplasma, células binucleadas e células tumorais gigantes também foram observadas. Entrecortando esses tipos celulares havia faixas extensas de necrose margeadas por células em processo de morte por apoptose que foram ficando mais intensas com o tratamento. Infiltrado inflamatório agudo, hemorragia, hemossiderose e invasão muscular também foram detectados.

Tabela 12 - Atividade antitumoral de tambjamina J (**Tamb J**) e seus efeitos sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos Swiss machos transplantados com Sarcoma 180 e tratados via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos.

Grupo	Dose (mg/kg/dia)	Ganho de peso corpóreo (g)	Fígado	Baço	Rim	Tumor (g)	Inibição tumoral (%)
			Peso relativo (g/100 g)				
Controle negativo	-	8,33 ± 1,05	4,32 ± 0,23	0,39 ± 0,04	1,28 ± 0,05	3,21 ± 0,36	-
Ciclofosfamida	20	3,57 ± 1,43*	4,69 ± 0,32	0,26 ± 0,02*	1,74 ± 0,09*	0,55 ± 0,17*	82,87
Tambjamina J	10	5,00 ± 1,29	5,19 ± 0,19	0,81 ± 0,06	1,57 ± 0,05	1,93 ± 0,34*	39,87
	20	1,67 ± 1,05*	4,20 ± 0,22	0,27 ± 0,04*	1,42 ± 0,07	0,68 ± 0,25*	78,82
Saudáveis	-	3,75 ± 1,25*	4,54 ± 0,10	0,31 ± 0,04	1,64 ± 0,04	-	-

Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n=10 animais/grupo). O controle negativo recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 10 %). O quimioterápico ciclofosfamida (20 mg/kg/dia) foi usado como controle positivo.

* p<0,05 comparado com o grupo controle negativo e analisado por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls.

^a p<0,05 comparado com o grupo de animais saudáveis e analisado por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls.

Tabela 13 – Perfil bioquímico plasmático do sangue periférico de camundongos Swiss machos adultos tratados com tambjamina J via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos.

Parâmetros bioquímicos	Controle negativo	Ciclofosfamida (20 mg/kg/dia)	Tambjamina J		Saudáveis
			10 mg/kg/dia	20 mg/kg/dia	
AST (U/L)	76,83 ± 5,62	55,86 ± 2,61	116,5 ± 13,27	115,5 ± 7,36	78,20 ± 5,16
ALT (U/L)	25,50 ± 1,89	21,29 ± 1,11	27,17 ± 1,45	20,50 ± 2,04	35,60 ± 1,91
Uréia (mg/dL)	26,50 ± 2,19	39,00 ± 1,09	27,50 ± 1,91	43,33 ± 5,67	36,60 ± 3,53
Creatinina (mg/dL)	0,25 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,32 ± 0,02

Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n=10 animais/grupo). O controle negativo recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 10 %). O quimioterápico ciclofosfamida (20 mg/kg/dia) foi usado como controle positivo.

* p<0,05 comparado com o grupo controle negativo e analisado por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls.

^a p<0,05 comparado com o grupo de animais saudáveis e analisado por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls.

AST, aspartato aminotransferase, também conhecida como TGO, transaminase glutâmico-oxaloacética; ALT, alanina aminotransferase, também conhecida como TGP, transaminase glutâmico-pirúvica.

Tabela 14 - Perfil hematológico do sangue periférico de camundongos albinos Swiss machos adultos tratados com tambjamina J via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos.

Parâmetros hematológicos	Controle negativo	Ciclofosfamida (20 mg/kg/dia)	Tambjamina J		Saudáveis
			10 mg/kg/dia	20 mg/kg/dia	
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	6,82 ± 0,18	6,91 ± 0,14	6,67 ± 0,20	7,28 ± 0,50	8,11 ± 0,27
Hemoglobina (g/dL)	11,13 ± 0,43 ^a	11,33 ± 0,25 ^a	10,18 ± 0,44 ^a	11,32 ± 0,93 ^a	13,60 ± 0,25
Hematócrito (%)	37,70 ± 1,65	37,89 ± 0,90	37,90 ± 0,70	38,38 ± 3,15	44,52 ± 0,87
RDW (%)	14,52 ± 0,54 ^a	14,80 ± 0,48 ^a	16,05 ± 1,25 ^a	16,13 ± 0,78 ^a	11,44 ± 0,32
VCM (fL)	55,20 ± 1,01	54,84 ± 0,75	57,67 ± 2,26	52,58 ± 1,06	55,02 ± 1,11
HCM (pg)	16,32 ± 0,28	16,40 ± 0,21	16,50 ± 0,40	15,48 ± 0,29	16,80 ± 0,35
CHCM (g/dL)	29,57 ± 0,26	29,90 ± 0,10	29,47 ± 0,20	29,48 ± 0,16	30,62 ± 0,17
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	1496 ± 127,1	1522 ± 134,9	1362 ± 74,58	1414 ± 121,6	1316 ± 89,18
Leucócitos totais (x 10 ³ /μL)	3,17 ± 0,23	1,69 ± 0,13	2,43 ± 0,22	3,03 ± 1,09	3,20 ± 0,23
Segmentados (%)	41,33 ± 1,61 ^a	36,00 ± 3,17 ^a	39,83 ± 3,51 ^a	46,00 ± 2,94 ^a	19,00 ± 1,38
Linfócitos (%)	57,83 ± 1,68 ^a	63,29 ± 3,01 ^a	59,83 ± 3,67 ^a	52,50 ± 2,67 ^a	80,80 ± 1,32
Monócitos (%)	0,17 ± 0,17	0,29 ± 0,18	0,17 ± 0,17	1,17 ± 0,48 ^a	0,00 ± 0,00
Eosinófilos (%)	0,67 ± 0,33	0,43 ± 0,20	0,17 ± 0,17	0,33 ± 0,21	0,20 ± 0,20

Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n=10 animais/grupo). O controle negativo recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 10 %). O quimioterápico ciclofosfamida (20 mg/kg/dia) foi usado como controle positivo.

* p<0,05 comparado com o grupo controle negativo e analisado por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls.

^a p<0,05 comparado com o grupo de animais saudáveis e analisado por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls.

VCM, Volume Corpuscular Médio; HCM, Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM, Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW, variação da distribuição do tamanho eritrocitário (*Red cell Distribution Width*).

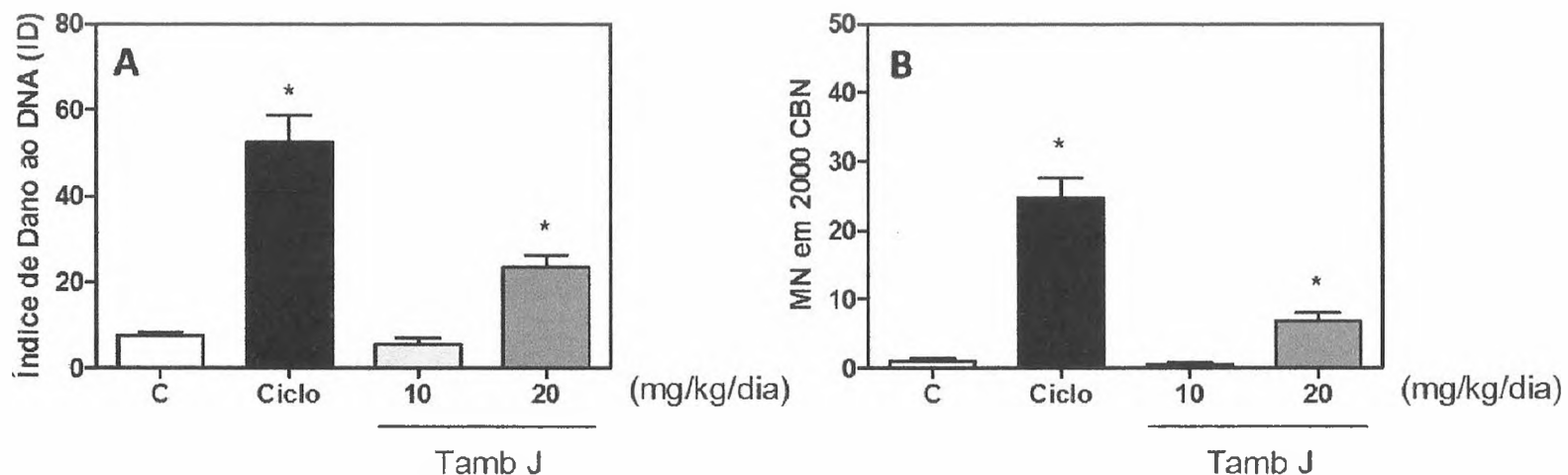


Figura 31 - Efeito genotóxico e mutagênico de tambjamina J (**Tamb J**) em camundongos Swiss machos transplantados com Sarcoma 180 e tratados via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos.

O controle negativo e o controle positivo ciclofosfamida (20 mg/kg/dia) estão representados por C e Ciclo, respectivamente. O gráfico (A) apresenta os valores correspondentes à média \pm E.P.M. do índice de dano ao DNA em células mononucleares de sangue periférico dos animais, determinado pelo ensaio cometa alcalino. O gráfico (B) apresenta os valores correspondentes à média \pm E.P.M. do número de micronúcleos (MN) na medula óssea dos animais, determinado pelo ensaio do micronúcleo. *, $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

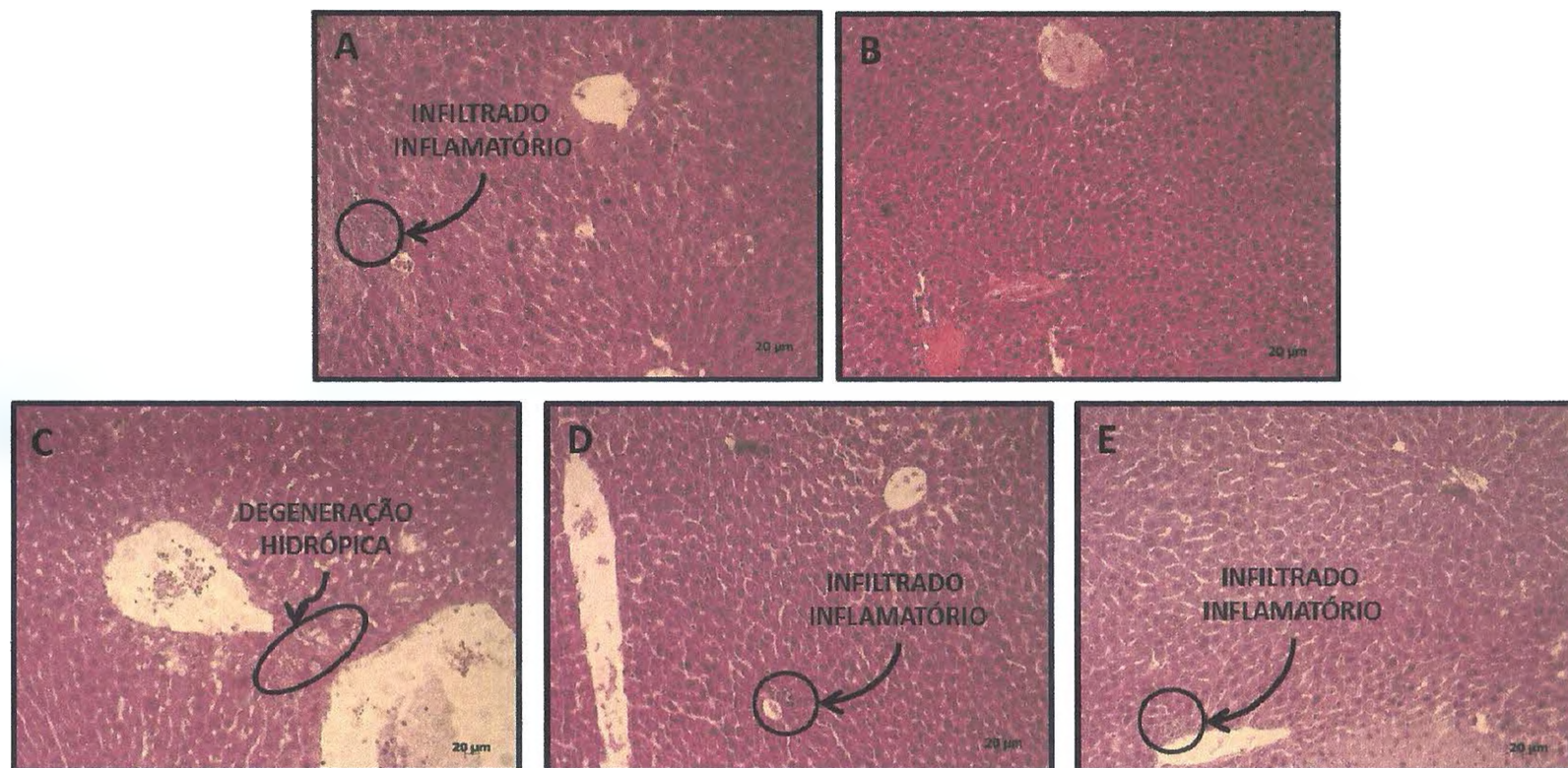


Figura 32 - Análise histológica do fígado de camundongos Swiss machos adultos transplantados com Sarcoma 180 e tratados via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia, painél D e E) durante 7 dias consecutivos com tambjamina J (**Tamb J**).

O controle negativo recebeu o veículo de diluição dos compostos (DMSO 10 %, painél A). O grupo dos animais saudáveis e o grupo controle positivo (ciclofosfamida 20 mg/kg/dia) estão representados pelos painéis B e C, respectivamente. Coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E). Microscopia óptica, 100x.

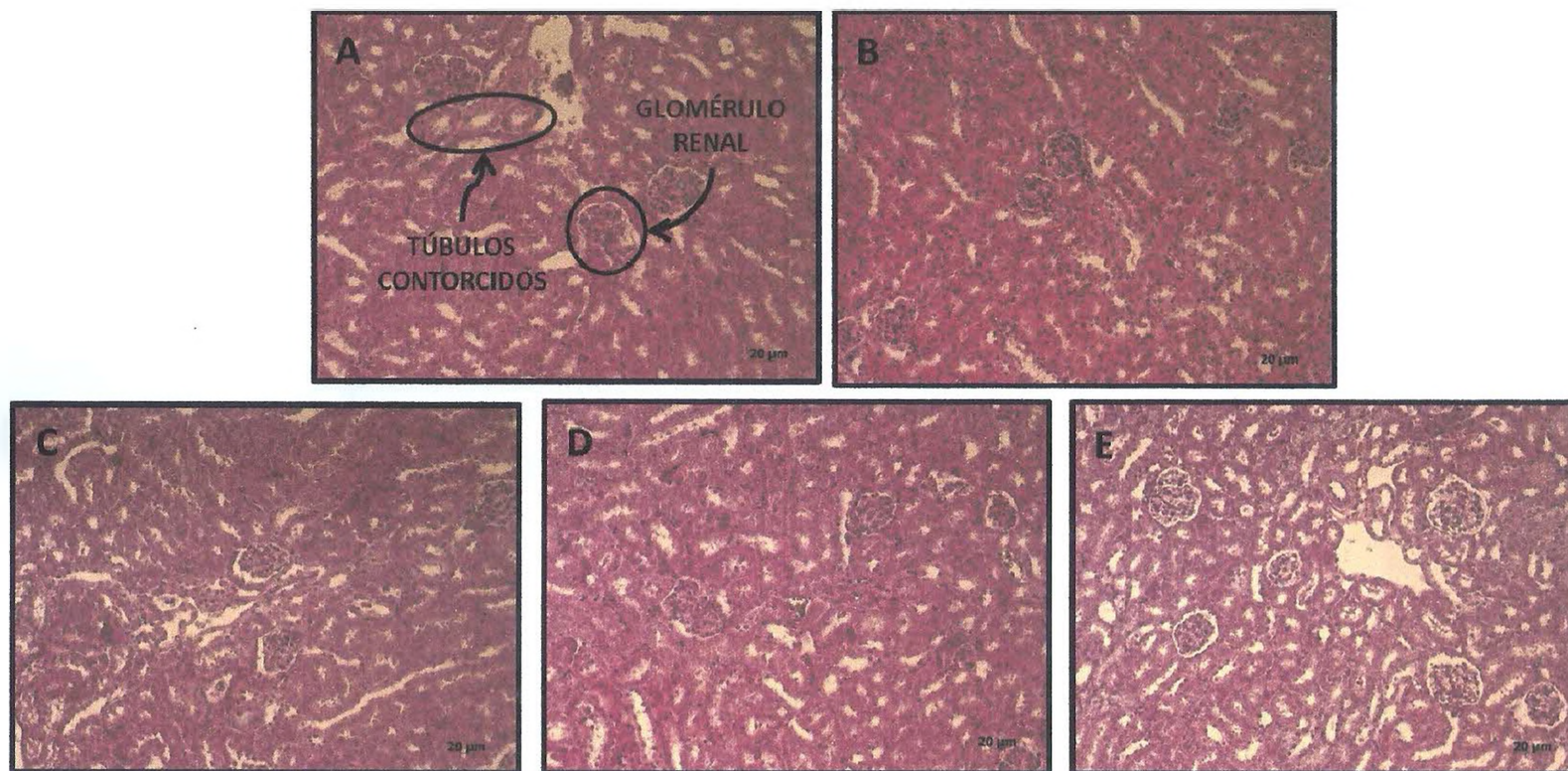


Figura 33 - Análise histológica dos rins de camundongos Swiss machos adultos transplantados com Sarcoma 180 e tratados via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia, painel D e E) durante 7 dias consecutivos com tambjamina J (**Tamb J**).

O controle negativo recebeu o veículo de diluição dos compostos (DMSO 10 %, painel A). O grupo dos animais saudáveis e o grupo controle positivo (ciclofosfamida 20 mg/kg/dia) estão representados pelos painéis B e C, respectivamente. Coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E). Microscopia óptica, 100x.

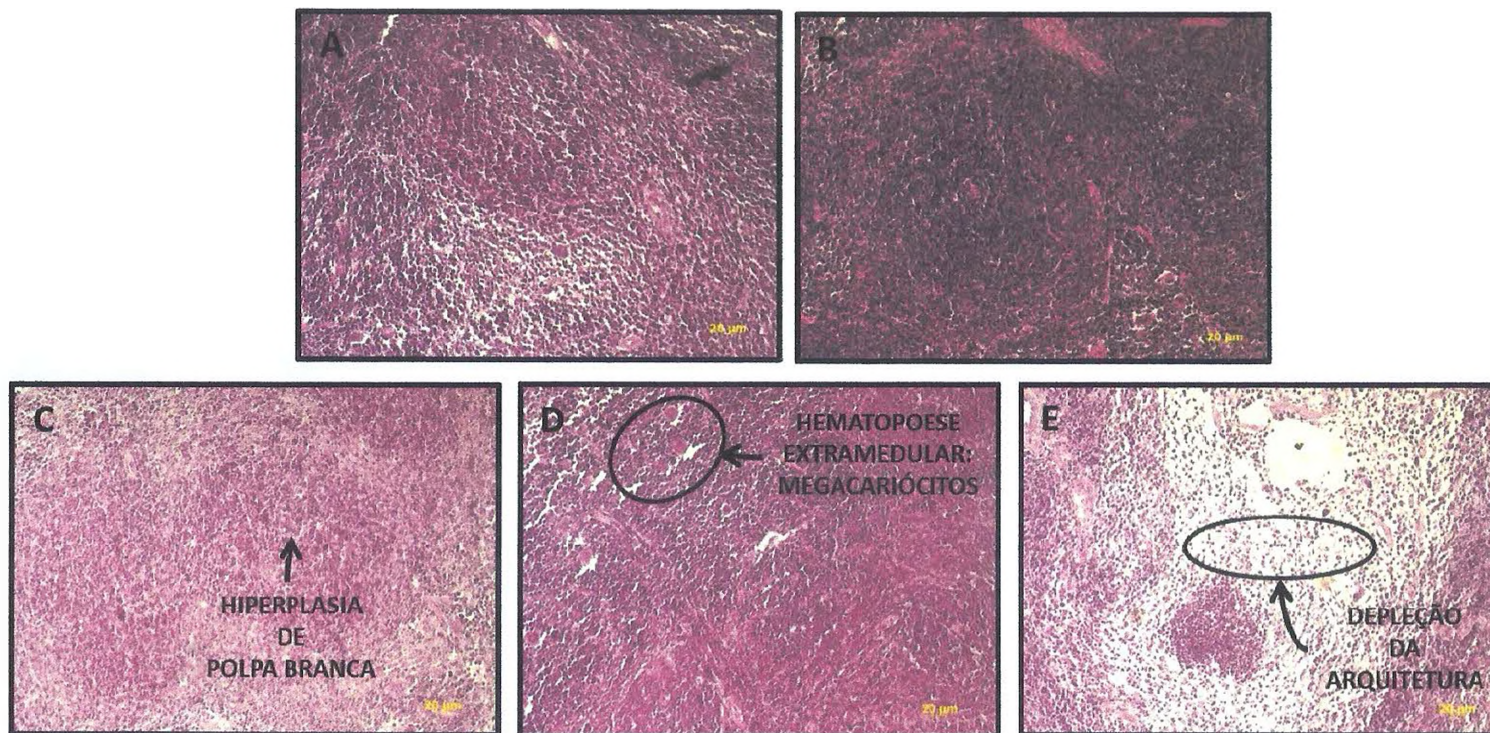


Figura 34 - Análise histológica do baço de camundongos Swiss machos adultos transplantados com Sarcoma 180 e tratados via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia, painel D e E) durante 7 dias consecutivos com tambjamina J (**Tamb J**).

O controle negativo recebeu o veículo de diluição dos compostos (DMSO 10 %, painel A). O grupo dos animais saudáveis e o grupo controle positivo (ciclofosfamida 20 mg/kg/dia) estão representados pelos painéis B e C, respectivamente. Coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E). Microscopia óptica, 100x.

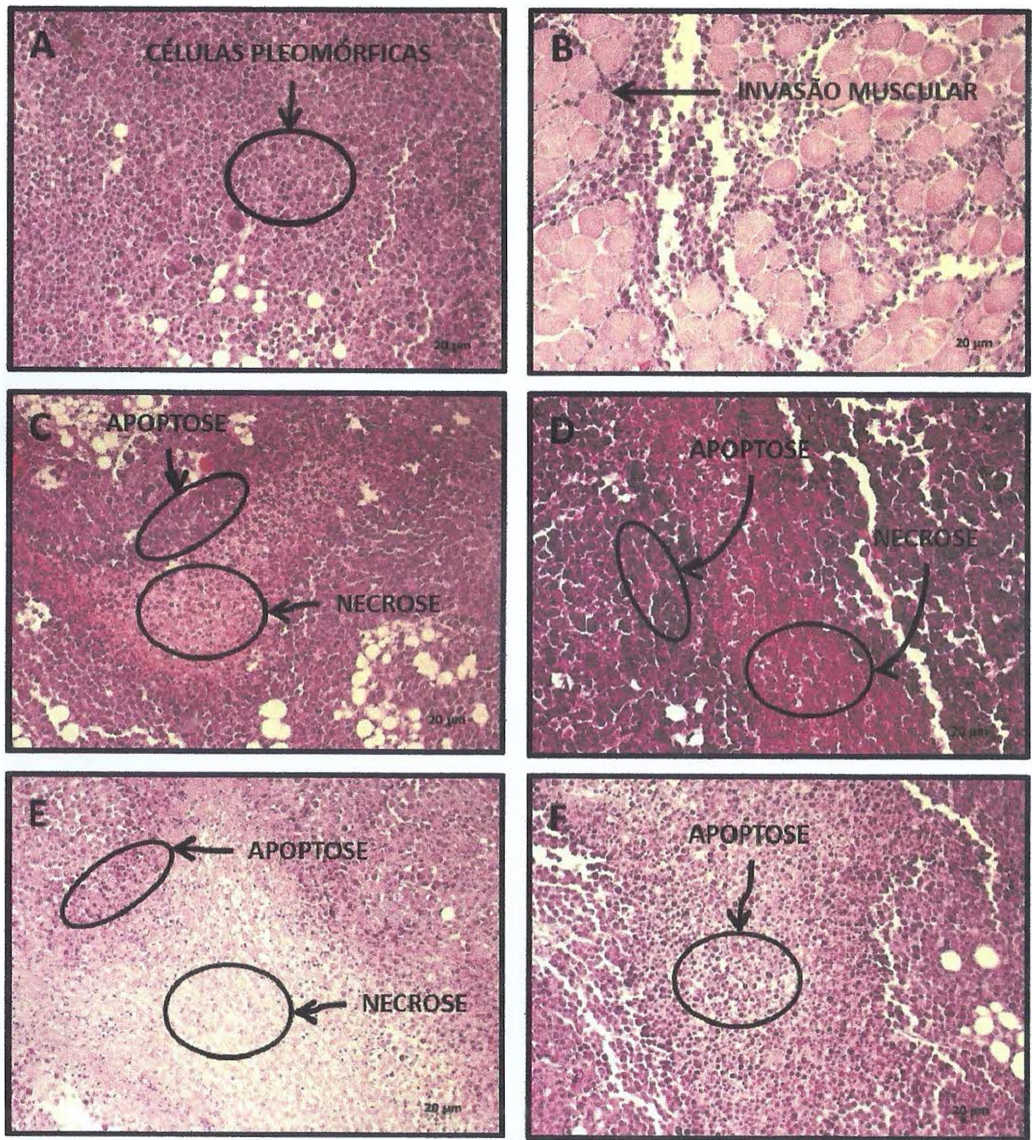


Figura 35 - Análise histológica do tumor Sarcoma 180 de camundongos Swiss machos adultos tratados via intraperitoneal (10 e 20 mg/kg/dia, painel E e F) durante 7 dias consecutivos com tambjamina J (Tamb J).

O controle negativo recebeu o veículo de diluição dos compostos (DMSO 10 %, painel A e B). O grupo dos animais saudáveis e o grupo controle positivo (ciclofosfamida 20 mg/kg/dia) estão representados pelos painéis C e D, respectivamente. Coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E). Microscopia óptica, 100x.

Discussão

5 Discussão

Os alcalóides naturais que apresentam o núcleo químico 4-metóxi-2,2'-bipirrol tem despertado crescente interesse dos pesquisadores em virtude de seu potencial biológico como antibacterianos, antifúngicos, antiprotzoários, imunossupressores e anticâncer. Oriundos principalmente de organismos marinhos, como briozoários, nudibrânquios e ascídias; e bactérias, como *Streptomyces* e *Serratia*, seus representantes incluem a classe prodigiosina e tambjamina (MELVIN *et al.*, 2001; FRANCISCO *et al.*, 2007; PINKERTON *et al.*, 2010).

As prodigiosinas são um grupo de pigmentos vermelhos polipirrólicos que incluem a prodigiosina, a cicloprodigiosina, a metacicloprodigiosina, entre outros derivados. A prodigiosina, o principal representante da classe, foi isolada pela primeira vez em 1929 de *Serratia marcescens* e, ao longo dos anos, tem apresentado propriedades pró-apoptóticas e anticâncer pronunciadas. Nesse contexto, prodigiosina apresentou seletividade para alguns tipos de células cancerosas o que fortaleceu a sugestão de sua indicação para os casos de carcinoma hepatocelular (WREDE; ROTHASS, 1934; PÉREZ-TOMÁS *et al.*, 2003).

As tambjamins, por sua vez, são um grupo de alcalóides bipirrólicos isolados originalmente dos nudibrânquios *Tambja abdere* e *Tambja eliora*. Semelhante às prodigiosinas, as tambjamins também apresentam efeito citotóxico contra células de câncer humano, com possível mecanismo de ação relacionado com a capacidade de interagir diretamente com o DNA celular. Especula-se que a estrutura plana do núcleo bipirrólico destes compostos associada a sua natureza catiônica favorecem a ligação com a hélice do DNA por intercalação, bem como, a interação eletrostática com os seus grupos fosfatos (HEARN; MEDINA-CASTRO; ELSON, 1968; CARTE; FAULKNER, 1983; MELVIN *et al.*, 2001).

Sabendo do potencial farmacológico dos produtos naturais bipirrólicos citados acima, o presente trabalho tem como desafio fundamental contribuir com o desenvolvimento de novas drogas anticâncer a partir de alcalóides sintéticos tambjamins por meio de estratégias e ferramentas biológicas.

Neste sentido, avaliou-se, inicialmente, a citotoxicidade e a seletividade *in vitro* de sete alcalóides sintéticos pertencentes à classe tambjamina (Tambjamins C, E, F, G, H, I e J) por meio do teste do MTT. Nesse teste, foram utilizadas linhagens celulares tumorais (HL-60, HCT-8, SF-295 e MDAMB-435) e células normais (CMSPH) humanas como modelo.

A análise dos resultados de citotoxicidade em células tumorais humanas permitiu observar que, com exceção de tambjamina E, todos os alcalóides testados foram fortemente citotóxicos contra todas as linhagens tumorais utilizadas com valores de $CI_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$. Adicionalmente, tambjamina I e J foram os únicos compostos que demonstraram $CI_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ em todas as linhagens de câncer testadas.

De fato, os produtos naturais que apresentam o núcleo químico 4-metóxi-pirrólico, nos quais incluem-se as tambjamins, apresentam atividade citotóxica pronunciada contra vários tipos de câncer *in vitro* (MELVIN *et al.*, 2001). Corroborando com os dados de citotoxicidade apresentados acima, Granato *et al.* (2005) demonstraram a ação citotóxica de tambjamina D contra células tumorais humanas leucêmicas CEM ($CI_{50} = 1,22 \mu\text{g/mL}$) e HL-60 ($CI_{50} = 1,32 \mu\text{g/mL}$), de mama MCF-7 ($CI_{50} = 1,32 \mu\text{g/mL}$), de cólon HCT-8 ($CI_{50} = 1,01 \mu\text{g/mL}$) e de melanoma murinho B16 ($CI_{50} = 0,67 \mu\text{g/mL}$). Os dados são também corroborados pelos resultados obtidos com prodigiosina que mostrou ser mais ativo que o quimioterápico cisplatina contra linhagens celulares de neuroblastoma humano. Neste trabalho, prodigiosina apresentou valores de CI_{50} variando de 0,15 a 7 μM , após 24 h de incubação (FRANCISCO *et al.*, 2007).

Ao contrário do que foi observado com tambjamina E no presente estudo, Melvin *et al.* (1999) demonstraram que este composto é capaz de ligar-se ao DNA e facilitar a sua clivagem oxidativa na presença de Cobre (II). O referido autor aponta o DNA como alvo farmacológico fundamental para o entendimento das propriedades biológicas de tambjamine E, inclusive, a anticâncer.

A comparação estrutural das tambjamins testadas no ensaio do MTT revela que a presença do bromo no anel em R_1 e de um radical ramificado ou volumoso em R_2 são características importantes para o efeito citotóxico dos compostos. Além disso, alguns estudos tem demonstrado a contribuição

relevante dos anéis pirrólicos na ligação com o DNA, bem como, em sua atividade de nuclease. O nitrogênio heterocíclico e o grupamento enamina presentes na estrutura também são componentes fundamentais nas propriedades biológicas desse tipo de alcalóide natural (MELVIN *et al.*, 2001; MELVIN *et al.*, 2002a; MELVIN *et al.*, 2002b).

Um fator importante no desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer é que os mesmos sejam avaliados quanto a sua toxicidade em células normais humanas (células da pele, do trato gastrointestinal, plaquetas, glóbulos vermelhos e brancos) (ZUCO *et al.*, 2002; ANAZETTI *et al.*, 2003). Assim, a atividade citotóxica dos alcalóides sintéticos tambjamins foi avaliada em células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH) pelo teste do MTT. A análise do resultado permitiu identificar elevada citotoxicidade (CI_{50} variando de 0,77 a 4,16 $\mu\text{g/mL}$) dos compostos em CMSPH e, portanto, baixa seletividade (IS variando de 1,4 a 2,6) para células tumorais. Efeito semelhante também foi observado para o controle positivo doxorrubicina que é um quimioterápico usado na clínica. Sua CI_{50} (0,23 $\mu\text{g/mL}$) e IS (1,2) revelam elevada citotoxicidade frente a células normais, o que pode ser traduzido em inespecificidade *in vitro* em relação ao painel de células tumorais avaliadas. De fato, o uso terapêutico de doxorrubicina está associado a efeitos adversos significativos como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e mielossupressão (ALIMORADI *et al.*, 2012; BHINGE *et al.*, 2012; HENNINGER, *et al.*, 2012).

Além disso, os alcalóides sintéticos tambjamins aqui estudados não foram capazes de promover lise dos eritrócitos de sangue periférico de camundongos ($CE_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$) em pelo menos 2 h de exposição. Isto sugere que a atividade citotóxica dos compostos testados está, provavelmente, relacionada com um mecanismo de morte celular mais específico que simplesmente um dano direto à membrana plasmática (COSTA *et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2012).

Sabendo disso, e com o intuito de investigar o mecanismo de ação citotóxica desse grupo de moléculas, a continuidade do estudo do potencial anticâncer das amostras foi realizada a partir dos compostos tambjamina I e J (Tamb I e Tamb J, respectivamente) em linhagem tumoral HL-60 após 3, 6, 12 e 24 h de incubação. As concentrações testadas de Tamb I e J (0,3 e 0,6 $\mu\text{g/mL}$) foram determinadas com base nos resultados do teste do MTT, tendo a

preocupação de não utilizar concentrações muito tóxicas a fim de possibilitar a verificação do início do efeito citotóxico. É importante também registrar que a linhagem tumoral HL-60 foi escolhida como modelo biológico no estudo pela facilidade de cultivo, por ser bem descrita na literatura e por apresentar rápida multiplicação.

Desse modo, o efeito antiproliferativo de Tamb I e J foi determinado pelo teste do azul de tripan em células HL-60. Os resultados demonstram que os compostos testados apresentaram efeitos antiproliferativos semelhantes entre si, com discreto aumento do efeito para o composto Tamb J, principalmente, na maior concentração testada (0,6 µg/mL) e a partir de 12 h de exposição. Este resultado reforça o efeito dos compostos sobre a viabilidade celular observado no teste do MTT. Entretanto, células em estágios iniciais de apoptose apresentam seus sistemas de transporte de membrana ainda ativos, o que possibilita a exclusão do corante azul de tripan, sendo, então contabilizadas como células viáveis nesse teste (KRYSKO *et al.*, 2008).

Nesse aspecto, a fim de determinar o padrão de morte celular induzido por Tamb I e J, células HL-60 tratadas e não-tratadas com os compostos testes foram avaliadas por 2 métodos de coloração: may-grünwald-giemsa e brometo de etídeo/laranja de acridina.

Apesar de que muitos autores consideram a distinção entre apoptose e necrose difícil e controversa, algumas características podem ser avaliadas e consideradas na sugestão do tipo de morte celular (TINARI *et al.*, 2008). Integridade da membrana plasmática e nuclear, integridade do DNA, formação de corpos apoptóticos e volume celular são algumas dessas características que podem ser observadas pelos métodos de coloração citados acima (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1992; KEYHANI *et al.*, 2009).

De acordo com Kroemer *et al.*, (2005) e Ricci & Zong (2006), a apoptose corresponde a um mecanismo de morte celular bastante regulado caracterizado por redução do volume, manutenção da integridade da membrana plasmática, fragmentação nuclear e formação de *blebbs* (prolongamento celular). Externalização da fosfatidilserina, fragmentação do DNA, despolarização mitocondrial e ativação de caspases são outras características que podem ser apresentadas por células apoptóticas.

Diferentemente da apoptose, a morte por necrose não tem um mecanismo molecular bem esclarecido. A nível celular, a necrose é caracterizada pelo aumento do volume, ruptura da membrana plasmática, inchaço de algumas organelas citoplasmáticas e degradação maciça do DNA. A liberação de componentes celulares promove a indução de resposta imunológica com conseqüente crescimento celular e reparo tecidual (KROEMER *et al.*, 2005; RICCI; ZONG, 2006).

Com base nessas informações, a análise morfológica de células HL-60 tratadas com Tamb I e J por may-grünwald-giemsa permite verificar sinais consistentes de morte celular por apoptose principalmente na concentração de 0,6 µg/mL. As características encontradas foram redução do volume celular, formação de *blebbs*, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e alguns restos celulares.

Os resultados obtidos na coloração diferencial com brometo de etídeo/laranja de acridina demonstram aumento significativo de células com padrão apoptótico (redução do volume, corpos apoptóticos e fragmentação nuclear), os quais corroboram com os resultados encontrados na marcação com may-grünwald-giemsa. Nesse teste, vale ressaltar que os eventos apoptóticos foram se tornando mais evidentes com o aumento do tempo e da concentração dos compostos testados. Além disso, com exceção de Tamb J na concentração de 0,6 µg/mL e nos tempos de 6 e 12 h, não foi observado aumento significativo de células com padrão necrótico. Contudo, existem evidências de que os corpos apoptóticos, quando não fagocitado por macrófagos, evoluem para um estado necrótico, conhecido como necrose secundária, e são capazes de despertar uma resposta inflamatória. Dessa forma, é possível observar morte celular por necrose a partir de um processo apoptótico inicial (WYLLIE *et al.*, 1980; MAJNO; JORIS, 1995; VAN CRUCHTEN; VAN DEN BROECK, 2002).

Subsequentemente, alterações morfológicas e bioquímicas de células HL-60 foram investigadas por citometria de fluxo com o intuito de reforçar o estudo do tipo de morte celular que estaria relacionado com a citotoxicidade dos compostos testes. Para esse fim, a citometria de fluxo consiste em um sistema automatizado ligado ao computador que permite a observação de células individuais de uma suspensão celular. Assim, uma população de

células, previamente tratada com corantes específicos fluorogênicos, passa por um tubo capilar sobre o qual incide-se um laser e cuja resposta é percebida por detectores que transmitem a informação para o computador. Isto habilita o uso do citômetro de fluxo no diagnóstico de neoplasias e como uma ferramenta poderosa para a detecção e compreensão de alterações celulares causadas por compostos biologicamente ativos (SHAPIRO *et al.*, 1995; MARINHO-FILHO *et al.*, 2010).

Em relação aos aspectos morfológicos investigados por citometria de fluxo, os resultados indicam que Tamb I e J foram capazes de reduzir o tamanho e aumentar a granulosidade de células HL-60, principalmente na concentração de 0,6 µg/mL e após 24 h de exposição. Esses parâmetros foram utilizados na quantificação do número de células com padrão morfológico viável a qual demonstrou uma, também, redução do número de células viáveis. Os dados encontrados corroboram com a sugestão de morte celular por apoptose, uma vez que células em apoptose inicial apresentam redução do volume e aumento da granulosidade (BARROS *et al.*, 2011). Adicionalmente, a integridade da membrana, uma outra característica marcante da apoptose, de células HL-60 tratadas com Tamb I e J foi essencialmente preservada. A discreta redução significativa da integridade da membrana celular observada na maior concentração testada e no maior tempo de incubação pode ser indicativo de células em processo final de morte ou de necrose secundária, como observado nas análises microscópicas (ARAÚJO *et al.*, 2012).

Dos mecanismos conhecidos que conduzem a morte celular por apoptose, dois são bem estabelecidos: a via de sinalização intrínseca ou mitocondrial e a extrínseca. Ambos os processos contam com a participação imprescindível de proteases intracelulares conhecidas por caspases. Dentro da célula, as caspases encontram-se em sua forma inativa e precisam ser clivadas para realizar suas funções. Na cascata reacional da apoptose, existem as caspases iniciadores, que ativam outras caspases, e as efetoras, que executam as modificações estruturais observadas nesse padrão de morte celular. As caspases iniciadoras podem ser do tipo 8, 9 e 10 e as caspases 3, 6 e 7 são consideradas efetoras (NAGATA, 1997; THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; DANIAL; KORSMEYER, 2004; RICCI; ZONG, 2006).

A via intrínseca da apoptose pode ser ativada por um sinal de estresse intracelular que inclui dano ao DNA (por radiação ionizante ou quimioterápico), espécies reativas de oxigênio (EROs), infecção viral ou ativação de oncogenes. Após o estímulo, os monômeros protéicos Bax e Bak (membros da família Bcl-2) são oligomerizados e ligam-se a membrana externa mitocondrial promovendo a liberação de vários fatores apoptóticos. Dentre eles, o citocromo-c tem a capacidade de ligar-se ao fator ativador de caspase 1 (apaf-1) e ativar a caspase 9 por clivagem. A caspase 9 ativada, por sua vez, promove a clivagem das caspases 3 e 7, tornando-as também ativas, que rapidamente cliva os substratos intracelulares (VERHAGEN *et al.*, 2000; DU *et al.*, 2000; WEI *et al.*, 2001).

A via extrínseca da apoptose, por sua vez, é caracterizada pela ligação de agonistas ao domínio extracelular de receptores específicos da membrana plasmática, conhecidos como receptores de morte. Os agonistas envolvidos nesse processo são TNF- α , CD95-L e TRAIL. Quando os receptores de morte são ativados, a sua porção intracelular liga-se ao FADD (proteína que contém o domínio de morte celular associado ao Fas) e promove o recrutamento de caspase 8 e 10, as quais sofrem auto-clivagem e tornam-se ativas. Em células tipo I, essas caspases tem a capacidade de ativar as caspases efetoras por si. Entretanto, em células tipo II, a ativação das caspases efetoras é realizada a partir de uma comunicação cruzada com a via intrínseca, intermediada pela proteína BID. A proteína BID é clivada pelas caspases 8 e 10 e promove a liberação mitocondrial de fatores pró-apoptóticos, como visto no parágrafo anterior (CHINNAIYAN *et al.*, 1995; KISCHKEL *et al.*, 1995; SCAFFIDI *et al.*, 1998; LI *et al.*, 1998; LUO *et al.*, 1998; LOCKSLEY *et al.*, 2001; LEBLANC; ASHKENAZI, 2003; PETER; KRAMMER, 2003; WAJANT *et al.*, 2003; DONEPUDI *et al.*, 2003; BOATRRIGHT *et al.*, 2003).

Buscando entender a via de sinalização da apoptose envolvida no efeito citotóxico dos compostos Tamb I e J em células HL-60, foi utilizada a citometria de fluxo para determinar o potencial transmembrânico mitocondrial das células tratadas com os compostos testes. Os resultados encontrados demonstram que Tamb I e J não foram capazes de promover despolarização mitocondrial em nenhum dos tempos de incubação avaliados. Isto sugere que a apoptose

induzida pelos compostos parece não envolver a via intrínseca desse processo de morte celular.

Neste sentido, Ashkenazi (2008) tem demonstrado que compostos que atuam em outras vias deflagradoras de apoptose que não a mitocondrial consiste em uma ferramenta terapêutica importante uma vez que a maioria dos cânceres, incluindo os linfomas, apresentam mutações que silenciam a via intrínseca apoptótica. Dentre essas mutações, existe aquela que promove a subexpressão da proteína p53 que é considerada o guardião do genoma humano e possui status de supressora tumoral. Nestes casos, a ativação da via extrínseca da apoptose torna-se uma alternativa atraente para o tratamento dos pacientes (FETT-CONTE & SALLES, 2002; CAVALCANTI JÚNIOR; KLUMB; MAIA, 2002).

Considerando a possibilidade de participação da via extrínseca da apoptose na ação citotóxica de Tamb I e J, testou-se a ativação catalítica da caspase iniciadora 8 em células HL-60 tratadas com esses compostos após 24 h de incubação. Os resultados demonstram que Tamb I e J foram capazes de promover ativação de caspase 8 na concentração de 0,6 µg/mL, sugerindo que a indução de morte celular envolve, pelo menos em parte, a via apoptótica por receptor de morte.

A atividade das caspases efetoras 3 e 7 também foi investigada e os resultados demonstram ativação significativa na concentração de 0,6 µg/mL, comparável ao tratamento com doxorrucina. Nos testes de ativação de caspases, Tamb J mostrou-se levemente mais ativa que Tamb I. Interessantemente, as tambjamins testadas também foram capazes de promover ativação catalítica da caspase 9 na maior concentração testada e após 24 h de exposição.

Corroborando com esses resultados, Pérez-Tomás *et al.* (2003) demonstraram em sua revisão que a família prodigiosina, formada por pigmentos vermelhos polipirrólicos e, portanto, estruturalmente relacionados com as tambjamins, é capaz de promover apoptose por ativação de diversas vias de sinalização, inclusive, a extrínseca e a intrínseca com ativação de caspases 8, 9, 3 e 7. Adicionalmente, prodigiosina, o principal representante da família, também é capaz de induzir morte apoptótica independente de p53 o

que representa uma vantagem sobre outras drogas quimioterápicas. Estas e outras informações sugerem que a classe prodigiosina pode ser considerada promissora para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer.

Em relação à ativação de caspase 9, a despeito da falta de despolarização mitocondrial, explica-se que as tambjamins, na concentração de 0,6 µg/mL, promovem ativação de todas as caspases possíveis, uma vez que a quantidade da droga é relativamente elevada causando intensa alteração intracelular.

A ativação das caspases celulares na morte celular por apoptose é responsável pela clivagem de vários substratos. As caspases iniciadoras tem como alvo as caspases efetoras, e as caspases efetoras, por sua vez, clivam, principalmente, proteínas envolvidas no reparo do DNA e proteínas estruturais do citoesqueleto e do núcleo celular (GRÜTTER, 2000; ZHANG; ZHANG; HERMAN, 2003). Estas ações são responsáveis pelas características típicas de morte celular por apoptose nas quais se inclui a fragmentação internucleossomal do DNA.

Neste sentido, decidiu-se avaliar o conteúdo de DNA de células HL-60 tratadas com Tamb I e J após 3, 6, 12 e 24 h de incubação. O teste foi realizado por citometria de fluxo utilizando o corante fluorogênico iodeto de propídeo que tem elevada afinidade pelo DNA celular. Nesse teste, o tamanho do DNA é diretamente proporcional à intensidade de fluorescência emitida o que permite diferenciar e quantificar as diferentes fases do ciclo celular, bem como, o DNA sub-G₁ (DNA fragmentado ou condensado) (BARROS *et al.*, 2011). Isso é possível porque, após o estímulo proliferativo, a célula sai do estado de repouso (fase G₀) e entra no ciclo celular que está dividido em 4 etapas (G₁, S, G₂ e mitose). Em G₁, a célula se prepara para duplicar o seu DNA. A duplicação propriamente dita ocorre na fase S, e em G₂ a célula se prepara para sofrer a mitose. Assim, percebe-se que o conteúdo de DNA por célula vai aumentando de G₁ a G₂ e, em seguida, diminui com a mitose quando surgem as células filhas (FISCHER *et al.*, 2004).

Dessa forma, a análise do teste descrito acima demonstra que as tambjamins testadas não foram capazes de alterar as fases do ciclo celular de células HL-60 nas concentrações testadas. Entretanto, Tamb I e J induziram intensa fragmentação do DNA celular com o aumento da concentração e do

tempo de exposição, determinando, desse modo, o potencial desses compostos de induzir morte celular por apoptose. Doxorrubicina, por sua vez, causou fragmentação do DNA após 12 e 24 h de exposição. De fato, é sabido que o mecanismo de ação da doxorrubicina (Adriamycin®, Rubex®, Doxil®) envolve o bloqueio do processo de replicação celular por intercalação entre os pares de bases do DNA, bem como, a inibição catalítica da enzima topoisomerase II, uma enzima importante para o desenrolamento da fita do DNA antes da transcrição gênica (MOMPARLER *et al.*, 1976; FORNARI *et al.*, 1994). Estas atividades explicam o seu uso clínico no tratamento de cânceres hematológicos, de bexiga, estômago, fígado, testículo, ovário e mama (WEISS, 1992).

A fragmentação do DNA observada na análise por citometria de fluxo foi corroborada pelo teste do cometa versão alcalina realizado com células HL-60 tratadas com Tamb I e J. Esse teste, segundo Tice *et al.*, (2000), é capaz de detectar quebras de fita simples e dupla do DNA a partir de eletroforese em gel de agarose. Fundamentalmente, o teste do cometa tem sido utilizado para o estudo do dano às moléculas de ácido desoxirribonucléico alcançando o *status* de teste padrão para avaliar a segurança de novas drogas no que se refere à genotoxicidade contra células normais e transformadas (humanas ou animais). Porém, o objetivo do seu uso, no presente trabalho, foi identificar lesões no DNA de células neoplásicas após o tratamento com os compostos testes. O resultado demonstra que as tambjamins testadas foram capazes de promover dano significativo ao DNA o que se constitui em indício importante de indução de morte celular por apoptose (HARTMANN & SPEIT, 1997; DIXON & PRUSKI, 2002; COLLINS, 2004; CAVALCANTI *et al.*, 2006).

Esses achados são corroborados por Cavalcanti *et al.* (2009) os quais demonstraram morte de células leucêmicas humanas por apoptose após indução de dano ao DNA por ácido kauren-19-óico. O trabalho demonstra que esses efeitos derivam da capacidade desse composto de intercalar com o DNA celular e promover, por consequência, a inibição catalítica da enzima topoisomerases I. Semelhantemente ao que foi observado no presente estudo para os compostos tambjamins, também foram observados indícios de morte por necrose de células HL-60 após o tratamento com o ácido kauren-19-óico em tempos e concentrações mais elevadas.

A confirmação do tipo de morte celular foi estabelecida pelo teste da Anexina V por citometria de fluxo o qual permite avaliar a externalização da fosfatidilserina (PS) da membrana celular. Células sanguíneas normais exibem assimetria fosfolipídica, com predominância de fosfatidilcolina e esfingomiéline na parte externa da membrana plasmática e fosfatidiletanolamina e PS na parte interna (KUMAR et al., 2004). Células apoptóticas mostram perda dessa assimetria aumentando a externalização de PS, como visto após o tratamento de células HL-60 com Tamb I e J após 24 h de incubação. Esta marcação é possível pela utilização do corante fluorogênico anexina V que é uma proteína ligante de Ca^{2+} de 35 kDa com grande afinidade pela PS (VERMES et al., 1995).

Durante a apoptose, há um espaço de tempo separando a positividade para a PS e para o 7-AAD enquanto que ambos os eventos coincidem nas células necróticas, fato visto nos gráficos tipo *dotplot* após tratamento com as tambjamins principalmente na maior concentração testada (0,6 $\mu\text{g/mL}$).

Os dados obtidos no teste da anexina V corroboram as alterações morfológicas indicativas de morte celular por apoptose (cariorréxis, rarefação e retração nucleares e extensa formação de vacúolos no citoplasma) visualizadas por microscopia óptica nas células HL-60 tratadas com as substâncias testes. Já a desintegração da membrana plasmática foi uma particularidade tipicamente encontrada na maior concentração testada e nos maiores tempos de incubação utilizados. Isto corrobora com os resultados encontrados por citometria de fluxo após marcação com IP ou 7-AAD, sugerindo efeito condizente com apoptose tardia ou necrose secundária. O IP ou 7-AAD entram nas células somente após a membrana plasmática se tornar permeável e nos estágios finais de morte nenhuma das caspases efetoras (-3, -6 e -7) costuma ser encontrada na sua forma ativa, sendo, portanto, muito comum medir a integridade de membrana e a ação catalítica das caspases para diferenciar entre necrose primária e secundária (DARZYNKIEWICZ et al., 1992; DENECKER et al., 2001; KRYSKO et al., 2008). Neste momento, é importante destacar a vantagem fisiológica que muitos fármacos antineoplásicos atuais possuem em matar as células tumorais por apoptose, devido ao reconhecimento específico graças à externalização de PS e remoção

macrofágica, prevenindo eventuais danos teciduais resultantes da lise celular *in situ*, (VERMES et al., 1995; GRIMSLEY & RAVICHANDRAM, 2003).

Muitos trabalhos tem mostrado que drogas que interferem com o DNA celular apresentam potencial de interferir com a atividade catalítica das enzimas topoisomerases (HOLDEN, 2001; HURLEY, 2002). PÉREZ-TOMÁS *et al.* (2003), em sua revisão, registra que os compostos que possuem o núcleo químico bupirrólico tem a capacidade de ligar-se à hélice do DNA por intercalação, preferencialmente, no sítio AT do seu sulco menor. Esta condição determina a atividade nuclease desses compostos conferindo uma correlação positiva com o seu efeito citotóxico por indução de apoptose. Pelo menos 3 características estruturais responsáveis por esse comportamento podem ser apontadas: a) estrutura planas da molécula; b) presença do grupo metoxila e c) presença de nitrogênio heterocíclico.

Assim, o prosseguimento do estudo consistiu em avaliar o efeito do composto Tamb J sobre a atividade catalítica das enzimas topoisomerases I e II pelo ensaio de relaxamento de DNA. Como foi abordado na introdução deste trabalho, estas são enzimas nucleares que tem a capacidade de reduzir a tensão do DNA durante os processos de replicação, transcrição, recombinação e segregação cromossômica no ciclo celular. Isso ocorre porque as topoisomerases tem a capacidade de clivar (ação nuclease) uma (topoisomerase I) ou as duas fitas (topoisomerase II) de DNA, permitindo o seu desenrolamento, e religar (ação ligase) a cadeia polinucleotídica (PARCHMENT; PESSINA, 1998). A clivagem da fita do DNA pelas topoisomerases resulta do ataque nucleofílico do sítio ativo tirosínico da enzima sobre a ligação fosfodiéster da dupla-hélice. Para tanto, a enzima tipo I liga-se a porção 3' ou 5' do DNA, enquanto que a enzima tipo II liga-se apenas a porção 5' (REID; BENEDETTI; BJORNSTI, 1998).

Neste sentido, muitas classes de inibidores de topoisomerase foram introduzidas na clínica como agentes anticâncer. Os derivados da camptotecina, irinotecan e topotecan, são conhecidos inibidores de topoisomerase I. Doxorrubicina, etoposídeo e amsacrina, por sua vez, são exemplos de fármacos que agem por inibir a topoisomerase II. Ativos contra muitos cânceres sólidos e de origem hematológica, o mecanismo de ação destes compostos tem sido explicado pela estabilização do complexo enzima-

DNA, com conseqüente formação de DNA fragmentado e indução de morte celular por apoptose (D'ARPA; LIU, 1989; POMMIER *et al.*, 2010).

Dessa maneira, os resultados apresentados pelo ensaio de relaxamento de DNA realizado com Tamb J revelam que o mesmo apresenta a capacidade de inibir a atividade catalítica de ambas as enzimas topoisomerases. Diferentemente dos fármacos apresentados no parágrafo anterior, Tamb J parece impedir a ligação da enzima com o DNA evitando a ocorrência do processo de relaxamento do mesmo promovido por clivagem, seguido de desenrolamento e religação da fita polinucleotídica. Como resultado, o DNA em condições celulares também sofre fragmentação, e a sinalização para a apoptose é deflagrada (D'ARPA; LIU, 1989; SORDET *et al.*, 2003).

A capacidade de inibir as duas isoformas de topoisomerase observada para Tamb J confere a este composto uma vantagem em relação às drogas que inibem apenas uma das enzimas. A vantagem está relacionada com os processos celulares de desenvolvimento de resistência a drogas. Células cancerosas tratadas com inibidores específicos de topoisomerase I desenvolvem a capacidade de super-expressar a enzima topoisomerase II, sendo o inverso também constatável. Sendo assim, drogas inibidoras de topoisomerase não-seletivas são detentoras de um potencial terapêutico mais elevado uma vez que o mecanismo de resistência citado acima não será capaz, pelo menos por essa via, de silenciar o efeito anticâncer desses compostos (DENNY, 1997; SALERNO *et al.*, 2010).

Esses achados são corroborados pelo trabalho de Larsen *et al.* (2003) que registram em sua revisão a capacidade que aclarubicina possui de inibir a ação catalítica das enzimas topoisomerase I e II. Este é um agente anticâncer pertencente à classe das antraciclina usado na clínica no tratamento de leucemia mielocítica aguda e que apresenta semelhança estrutural com a doxorubicina que pertence à mesma classe química.

Outro alvo importante na terapia do câncer é a família de receptores HER ou ErbB responsáveis, pelo menos parcialmente, pela proliferação descontrolada das células tumorais. Estes são receptores de membrana celular pertencentes à família tirosina quinase de receptores de fator de crescimento epidermal que apresenta 4 sub-tipos: ErbB-1, ErbB-2, ErbB-3 e ErbB-4. Estruturalmente, os receptores ErbB apresentam um domínio de ligação

extracelular, um domínio transmembrânico e uma porção intracelular com atividade quinase (GARCIA-ECHEVERRIA; SELLERS, 2008; YAP *et al.*, 2008; KLEMENT *et al.*, 2012).

A via de sinalização de crescimento descontrolado ErbB-2/PI₃K é a via oncogênica mais frequentemente mutada ou amplificada no câncer. Estudos tem demonstrado que ErbB-2 está super-expresso em 25 - 30 % de cânceres de mama e de ovário invasivos. Esta amplificação também foi detectada em 24 % dos cânceres endometriais, em 15 % de cânceres de cólon retal, em 53 % de cânceres de pulmão e 69 % de cânceres cervicais. Considerando esses dados, muitos compostos que inibem o receptor ErbB-2 tem sido desenvolvidos e avaliados pelo FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos, com destaque para trastuzumabe e lapatinibe que foram aprovados para uso clínico por este órgão (YUAN; CANTLEY, 2008; LIN *et al.*, 2010; KLEMENT *et al.*, 2012).

Trastuzumabe é um anticorpo monoclonal que bloqueia o receptor ErbB-2 e que tem mostrado resposta clínica promissora no que se refere ao aumento da sobrevida dos pacientes com câncer de mama. Seu uso clínico é realizado em combinação com outras drogas, como por exemplo paclitaxel, epirrubicina, doxorubicina, 5-fluorouracil e ciclofosfamida; com o objetivo de se obter resultados mais positivos na quimioterapia (SLAMON *et al.*, 2001; KLEMENT *et al.*, 2012; LEE, J. S.; SON, B-H.; AHN, 2012; PERNAS *et al.*, 2012).

Baseado nestas informações, o presente trabalho buscou avaliar a importância do receptor ErbB-2 no efeito antitumoral dos compostos Tamb I e J. Para tanto, foram realizados os testes do MTT, da atividade clonogênica, do cometa e do micronúcleo após 24 h e 72 h de exposição com as tambjamins. Nesses testes, foram utilizadas linhagens celulares normais que expressam o receptor ErbB-2 em níveis diferenciados (células mamárias: HBA4, baixa expressão de ErbB-2; C3.6, expressão moderada de ErbB-2; e C5.2, alta expressão de ErbB-2) como modelo.

Os resultados indicam que a associação trastuzumabe/Tamb I ou J foi capaz de potencializar o efeito em todos os testes realizados quando comparado ao tratamento com Tamb I ou J isolados. A potencialização do efeito foi mais evidente após 72 h de incubação e na linhagem celular C5.2,

que apresenta expressão elevada de receptor ErbB-2. Este dado sugere que a referida associação possui elevado potencial anticâncer com a possibilidade de redução de efeitos colaterais, uma vez que o uso desta associação permite reduzir a quantidade de droga referente ao composto tambjamina no tratamento sem alterar significativamente o efeito antitumoral (PERNAS *et al.*, 2012). Corroborando este resultado, Gupta & Srivastava (2012) demonstraram a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do fenil isotiocianato (FIC) em modelos de câncer de mama ErbB-2 positivos potencializando, inclusive, o efeito de doxorrubicina. Nos testes *in vitro*, FIC foi capaz de reduzir o crescimento celular e induzir apoptose de células MDA-MB-231 E MCF-7 transfectadas com ErbB-2. A referida apoptose foi determinada pela ativação da via intrínseca com consequente clivagem da caspase 3 avaliados por ensaios de citotoxicidade, fluorescência, imunofluorescência e western blot. Resultados semelhantes foram obtidos nos testes *in vivo* por meio do modelo xenográfico com células de câncer de mama.

Em seguida, fundamentado no uso de tumores experimentais para a identificação de substâncias com potencial antitumoral, a atividade *in vivo* de Tamb J foi avaliada usando camundongos Swiss transplantados com o tumor S-180. Nesse contexto, animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a compreensão da intricada patogênese do câncer em seres humanos, uma vez que a maioria dos conceitos de tumorigênese atualmente aceitos foi fortemente influenciada por modelos de desenvolvimento de câncer em camundongos. Esses organismos são modelos acessíveis, prolíferos, com período de gestação curto, de fácil domesticação e manutenção e possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos nossos. Logo, o camundongo se tornou o mamífero mais usado na experimentação animal (ANDRADE *et al.*, 2002; RANGARAJAN & WEINBERG, 2003).

O Sarcoma 180 é um tumor murino e uma das linhagens celulares mais usadas na pesquisa por novos produtos com atividade antineoplásica (ITOKAWA *et al.*, 1990; BEZERRA *et al.*, 2008; MAGALHÃES *et al.*, 2010). Schabel *et al.* (1977) demonstrou que o melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado até 48 h após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral, o que embasou o presente trabalho em optar pelo

início do tratamento dos animais com Tamb J 24 h após a administração do inóculo de células cancerosas. Como determinado pelos ensaios *in vitro* usando o teste do MTT, pelo qual se mostrou a atividade citotóxica *in vitro* de Tamb J sobre linhagens celulares de câncer de diferentes tipos histológicos, os estudos *in vivo* também revelaram elevado efeito antiproliferativo de Tamb J nas doses de 10 e 20 mg/kg/dia via i.p., com taxas de redução do crescimento tumoral de 39.87 e 78.82 %, respectivamente. A análise histológica dos tumores desses grupos revelou frequentes áreas de necrose margeadas por células com características apoptóticas, embora a apoptose tenha sido mais intensa na maior dose de tambjamina e, também, no grupo tratado com ciclofosfamida, provavelmente, como resultado da ação antitumoral dos compostos administrados.

De fato, vários estudos tem demonstrado uma correlação positiva entre os resultados *in vitro* de citotoxicidade e o efeito antitumoral em camundongos transplantados com Sarcoma 180 (MAGALHÃES *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Semelhante aos resultados obtidos com Tamb J nesse modelo, Bezerra *et al.* (2006) demonstrou a inibição do crescimento tumoral do Sarcoma 180 após administração intraperitoneal de piplartina nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia. Os percentuais de inibição observados foram 28,7 e 52,3 %, respectivamente, os quais foram acompanhados por uma redução da marcação por imunohistoquímica de Ki67 dos tumores, que é um antígeno nuclear associado com as fases do ciclo celular. Entretanto, piplartina foi capaz de promover alterações morfológicas reversíveis no fígado e rins dos animais. No fígado, foram observadas degeneração de hepatócitos e esteatose em algumas áreas do mesmo. Nos rins, por sua vez, o efeito foi mais tóxico com discreta alteração hidrópica do epitélio e túbulos proximais e alguma hemorragia tubular. Além disso, segundo Schabel *et al.* (1977), a regressão total de tumores nos animais, a redução no crescimento dos tumores sensíveis ao composto e/ou o aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os animais não tratados são fatores diretamente relacionados à atividade antitumoral.

Entretanto, o balanço entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de um composto químico é um parâmetro importante quando se pretende verificar a sua aplicabilidade farmacológica (ANAZETTI *et al.*, 2003). Com esta

preocupação, os animais submetidos ao tratamento com Tamb J foram avaliados em seus aspectos comportamentais, morfológicos, histopatológicos, bioquímicos, hematológicos e genotóxicos.

O fígado, que desenvolve um papel importante no metabolismo, e os rins, que são os principais órgãos do sistema urinário, desempenham um grande número de funções no corpo, incluindo a detoxificação e a excreção de substâncias inúteis, respectivamente. Por outro lado, o baço exerce papel importante no processo de renovação de células vermelhas e imunes do sangue. A descrição resumida dos órgãos citados acima deve-se ao fato de que os mesmos são frequentemente afetados por fármacos antineoplásicos. Disfunção hepática por irinotecano, toxicidade renal induzida por docetaxel e supressão hematopoiética por 5-fluorouracil são alguns exemplos de alterações presumíveis do tratamento anticâncer (ZAMAGNI *et al.*, 1998; CAO *et al.*, 1998; SAIF, 2009).

No presente trabalho, a histologia do fígado dos animais tratados com Tamb J revela que o composto nas doses testadas (10 e 20 mg/kg/dia) não foi capaz de alterar significativamente o órgão quando comparado com os grupos controle negativo e saudáveis. Este dado foi corroborado pela análise das transaminases, que são marcadores de função hepática (MAGALHÃES *et al.*, 2011), na qual não foi detectada alteração nos níveis séricos dessas enzimas.

A microscopia dos rins dos animais tratados com Tamb J, por sua vez, também revela que o composto nas doses testadas (10 e 20 mg/kg/dia) não foi capaz de alterar significativamente o órgão quando comparado com os grupos controle negativo e saudáveis. Isto, também, foi corroborado pela análise dos níveis séricos de uréia, que é um marcador de função renal (MAGALHÃES *et al.*, 2011), onde não observou-se diferença significativa entre os grupos.

Em adição, a análise histológica do baço permite verificar que o grupo tratado com Tamb J na dose de 10 mg/kg/dia não foi alterado significativamente quando comparado com os grupos controle negativo e saudáveis. Já na dose de 20 mg/kg/dia de Tamb J, observou-se depleção linfocitária evidenciada pela rarefação de células linfóides nas polpas vermelha e branca, com corpúsculos de Malpighi mal definidos. Este dado foi corroborado pela redução do peso relativo do órgão quando comparado com o grupo controle negativo, o que também foi observado pelo tratamento dos

animais com ciclofosfamida 20 mg/kg/dia. Sendo o baço o principal órgão responsável pela renovação do sangue periférico (BEZERRA *et al.*, 2008), o resultado encontrado consiste em um fator limitante importante no possível uso de Tamb J como droga antitumoral que, portanto, precisa ser contornado.

Considerando os dados hematológicos registrados no presente trabalho, observou-se que não houve alteração significativa desses parâmetros entre os grupos tratados com Tamb J e o grupo controle negativo, sendo o mesmo observado para o tratamento com ciclofosfamida. Porém, detectou-se discreta redução significativa de hemoglobina e linfócitos no tratamento com Tamb J e ciclofosfamida quando comparado com o grupo de animais saudáveis (sem tumor e tratamento). Especula-se, portanto, que esta redução tenha ocorrido, provavelmente, pela indução e presença de tumor nos animais, bem como, pelo tratamento dos mesmos (contenção durante o manuseio e injeções intraperitoneais repetidas) segundo o protocolo experimental, uma vez que os animais do grupo saudável não foram submetidos a essas intervenções.

Em termos comportamentais, os animais tratados com Tamb J, principalmente na maior dose testada, apresentaram piloereção e letárgia (sinais de dor); diarreia e entumescimento do abdome. A perda de peso foi observada apenas na dose de 20 mg/kg/dia e no tratamento com ciclofosfamida. Embora a redução da massa tumoral associada com a perda mínima de peso após 2 semanas de tratamento (não mais que 10 %) sejam indicativos de uma janela terapêutica aceitável para fármacos anticâncer em humanos (KAMB, 2005), compostos que apresentam toxicidade sistêmica severa e que favorecem intensa redução do peso, como o 5-FU, são, costumeiramente, utilizados na clínica (ZÚÑIGA-GONZÁLEZ *et al.*, 2003). A perda de peso é um dos efeitos colaterais mais comuns após algumas sessões de quimioterapia, uma vez que as células da mucosa intestinal também são alvos inespecíficos do fármaco antineoplásico, favorecendo a indução de vômito e diarreia (KATZUNG *et al.*, 2003).

Finalizando, neste trabalho, a análise da segurança do tratamento dos camundongos com Tamb J, realizou-se a avaliação do potencial genotóxico e mutagênico desse composto em células mononucleares de sangue periférico e em hemácias da medula óssea dos animais utilizando os ensaios cometa e do micronúcleo, respectivamente, isoladas após 7 dias consecutivos de

tratamento. Os resultados demonstram que Tam J e ciclofosfamida na dose de 20 mg/kg/dia foram genotóxicas e clastogênicas nas condições experimentais descritas.

Os resultados demonstram que Tamb J e ciclofosfamida, na dose de 20 mg/kg/dia, foram genotóxicas e clastogênicas nas condições experimentais descritas, uma vez que as quebras de fita dupla representam umas das mais severas lesões ao DNA, devido à perda da continuidade cromossômica e à geração de fragmentos cromossômicos acêntricos (sem centrômero) que comprometem a segregação cromossômica durante a mitose (KAYE *et al.*, 2004). Esse fato pode estar relacionado à formação de eritrócitos policromáticos micronucleados na medula óssea dos camundongos do grupo Tamb J e ciclofosfamida 20 mg/kg/dia i.p. Os MNs representam perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico, gerando fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que não são incluídos no núcleo principal durante a telófase da mitose (FENECH, 2007). No entanto, nem todo agente genotóxico é, necessariamente, mutagênico, pelo fato das lesões geradas no DNA poderem ser reparadas. Adicionalmente, esses danos não podem ser extrapolados a todas as células somáticas e germinativas do ser humano, pois não está claro se injúrias encontradas em células da linhagem branca do sangue refletem, fielmente, aquelas ocorridas em órgãos-alvo (ALBERTINI *et al.*, 2000; ANAZETTI *et al.*, 2003; MATTIOLI *et al.*, 2006). Logo, o dano ao DNA é somente a primeira etapa do processo carcinogênico, não fornecendo nenhuma informação sobre o potencial de Tamb J como carcinógeno (MATTIOLI *et al.*, 2006).

Agentes antineoplásicos usados atualmente na clínica são indutores de quebras nas fitas do DNA de células de mamíferos, como visto com os inibidores de topoisomerase I (camptotecina) e topoisomerase II (etoposídeo) (SORTIBRÁN *et al.*, 2006) e com o 5-FU. Este último, por exemplo, é um antimetabólito muito usado para tratar adenocarcinoma de mama e cânceres do trato gastrointestinal, de cabeça e pescoço graças a sua ação inibidora sobre a enzima timidilato sintase, entre outros mecanismos, apesar de sua atividade clastogênica *in vivo* (GREM, 1997; ZÚÑIGA-GONZÁLEZ *et al.*, 2003; NOORDHUIS *et al.*, 2004). Os diterpenos ácido caurenóico (CAVALCANTI *et*

al., 2006) e paclitaxel (BRANHAM *et al.*, 2004) também apresentam positividade para testes genotóxicos (Cometa e Micronúcleo) realizados com células sanguíneas de série branca de humanos.

Assim, é bastante provável que a indução de danos ao DNA observada com Tamb J nos ensaios cometa e do micronúcleo seja um indício do mecanismo de ação de sua citotoxicidade tumoral, uma vez que compostos 4-metoxipirrólicos possuem a capacidade de intercalar o DNA celular (MELVIN *et al.*, 1999). Ferguson & Denny (2007), em sua revisão, apontam que a estrutura planar do composto, como nas acridinas e antraciclina, é fundamental para o processo de intercalação com o DNA e, muitas vezes, determinante para o efeito genotóxico dos mesmos. Backer *et al.* (1990), utilizando testes similares, acrescentam que esse efeito pode estar ligado a capacidade do composto de interferir com a atividade catalítica das enzimas topoisomerasas, como foi observado para Tamb J aqui estudada nos ensaios de relaxamento de DNA.

Dessa maneira, com base nas informações geradas no presente trabalho e como pode ser observado na **figura 36**, as tambjamins analisadas, em especial Tam J, demonstraram elevado potencial anticâncer fortalecendo a importância dos alcalóides 4-metoxipirrólicos na pesquisa antitumoral básica.

Entretanto, registra-se aqui a necessidade da realização de estudos adicionais mais extenso com o objetivo de aprofundar a determinação dos possíveis mecanismos de ação desses compostos, bem como, sua ação antitumoral *in vivo*. Destaca-se também a necessidade de se desenvolver análogos desses compostos que possam apresentar maior ou, pelo menos, mesmo efeito citotóxico, com menos efeitos colaterais.

Assim, é possível apontar algumas perspectivas de continuidade do estudo:

- Estudos *in vitro* desses compostos associados com trastuzumabe em linhagem celular de câncer humano que super-expressa o receptor ErbB-2;
- Estudo do envolvimento dos lisossomos no efeito citotóxico dos compostos;
- Estudo *in vivo* desses compostos associados com ciclofosfamida nos modelos antitumorais *Hollow Fiber* e *Xenográfico*;

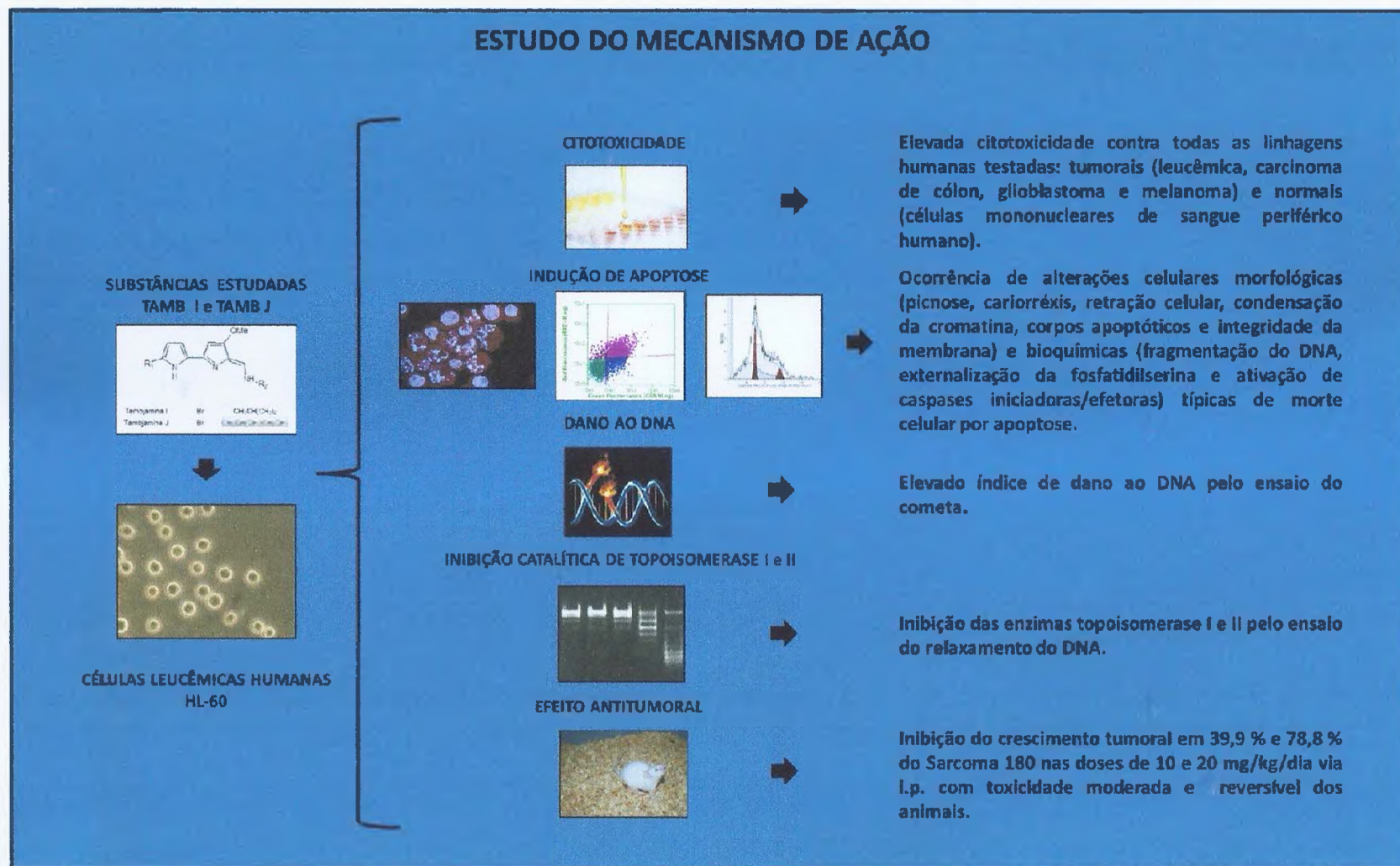


Figura 36 - Resumo dos resultados da investigação do potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo* dos alcalóides sintéticos tambjamina I (Tamb I) e J (Tamb J).

Conclusão

6 Conclusão

Dentre os alcalóides tambjamins testados, dois foram selecionados (Tamb I e J) os quais apresentaram efeito citotóxico contra linhagens celulares de câncer humano com baixa seletividade para células tumorais. Ambos os compostos foram capazes de induzir morte celular por apoptose em células leucêmicas HL-60 ativando, provavelmente, a via extrínseca desse processo de morte. Tamb I e J associados com trastuzumabe foram mais ativos que esses compostos testados isoladamente contra células que superexpressam o receptor ErbB-2. Além disso, Tamb J mostrou-se mais potente que Tamb I nos testes *in vitro* e foi capaz de interferir com a atividade catalítica das enzimas topoisomerases I e II. No teste *in vivo*, Tamb J reduziu drasticamente o crescimento tumoral exibindo toxicidade moderada e reversível representada por diarreia, esplenotoxicidade e genotoxicidade.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADJEI, A. A.; CHARRON, M.; ROWINSKY, E. K.; SVINGEN, P. A.; MILLER, J.; REID, J. M.; SEBOLT-LEOPOLD, J.; AMES, M. M.; KAUFMANN, S. H. Effect of Pyrazoloacridine (NSC 366140) on DNA Topoisomerases I and 111. **Clinical Cancer Research**, 4: 683-691, 1998.
- ALBERTINI, R. J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G. R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A. T., NORPPA, H., SHUKER, D. E., TICE, R., WATERS, M. D., AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutat. Res.**, 463: 111-172, 2000.
- ALIMORADI, H.; BARZEGAR-FALLAH, A.; HASSANZADEH, G.; MOHAMMADI-RICK, S.; ASADI, F.; DELFAN, B.; ABBASI, A.; DEHPOUR, A. R. The Cardioprotective Effects of an Antiemetic Drug, Tropisetron, on Cardiomyopathy Related to Doxorubicin. **Cardiovasc. Toxicol.**, 2012.
- 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. **Toxicol.**, 188: 261-274, 2003.
- ANDERSON, D.; YU, T. W.; PHILLIPS, B. J.; SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. **Mutat. Res.**, 307: 261-271, 1994.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. 388p.
- ARAÚJO, A. J.; DE SOUZA, A. A.; DA SILVA JÚNIOR, E. N.; MARINHO-FILHO, J. D.; DE MOURA, M. A.; ROCHA, D. D.; VASCONCELLOS, M. C.; COSTA, C. O.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; FERREIRA, V. F.; DE ABREU, F. C.; PINTO, A. V.; MONTENEGRO, R. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GOULART, M. O. Growth inhibitory effects of 3'-nitro-3-phenylamino nor-beta-lapachone against HL-60: a redox-dependent mechanism. **Toxicol. In Vitro**, 26: 585-94, 2012.

ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 19: 325-331, 2008.

BACKER, L. C.; ALLEN, J. W.; HARRINGTON-BROCK, K.; CAMPBELL, J. A.; DEMARINI, D. M.; DOERR, C. L.; HOWARD, D. R.; KLIGERMAN, A. D.; MOORE, M. M. Genotoxicity of inhibitors of DNA topoisomerases I (camptothecin) and II (m-AMSA) in vivo and in vitro. **Mutagenesis**, 5: 541-547, 1990.

BANWELL, M. Research in natural product synthesis: a vital and dynamic global enterprise. **Tetrahedron**, 64: 4669-4670, 2008.

BARROS, F. W.; BANDEIRA, P. N.; LIMA, D. J.; MEIRA, A. S.; DE FARIAS, S. S.; ALBUQUERQUE, M. R.; DOS SANTOS, H. S.; LEMOS, T. L.; DE MORAIS, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. **Bioorg. Med. Chem.**, 19: 1268-1276, 2011.

BARROS, F. W.; SILVA, T. G.; DA ROCHA PITTA, M. G.; BEZERRA, D. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, C.; DE MOURA, M. A.; DE ABREU, F. C.; DE LIMA, C.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; GOULART, M. O. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, 20: 3533-9, 2012.

BARTH, R.; MULZER, J. Two-directional total synthesis of efomycine M and formal total synthesis of elaiolide. **Tetrahedron**, 64: 4718-4735, 2008.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 39: 801-807, 2006.

BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; ODORICO DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; DE ALENCAR, N. M. N.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *Journal of Applied Toxicology*, 28: 156-163, 2008.

BEZERRA, D. P.; MILITÃO, G. C. G.; DE CASTRO, F. O.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in vitro**, 21: 1-8, 2007.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; ALVES, A. P.; PESSOA, O. D.; CHAVES, J. H.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the Piper species. **J. Appl. Toxicol.**, 28: 599-607, 2008.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antiproliferative Effects of Two Amides, Piperine and Piplartine, from Piper Species. **Zeitschrift fur Naturforschung**, 60: 539-543, 2005.

BHINGE, K.; GUPTA, V.; HOSAINA, S.; SATYANARAYANAJOIS, S. D.; MEYERB, S. A.; BLAYLOCKB, B.; ZHANG, Q-J.; LIU, Y-Y. The opposite effects of doxorubicin on bone marrow stem cells versus breast cancer stem cells depend on glucosylceramide synthase. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, *in press*, 2012.

BLACKMAN, A. J.; LI, C. P. New Tambjamine Alkaloids From the Marine Bryozoan Bugula dentata. **Australian Journal of Chemistry**, 47: 1625 - 1629, 1994.

BRANGI, M.; LITMAN, T.; CIOTTI, M.; NISHIYAMA, K.; KOHLHAGEN, G.; TAKIMOTO, C.; ROBEY, R.; POMMIER, Y.; FOJO, T.; BATES, S.E. Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. **Cancer Res.**, 59: 5938-5946, 1999.

BRANHAM, M. T., NADIN, S. B., VARGAS-ROIG, L. M., CIOCCA, D. R. DNA damage induced by paclitaxel and DNA repair capability of peripheral blood lymphocytes as evaluated by the alkaline comet assay. **Mutat. Res.**, 560: 11-17, 2004.

BURLINSON, B.; TICE, R. R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S. Y.; COLLINS, A. R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T. S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y. F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. **Mutat. Res.**, 627: 31-35, 2007.

CAO, X.; CAI, R.; JU, D. W.; TAO, Q.; YU, Y.; WANG, J. Augmentation of hematopoiesis by Wbroblast-mediated interleukin-6 gene therapy in mice with chemotherapy. **J. Interferon Cytokine Res.**, 18: 227-233, 1998.

CARTE, B.; FAULKNER, D. J. Defensive metabolites from three nembrothid nudibranchs. **J. Org. Chem.**, 48: 2314-2318, 1983.

CARTE, B.; FAULKNER, D. J. Role of secondary metabolites in feeding associations between a predatory nudibranch, two grazing nudibranchs, and bryozoan. **J. Chem. Ecol.**, 12: 795-804, 1986.

CAVALCANTI JÚNIOR, G. B.; KLUMB, C. E.; MAIA, R. C. p53 and hematological malignancies. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 48: 419-427, 2002.

CAVALCANTI, B. C., COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES, M. O., BURBANO, R. R., SILVEIRA, E. R., CUNHA, K. M. A., RAO, V. S. N., MOURA, D. J., ROSA, R. M., HENRIQUES, J. A. P., PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in copaíba oil. **Food Chem. Toxicol.**, 44: 388-392, 2006.

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

CAVALCANTI, B. C.; JÚNIOR, H. V. N.; SELEGHIM, M. H. R.; BERLINCK, R. G. S.; CUNHA, G. M. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Cytotoxic and genotoxic effects of tambjamine D, an alkaloid isolated from the nudibranch *Tambja eliora*, on chinese hamster lung fibroblasts. **Chemico-Biological Interactions**, 174: 155-162, 2008.

CLARE, M. G.; LOREZON, G.; AKHURST, L. C.; MARZIN, D.; DELFT, J.; MONTERO, R.; BOTTA, A.; BERTENS, A.; CINELLI, S.; THYBAUD, V.; LORGE, E. SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test II. Using human lymphocytes. **Mutat. Res.**, 607: 37-60, 2006.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, Applications, and Limitations. **Mol. Biotechnol.**, 26: 249-61, 2004.

COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M.; BOLZANI, V. D.; FURLAN, M.; SANTOS V. A.; CORSINO, J.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicol. Vitro**, 22: 854-863, 2008.

COSTA-LOTUFO, L. V.; ARAÚJO, E. C. C.; LIMA, M. A. S.; MORAES, M. E. A.; PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; MORAES, M. O. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). **Pharmazie**, 58: 78-79, 2004.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M.; FARIAS, P. M.; VIANA, G. S.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. Gramosa, N. V.; Rao, V. S. N. The cytotoxic and embriotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffi* oleo-resin. **Toxicon**, 40: 1231-1234, 2002.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. **Chem. Rev.**, 109: 3012-3043, 2009.

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

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

D'ARPA, P.; LIU, L. F. Topoisomerase-targeting antitumor drugs. **Biochimica et Biophysica Acta**, 989: 163-177, 1989.

DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M. A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, 13: 795-808, 1992.

DENECKER, G.; VERCAMMEN, D.; STEEMANS, M.; VANDEN BERGHE, T.; BROUCKAERT, G.; VAN LOO, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; FIERS, W.; GROOTEN, J.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P. Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. **Cell Death Differ.**, 8: 829-840, 2001.

DENNY, W. A. Dual topoisomerase I/III poisons as anticancer drugs. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, 6: 1845-1851, 1997.

DIXON, D. R., PRUSKI, A. M. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. **Mutagenesis**, 17: 495-507, 2002.

DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, 102: 33-42, 2000.

EEC DIRECTIVE OF 1986. Council Directive of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC).

ENG, W. K.; MCCABE, F. L.; TAN, K. B.; MATTERN, M. R.; HOFMANN, G. A.; WOESSNER, R. D.; HERTZBERG, R. P.; JOHNSON, R. K. Development of a stable camptothecin-resistant subline of P388 leukemia with reduced topoisomerase I content. **Mol. Pharmacol.**, 38: 471-480, 1990.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The Comet Assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, 339: 37-59, 1995.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat. Protocols**, 2: 1084-1104, 2007.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutat. Res.**, 392: 11-18, 1997.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, 455: 81-95, 2000.

FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. **Mutat. Res.**, 534: 65-75, 2003.

FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. **Mutat. Res.**, 623: 14-23, 2007.

FETT-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 24: 85-89, 2002.

FIEBIGA, H. H.; MAIERA, A.; BURGER, A. M. Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery. **European Journal of Cancer**, 40: 802-820, 2004.

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

FORNARI, F. A., RANDOLPH, J. K., YALOWICH, J. C., RITKE, M. K., GEWIRTZ, D. A. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. **Mol. Pharmacol.**, 45: 649-656, 1994.

FORTERRE, P.; GRIBALDO, S.; GADELLE, D.; SERRE, M.C. Origin and evolution of DNA topoisomerases. **Biochimie**, 89: 427-446, 2007.

FORTUNE, J. M.; OSHEROFF, N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, 64: 221-253, 2000.

FRANCISCO, R.; PÉREZ-TOMÁS, R.; GIMÈNEZ-BONAFÉ, P.; SOTO-CERRATO, V.; GIMÈNEZ-XAVIER, P.; AMBROSIO, S. Mechanisms of prodigiosin cytotoxicity in human neuroblastoma cell lines. **European Journal of Pharmacology**, 572: 111-119, 2007.

GARCIA-ECHEVERRIA, C.; SELLERS, W. R. Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. **Oncogene**, 27: 5511-5526, 2008.

GOEL, S.; CHIRGWIN, J.; FRANCIS, P.; STUART-HARRIS, R.; DEWAR, J.; MILESHKIN, L.; SNYDER, R.; MICHAEL, M.; KOCZWARA, B. Rational use of

trastuzumab in metastatic and locally advanced breast cancer: Implications of recent research. **The Breast**, 20: 101-110, 2011.

GRANATO, A. C.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; SELEGHIM, M. H. R.; BERLINCK, R. G. S.; MACEDO, M. L.; FERREIRA, A. G.; ROCHA, R. M.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C. Produtos naturais da ascídia *Botrylloides giganteum*, das esponjas *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Cliona delitrix* e do nudibrânquio *Tambja eliora*, da costa do Brasil. **Química Nova**, 28: 192-198, 2005.

GREM, J. L. Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil. **Semin. Radiat. Oncol.**, 7: 249-259, 1997.

GRIMSLEY, C.; RAVICHANDRAN, K. S. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. **Trends Cell Biol.**, 13: 648-656, 2003.

GRÜTTER, M. G. Caspases: key players in programmed cell death. **Current Opinion in Structural Biology**, 10: 649-655, 2000.

GUPTA, P.; SRIVASTAVA, S. K. Antitumor activity of phenethyl isothiocyanate in HER2-positive breast cancer models. **Medicine**, 10: 1-18, 2012.

HAIT, W. N.; HAMBLEY, T. W. Targeted cancer therapeutics. **Cancer Res.**, 69: 1263-1267, 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144: 4, 2011.

HARRIS, R. A.; EICHHOLTZ, T. J.; HILES, I. D.; PAGE, M. J.; O'HARE M. J. New model of ErbB-2 over-expression in human mammary luminal epithelial cells. **Int. J. Cancer**, 80: 477-484, 1999.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet assay). **Toxicol. Lett.**, 90: 183-188, 1997.

HEARN, W. R.; MEDINA-CASTRO, J.; ELSON, M. K. Colour change of prodigiosin. **Nature**, 220: 170-171, 1968.

HEDDLE, J. A. A rapid *in vitro* test for chromosome damage. **Mutat. Res.**, 18: 187-190, 1973.

HENNINGER, C.; HUELSENBECK, J.; HUELSENBECK, S.; GRÖSCH, S.; SCHAD, A.; LACKNER, K. J.; KAINA, B.; FRITZ, G. The lipid lowering drug lovastatin protects against doxorubicin-induced hepatotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 261: 66-73, 2012.

HOLDEN, J. A. DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic. **Curr. Med. Chem. Anticancer Agents**, 1: 1-25, 2001.

HSIANG, Y. H.; LIU, L. F.; WALL, M. E.; WANI, M. C.; NICHOLAS, A. W.; MANIKUMAR, G.; KIRSCHENBAUM, S.; SILBER, R.; POTMESIL, M. DNA topoisomerase I-mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogs. **Cancer Res.**, 49: 4385-4389, 1989.

HUDIS, C. A. Trastuzumab mechanism of action and use in clinical practice. **N. Engl. J. Med.**, 357: 39-51, 2007.

HURLEY, L. H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, 2: 188-200, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2008: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>>. Acesso em: 6 de abril de 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011. p. 25-27. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/versaofinal.pdf>>. Acesso em: 30 maio de 2012.

ITOKAWA, H., TOTSUKA, N., MORITA, H., N., TAKEYA, K., IITAKA, Y., SCHENKEL, E. P., MONTIDOME, M. New antitumor Principles, Casearins A-F, from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chem. Pharm. Bull.**, 38: 3384-3388, 1990.

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

KATZUNG, G. B. **Basic and Clinical Pharmacology**. USA: McGraw-Hill Medical, 2003, 1088p.

KAYE, J. A., MELO, J. A., CHEUNG, S. K., VAZE, M. B., HABER, J. E., TOCZYSKI, D. P. DNA breaks promote genomic instability by impeding proper chromosome segregation. **Curr. Biol.**, 14, 2096-2106, 2004.

KLEMENT, G. L.; GOUKASSIAN, D.; HLATKY, L.; CARROZZA, J.; JAMES P. MORGAN, J. P.; YAN, X. Cancer therapy targeting the HER2-PI3K pathway: potential impact on the heart. **Frontiers in pharmacology**, 3: 1-13, 2012.

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 Differ.**, 2: 1463-1467, 2005.

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

KRYSKO, D. V.; VANDEN BERGHE, T.; PARTHOENS, E.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance. **Methods Enzymol.**, 442: 307-341, 2008.

KUMAR, V., ABBAS, A. K, FAUSTO, N., ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S. **Pathology Basis of Disease**. China: WB Saunders, 2004, 1552p.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. Robbins and Cotran Pathologic basis of diseases. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2004.

LARSENA, A. K.; ESCARGUEIL, A. E.; SKLADANOWSKI, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, 99: 167-181, 2003.

LEE, J. S.; SON, B-H.; AHN, S. H. The Predictive Value of Serum HER2/neu for Response to Anthracycline-Based and Trastuzumab-Based Neoadjuvant Chemotherapy. **J. Breast. Cancer**, 15: 189-196, 2012.

LEYVA, A.; BLUM, F. E.; LEY, S. V. A new synthesis of (-)-epipyriculol: a phytotoxic metabolite. **Tetrahedron**, 64: 4711-4717, 2008.

LIN, R. C.; WEEKS, K. L.; GAO, X. M.; WILLIAMS, R. B.; BERNARDO, B. C.; KIRIAZIS, H.; MATTHEWS, V. B.; WOODCOCK, E. A.; BOUWMAN, R. D.; MOLLICA, J. P.; SPEIRS, H. J.; DAWES, I. W.; DALY, R. J.; SHIOI, T.; IZUMO,

S.; FEBBRAIO, M. A.; DU, X. J.; MCMULLEN, J. R. PI3K (p110alpha) protects against myocardial infarction-induced heart failure: identification of PI3K-regulated miRNA and mRNA. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 30: 724-732, 2010.

LINDQUIST, N.; FENICAL, W. New tamjamine class alkaloids from the marine ascidian *Atapozoa* sp. and its nudibranch predators. Origin of the tambjamines in *Atapozoa*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 47: 504-506, 1991.

MACKLIS, J. D.; MADISON R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **J. Neurosci. Methods**, 31: 43-46, 1990.

MAGALHÃES, H. I. F.; BEZERRA, D. P.; CAVALCANTI, B. C.; WILKE, D. V.; ROTTA, R.; DE LIMA, D. P.; BEATRIZ, A.; ALVES, A. P. N. N.; BITENCOURT, F. S.; DE FIGUEIREDO, I. S. T.; ALENCAR, N. M. N.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. In vitro and in vivo antitumor effects of (4-methoxyphenyl)(3,4,5-trimethoxyphenyl)methanone. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, 68: 45-52, 2011.

MAGALHÃES, H. I. F.; FERREIRA, P. M. P.; MOURA, E. S.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O. PESSOA, C. In vitro and in vivo antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **An. Acad. Bras. Cienc.**, 82: 407-416, 2010.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. Na overview of cell death. **Am. J. Path.**, 146: 3-15, 1995.

MANDERVILLE, R. A. Synthesis, proton-affinity and anti-cancer properties of the prodigiosin-group natural products. **Curr. Med. Chem. Anticancer Agents**, 1:195-218, 2001.

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

MARINHO-FILHO, J. D. B.; BEZERRA, D. P.; ARAÚJO, A. J.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C.; DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Oxidative stress induction by

(+)-cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells. **Chemico-Biological Interactions**, 183: 369-379, 2010.

MATTIOLI, F., MARTELLI, A., GOSMARA, M., GARBERO, C., MANFREDI, V., VARALDO, E., TORRE, G. C., BRAMBILLA, G. DNA fragmentation and DNA repair synthesis induced in rat and human thyroid cells by chemicals carcinogenic to the rat thyroid. **Mutation Res.**, 609: 146-153, 2006.

MCCLENDON, A. K.; RODRIGUEZ, A. C.; OSHEROFF, N. Human topoisomerase II α rapidly relaxes positively supercoiled DNA: implications for enzyme action ahead of replication forks. **J. Biol. Chem.**, 280: 39337-39345, 2005.

MELVIN, M. S.; CALCUTT, M. W.; NOFTLE, R. E.; MANDERVILLE, R. A. Influence of the A-Ring on the Redox and Nuclease Properties of the Prodigiosins: Importance of the Bipyrrrole Moiety in Oxidative DNA Cleavage. **Chem. Res. Toxicol.**, 15: 742-748, 2002a.

MELVIN, M. S.; FERGUSON, D. C.; LINDQUIST, N.; MANDERVILLE, R. A. DNA Binding by 4-Methoxypyrrrolic Natural Products. Preference for Intercalation at AT Sites by Tambjamine E and Prodigiosin. **J. Org. Chem.**, 64: 6861-6869, 1999.

MELVIN, M. S.; TOMLINSON, J. T.; PARK, G.; DAY, C. S.; SALUTA, G. D.; KUCERA, G. L.; MANDERVILLE, R. A. Influence of the A-Ring on the Proton Affinity and Anticancer Properties of the Prodigiosins. **Chem. Res. Toxicol.**, 15: 734-741, 2002b.

MELVIN, M. S.; WOOTON, K. E.; RICH, C. C.; SALUTA, G. R.; KUCERA, G. L.; LINDQUIST, N.; MANDERVILLE, R. A. Copper-nuclease efficiency correlates with cytotoxicity for the 4-methoxypyrrrolic natural products. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 87: 129-135, 2001.

MIAO, Z. H.; PLAYER, A.; SHANKAVARAM, U.; WANG, Y. H. ZIMONJIC, D. B.; LORENZI, P. L.; LIAO, Z. Y.; LIU, H.; SHIMURA, T.; ZHANG, H. L. Nonclassic functions of human topoisomerase I: genome-wide and pharmacologic analyses. **Cancer Res.**, 67: 8752-8761, 2007.

- MILITAO, 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 pterocarpans from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sci.**, 78: 2409-2417, 2006.
- MOMPARLER, R. L.; KARON, M.; SIEGEL, S. E.; AVILA, F. Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. **Cancer Res.**, 36: 2891-2895, 1976.
- MONTANER, B.; CASTILLO-ÁVILA, W.; MARTINELL, M.; ÖLLINGER, R.; AYMAMI, J.; GIRALT, E.; PÉREZ-TOMÁS, R. DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin. **Toxicological Sciences**, 85: 870-879, 2005.
- MONTANER, B.; PÉREZ-TOMÁS, R. The prodigiosins: a new family of anticancer drugs. **Curr. Cancer Drug Targ.**, 3: 57-65, 2003.
- MORHAM, S. G.; KLUCKMAN, K. D.; VOULOMANOS, N.; SMITHIES, O. Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection. **Mol. Cell. Biol.**, 16: 6804-6809, 1996.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 16: 55-63, 1983.
- MOUKHARSKAYA, J.; VERSCHRAEGEN, C. Topoisomerase 1 Inhibitors and Cancer Therapy. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.*, 26: 507-525, 2012.
- NAGATA, S. Apoptosis by death factor. **Cell**, 88: 355-365, 1997.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, 66: 1022-1037, 2003.
- NITISS, J. L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. **Nat. Rev. Cancer**, 9: 327-337, 2009a.
- NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nat. Rev. Cancer**, 9: 338-350, 2009b.
- NOORDHUIS, P., HOLWERDA, U., VAN DER WILT, C. L., VAN GROENINGEN, C. J., SMID, K., MEIJER, S., PINEDO, H. M., PETERS, G. J.

5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Ann. Oncol.**, 15: 1025-1032, 2004.

OLIVEIRA, J. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCAR, N. M. N.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; FIGUEIREDO, I. S. T.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ALVES, A. N. N.; RAMOS, M. V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol**, 382: 139-149, 2010.

OPPEGARD, L. M.; OUGOLKOV, A. V.; LUCHINI, D. N.; SCHOON, R. A.; GOODELL, J. R.; KAUR, H.; BILLADEAU, D. D.; FERGUSON, D. M.; HIASA, H. Novel acridine-based compounds that exhibit an anti-pancreatic cancer activity are catalytic inhibitors of human topoisomerase II. **European Journal of Pharmacology**, 602: 223-229, 2009.

OSHEROFF, N.; ZECHIEDRICH, E.; GALE, K. C. Catalytic function of DNA topoisomerases II. **BioEssays**, 13: 269-75, 1991.

PARCHMENT, R. E.; PESSINA, A. Topoisomerase I inhibitors and drug resistance. **Cytotechnology**, 27: 149-164, 1998.

PEREIRA, F. B. C.; CHAVES, F. B. Evolution of Sarcoma 180 in mice treated with hyperchlorinated water. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 78: 209-214, 1983.

PÉREZ-TOMÁS, R.; MONTANER, B.; LLAGOSTERA, E.; SOTO-CERRATO, V. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. **Biochemical Pharmacology**, 66: 1447-1452, 2003.

PERNAS, S.; GIL-GIL, M.; DE OLZA, M. O.; GUMÀ, A.; CLIMENT, F.; PETIT, A.; PLA, M. J.; GARCYÀ-TEJEDOR, A.; LÓPEZ-OJEDA, A.; FALO, C.; FERNANDEZ-OTEGA, A.; MESIA, C.; PÉREZ-MARTIN, F. J.; URRUTICOECHEA, A.; RAMON GERMA, J. Efficacy and safety of concurrent trastuzumab plus weekly paclitaxel-FEC as primary therapy for HER2-positive breast cancer in everyday clinical practice. **Breast Cancer Res. Treat.**, 134: 1161-1168, 2012.

PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; LEMOS, T. L.; WETMORE, L. A.; MORAES, M. O.; LEYVA, A. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil. **Phytother. Res.**, 14: 187-191, 2000.

PINKERTON, D. M.; BANWELL, M. G.; GARSON, M. J.; KUMAR, N.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; BARROS, F. W. A.; PESSOA, C. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Synthetically Derived Tambjamines C and E-J, BE-18591, and a Related Alkaloid from the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. **Chemistry & Biodiversity**, 7: 1311-1324, 2010.

PINKERTON, D. M.; BANWELL, M. G.; WILLIS, A. C. Total syntheses of tambjamines C, E, F, G, H, I and J, BE-18591, and related alkaloid from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. **Organic Letters**, 9: 5127-5130, 2007.

PINKERTON, D. M.; BANWELL, M. G.; WILLIS, A. C. Total Syntheses of Tambjamines C, E, F, G, H, I and J, BE-18591, and a Related Alkaloid from the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. **Organic Letters**, 9: 5127-5130, 2007.

POMMIER, Y. Finding the Interface: more than an image. **Cancer Biology & Therapy**, 6: 4, 2007.

POMMIER, Y.; POURQUIER, P.; URASAKI, Y.; WU, J.; LACO, G. Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance. **Drug Resist. Updat.**, 2: 307-318, 1999.

POMMIER, Y.; SCHWARTZ, R. E.; KOHN, K. W.; ZWELLING, L. A. Formation and rejoining of deoxyribonucleic acid double-strand breaks induced in isolated cell nuclei by antineoplastic intercalating agents. **Biochemistry**, 23: 3194-3201, 1984.

POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H. L.; MARCHAND, C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. **Chemistry & Biology**, 17: 421-433, 2010.

RAUSCH, O. High content cellular screening. **Current Opinion in Chemical Biology**, 10: 316-320, 2006.

- REID, R. J. D.; BENEDETTI, P.; BJORNSTI, M-A. Yeast as a model organism or studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1400: 289-300, 1998.
- RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ed. ULBRA, 356p., 2003.
- RICCI, M. S.; ZONG, W-X. Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. **Oncologist**, 1: 342-357, 2006.
- SAIF, M. W. Secondary hepatic resection as a therapeutic goal in advanced colorectal cancer. **World. J. Gastroenterol**, 15: 3855-3864, 2009.
- SALERNO, S.; DA SETTIMO, F.; TALIANI, S.; SIMORINI, F.; LA MOTTA, C.; FORNACIARI, G.; MARINI, A. M. Recent advances in the development of dual topoisomerase I and II inhibitors as anticancer drugs. **Curr. Med. Chem.**, 17: 4270-4290, 2010.
- SALMON, S. E. Human tumor colony assay and chemosensitivity testing. **Cancer Treat. Rep.**, 68: 117-125, 1984.
- SCHABEL, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacol. Ther.**, 1: 411 - 435, 1977.
- SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutat. Res.**, 31: 9-15, 1975.
- SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutat. Res.**, 31: 9-15, 1975.
- SCHOEFFLER, A. J.; BERGER, J. M. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. **Q. Rev. Biophys**, 41: 41-101, 2008.
- SCHWARTSMANN, G.; WORKMAN, P. Anticancer drug screening and discovery in the 1990s: a European perspective. **Eur. J. Cancer**, 29: 3-14, 1993.
- SHAPIRO, H. M. Overture. In: SHAPIRO, H. M. (Org.). **Practical Flow Cytometry**. 3. ed. New York: Wiley-Liss, 1995.p. 1-32.
- SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicologia**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A. Single technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, 175: 184-191, 1988.

SLAMON, D. J.; GODOLPHIN, W.; JONES, L. A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**, 244: 707-712, 1989.

SLAMON, D. J.; LEYLAND-JONES, B.; SHAK, S.; FUCHS, H.; PATON, V.; BAJA-MONDE, A.; FLEMING, T.; EIERMANN, W.; WOLTER, J.; PEGRAM, M.; BASELGA, J.; NORTON, L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that over expresses HER2. **N. Engl. J. Med.**, 344: 783-792, 2001.

SORDET, O.; KHAN, Q. A.; KOHN, K. W.; POMMIER, Y. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. **Curr. Med. Chem. Anticancer Agents**, 3: 271-290, 2003.

SORTIBRÁN, A. N. C., TÉLLEZ, M. G. O., RODRÍGUEZ-ARNAIZ, R. R. Genotoxic profile of inhibitors of topoisomerase I (camptothecin) and II (etoposide) in a mitotic recombination and sex-chromosome loss somatic eye assay of *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.**, 604: 83-90, 2006.

SOTO-CERRATO, V.; VIÑALS, F.; LAMBERT, J. R.; PÉREZ-TOMÁS, R. The anticancer agent prodigiosin induces p21WAF1/CIP1 expression via transforming growth factor-beta receptor pathway. **Biochemical Pharmacology**, 74: 1340-1349, 2007.

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

TANIGAKIA, K.; SATOA, T.; TANAKAA, Y.; OCHIA, T.; NISHIKAWAA, A.; NAGAIB, K.; KAWASHIMAC, H.; OHKUMAA, S. BE-18591 as a new H_p/Cl₃ symport ionophore that inhibits immunoproliferation and gastritis. **FEBS Letters**, 524: 37-42, 2002.

TEWEY, K. M.; CHEN, G. L.; NELSON, E. M.; LIU, L. F. Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. **J. Biol. Chem.**, 259: 9182-9187, 1984.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, 281: 1312-1316, 1998.

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. Mutag.**, 35: 206-221, 2000.

TINARI, A.; GIAMMARIOLI, A. M.; MANGANELLI, V.; CIARLO, L.; MALORNI, W. Analyzing morphological and ultrastructural features in cell death. **Methods in Enzymol.**, 442: 1-26, 2008.

TUDURI, S.; CRABBE, L.; CONTI, C.; TOURRIERE, H.; HOLTGREVE-GREZ, H.; JAUCH, A.; PANTESCO, V.; DE VOS, J.; THOMAS, A.; THEILLET, C. Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. **Nat. Cell Biol.**, 11: 1315-1324, 2009.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. **Anat. Histol. Embryol.**, 31: 214-223, 2002.

VENTER, D. J.; TUZI, N. L.; KUMAR, S.; GULLICK, W. J. Overexpression of the protein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. **Lancet**, 2: 69-72, 1987.

VERHAGEN, A. M.; EKERT, P. G.; PAKUSCH, M.; John Silke, J.; CONNOLLY, L. M.; REID, G. E.; MORITZ, R. L.; SIMPSON, R. J.; VAUX, D. L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell**, 2: 43-53, 2000.

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. Immun. Meth.**, 184: 39-51, 1995.

- 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. Immun. Meth.**, 184: 39-51, 1995.
- WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: discovery to clinic- Thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. **Cancer Res.**, 55: 75-760, 1995.
- WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOKE, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T.; SLIM, G. A. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal eukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **J. Am. Chem. Soc.**, 88: 3888-3890, 1966.
- WANG, J. C. *Untangling the Double Helix* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 2009.
- WAYNFORTH, B. H. **Injection Techniques: Experimental and Surgical Techniques in the Rat**. London: Academic Press, 1980. 61 p.
- WEI, M. C.; ZONG, W. X.; CHENG, E. H. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, 292: 727-730, 2001.
- WEISS, R. B. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? **Seminars Oncol.**, 19: 670-686, 1992.
- WREDE, F.; ROTHASS, A. Uber das prodigiosin, den roten farbstoff des *Bacillus prodigiosus*. **Hoppe Seyler's Z. Chem. Ber.**, 226: 95, 1934.
- WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. R.; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, 68: 251-306, 1980.
- YAP, T. A.; GARRETT, M. D.; WAL-TON, M. I.; RAYNAUD, F.; DE BONO, J. S.; WORKMAN, P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. **Curr. Opin. Pharmacol.**, 8: 393-412, 2008.
- YUAN, T. L., CANTLEY, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. **Oncogene**, 27: 5497-5510, 2008.

ZAMAGNI, C.; MARTONI, A.; CACCIARI, N.; GENTILE, A.; PANNUTI, F. The combination of paclitaxel and carboplatin as Wrst-line chemotherapy in patients with stage III and stage IV ovarian cancer: a phase I-II study. **Am. J. Clin. Oncol.**, 21: 491-497, 1998.

ZHANG, J-H.; ZHANG, Y.; HERMAN, B. Caspases, apoptosis and aging. **Ageing Research Reviews**, 2: 357-366, 2003.

ZIEGLER U.; GROSCURTH, P. Morphological features of Cell Death. **News Physiol. Sci.**, 19: 124-128, 2004.

ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, G. M., TORRES-BUGARÍN, O., ZAMORA-PEREZ, A. L., GÓMEZ-MEDA, B. C., RAMOS-IBARRA, M. L., GALLEGOS-ARREOLA, P., FLORES-GARCÍA, A., LÓPEZ-URIBE, A. Induction of micronucleated erythrocytes in mouse peripheral blood after cutaneous application of 5-fluorouracil. **Arch. Med. Res.**, 34: 141-144, 2003.

Anexos

ANEXO A: Trabalho publicado em 2010 na revista Chemistry & Biodiversity
Qualis B2) contendo parte dos resultados apresentados nesta tese.

**Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Synthetically Derived Tambjamines
C and E–J, BE-18591, and a Related Alkaloid from the Marine Bacterium
*Pseudoalteromonas tunicata***

by David M. Pinkerton¹⁾, Martin G. Banwell²⁾, Mary J. Garson³⁾, Naresh Kumar⁴⁾,
Manoel Odorico de Moraes⁴⁾, Bruno C. Cavalcanti⁴⁾, Francisco W. A. Barros⁴⁾, and Cláudia Pessoa⁴⁾

¹⁾ Research School of Chemistry, Institute of Advanced Studies, The Australian National University,
Canberra, ACT 0200, Australia (phone: + 61 2 6125 8200; fax: + 61 2 6125 8114;
e-mail: mgban@nic.anu.edu.au)

²⁾ School of Chemistry and Molecular Biosciences, The University of Queensland, St. Lucia, Qld 4072,
Australia

³⁾ School of Chemistry, The University of New South Wales, Sydney, NSW 2052, Australia

⁴⁾ Laboratório de Oncologia Experimental, Universidade Federal do Ceará, CEP 60430-270 Fortaleza,
CE, Brazil (phone: + 55 85 3366 8255; fax: + 55 85 3366 8333; e-mail: cpessoa@ufc.br)

In the first comprehensive biological assessment of the tambjamine class of marine alkaloids, synthetically derived samples of compounds 1–9 have been subjected to evaluation as antimicrobial agents and screened for their cytotoxic effects on various human cancer cell lines. Most were strongly active against the fungus *Malassezia furfur* (≥ amphotericin B) and showed considerable, but non-selective, antiproliferative activity against both human cancer and normal cell lines. Tambjamines I and J (6 and 7, resp.) displayed significant apoptosis-inducing effects.

1. Introduction. – Natural products continue to provide a rich source of new drugs [1] with those being isolated from organisms found in marine and freshwater environments becoming increasingly prominent in this regard [2]. For example, microorganisms, including those found in marine ecosystems, provide a remarkable array of biologically active metabolites¹⁾. In those instances where limited quantities of metabolites have been available from the natural source(s), chemical-synthesis techniques have often been deployed to address the problem of supply and thus providing sufficient material for extended biological evaluations [4]. It is rare, however, that such techniques have been used to deliver samples of almost every member of an entire class of natural product for the purpose of carrying out a comprehensive biological evaluation of the members of that class. Herein, therefore, we report such a case. Specifically, we describe the evaluation of synthetically derived samples of tambjamines 1–7, BE-18591 (8), and pyrrole 9 as antimicrobial and cytotoxic agents.

The tambjamines, which include the illustrated compounds 1–7, are a class of some ten alkaloids that have been isolated from various marine sources including bryozoans, nudibranchs, and ascidians [5]²⁾. In addition, the related alkaloids BE-18591 (8) [6]

¹⁾ See [3] and refs. cit. therein.

²⁾ See [5a] for tambjamines A–D, [5b] for tambjamines E and F, and [5c] for tambjamines G–J.

EXO B: Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE - UFC).



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 285/09

Fortaleza, 18 de setembro de 2009

Protocolo COMEPE nº 281/09

Pesquisador responsável: Franciso Washington Araújo Barros


Deptº./Serviço: Departamento de Fisiologia e Farmacologia/ UFC

Título do Projeto: "Isolamento de células mononucleares de sangue periférico humano para avaliar o efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico *in vitro* de produtos naturais sintéticos"

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 17 de setembro de 2009.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,


Dr. Fernando A. Fruto Bezerra
Conselheiro do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO C: Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA - UFC).

	<p>Universidade Federal do Ceará Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo Fortaleza-Ce Email secdff@ufc.br - Tel: (85) 3366.8331</p>
---	---

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o Projeto Intitulado

"Estudo Antitumoral Pre-clínico de Alcapône Sintético Tambjâmico J"

de responsabilidade do Pesquisador FRANCISCO WASHINGTON ARAUJO BARROS NEPOMUCENO
 deu entrada para ser avaliado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA),
 no Departamento de Fisiologia e Farmacologia, recebendo o protocolo nº 39/12 no
 dia 31/05/2012

Fortaleza 31/ Maio 2012


 p/ Secretária CEPA