

201 50. 39 897  
R 13279032.108  
12/05/08



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

GARDENIA CARMEN GADELHA MILITÃO

PROPRIEDADES ANTICÂNCER DE PTEROCARPANOS NATURAIS

TE 15.32 3.322  
M 588 p

Fortaleza

2007

**GARDENIA CARMEN GADELHA MILITÃO**

**PROPRIEDADES ANTICÂNCER DE PTEROCARPANOS NATURAIS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Veras Costa Lotufo**

**Fortaleza**

**2007**

M 588p Militão, Gardenia Carmen Gadelha

Propriedades anticâncer de pterocarpanos naturais/ Gardenia  
Carmen Gadelha Militão; Orient.: Leticia Veras Costa Lotufo.-  
Fortaleza,2007.

144f.: il

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará. Faculda-  
de de Medicina, 2007.

1. Pterocarpanos – farmacologia. 2 Ensaio de Medicamentos  
Antitumorais. 3 Neoplasias- quimioterapia I. Lotufo, Leticia  
Veras Costa (Orient.) II- Título.

CDD 615.323322

**GARDENIA CARMEN GADELHA MILITÃO**

**PROPRIEDADES ANTICÂNCER DE PTEROCARPANOS NATURAIS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

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

Aprovada em 06/12/2007

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Veras Costa Lotufo (Orientadora)**  
**Universidade Federal do Ceará**

---

**Prof. Dr. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro**  
**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

---

**Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho**  
**Universidade Estadual de Campinas**

---

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

---

**Ao Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro**  
**Universidade Federal do Ceará**



*Aos meus pais*

## AGRADECIMENTOS

À **Profª. Drª. Leticia Veras Costa-Lotuf**, pela orientação desse trabalho, pela amizade e por toda a ajuda fornecida no decorrer dos anos que estive no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

A **Profª. Drª. Cláudia do Ó Pessoa** pelo incentivo na realização desse trabalho, pela amizade e pela dedicação na busca por novos recursos para o Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

Ao **Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes** pelo reconhecimento do meu esforço na tentativa de desenvolver um bom trabalho, e pela contribuição à pesquisa no Laboratório de Oncologia Experimental, Universidade Federal do Ceará.

À **Profª. Drª. Gláucia Maria Machado Santelli** por ter me recebido muito bem no Laboratório de Biologia Celular da Universidade de São Paulo (USP) e por ter repassado todo o conhecimento com simplicidade, contribuindo para o desenvolver desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes** por ter me recebido muito bem no Laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP e pela ajuda na realização dos experimentos.

Ao **Professor Dr. Rui Curi** por ter me recebido muito bem no seu laboratório no Departamento de Fisiologia e Biofísica da USP e dessa forma ter contribuído para realização desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira**, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica na Universidade Federal do Ceará, por sempre estar disponível nos momentos que precisei e por toda a colaboração neste trabalho.

A **profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima**, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica na Universidade Federal do Ceará, pela colaboração neste trabalho.

A **Profª. Drª. Ana Paula Negreiro Nunes**, do Departamento de Clínica Odontológica na Universidade Federal do Ceará, pela realização das análises histopatológicas..

A **Marisa Paula Prado**, por toda ajuda nos experimentos e auxílio durante o período que estive em São Paulo.

A **Estela Hanauer Schaab**, pela ajuda nos experimentos e auxílio durante o período que estive em Ribeirão Preto.

Ao **Flávio Ponte**, pela contribuição nesse trabalho através do isolamento dos pterocarpanos.

Aos amigos **Paulo Michel Ferreira e Arinice de Menezes Costa** por todo o auxílio nos experimentos e nos momentos que precisei.

Aos técnicos **Silvana França** (por tudo que foi ensinado), **Luciana França, Adriano dos Santos, Maria de Fátima e José Carlos Tomaz** (pela ajuda na manipulação do HPLC).

Aos amigos do LOE: **Daniel Bezerra, Hemerson Magalhães, Alessandra de Sousa** (obrigada pela ajuda em Ribeirão Preto), **Andrew Nunes, Rakel Braga, Fernanda de Castro, Danilo Rocha, Ivana Dantas, Patrícia Marçal, Carla Sombra, Elthon Góes, Marne Vasconcellos, Raquel Montenegro, Márcio Roberto, José Roberto, Paula Jimenez, Cecília Carvalho, Bruno Cavalcanti, Diego Wilke, Washington Barros, Delano Marinho, Ana Jérсия, Hélio Nobre, Rômulo Feio e Patrícia Bonavides**, pela ajuda.

A **Aura Yda**, funcionária do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, que sempre esteve disposta a ajudar.

Aos meus pais, **José e Lúcia**, que se dedicaram a dar oportunidade aos filhos, e juntamente com meu irmão, **Weber**, formam minha família.

Às tias **Elodia, Marta e Vera** e primos **Tânia, Rachel e Rafael** que sempre estiveram mais próximas de mim e me deram apoio.

As amigas **Gláucia Porto e Deuzilene Cunha** que me auxiliaram no período que cheguei a Picos.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

**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**

**Instituto Claude Bernard - InCb**

## RESUMO

**Propriedades Anticâncer de Pterocarpanos naturais.** Tese de Doutorado. Autora: Gardenia Carmen Gadelha Militão. Orientadora: Profa. Dra. Leticia Veras Costa-Lotufo. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Os pterocarpanos apresentam um núcleo tetracíclico derivado do núcleo fundamental das isoflavanonas. O presente trabalho teve como objetivos principais avaliar a atividade antitumoral “in vivo” de pterocarpanos e realizar estudos de mecanismo de ação. A avaliação da citotoxicidade “in vitro” mostrou que todas as células tumorais tratadas com 2,3,9-trimetoxipteroarpano foram inibidas, já a linhagem normal, não foi afetada. As células mononucleadas do sangue periférico também mostraram-se resistentes ao tratamento. A citotoxicidade em células tumorais de dois derivados trimetoxilados de pterocarpanos, 3,9,10-trimetoxipterocarpano e 3,4,9-trimetoxipterocarpano também foi avaliada, e ambos não foram citotóxicos. Na tentativa de elucidar o mecanismo de ação citotóxica, a marcação para tubulina, actina, núcleo e lamina B foi realizada. As células MCF-7 tratadas com 2,3,9-trimetoxipterocarpano não apresentaram alteração nos microtúbulos da interfase e nem nos filamentos de actina, porém houve uma parada do ciclo celular na mitose em prometáfase. Grande número de células apresentou fusos mitóticos monopolares e outras células apresentavam fusos multipolares. A avaliação do conteúdo de DNA por citometria indicou que 2,3,9-trimetoxipterocarpano induz parada do ciclo em G2/M e que após 48 h de tratamento, além do bloqueio em G2/M o composto induz fragmentação do DNA. Tanto o ensaio de citometria de fluxo, quanto à análise morfológica mostrou que o tratamento por um curto período de tempo induz uma parada na mitose reversível. Já o tratamento prolongado causa formação de células multinucleadas e morte celular. Também verificou-se que o efeito antiproliferativo desse composto não está associado à inibição da topoisomerase I. A atividade antitumoral *in vivo* dos compostos 3,9-dimetoxipterocarpano e 2,3,9-trimetoxipterocarpano foi avaliada utilizando o modelo do Sarcoma 180. Apenas o composto 3,9-dimetoxipterocarpano reduziu a massa tumoral (27%). Através do ensaio de metabolização obteve-se um composto derivado do 2,3,9-trimetoxipterocarpano que não apresentou citotoxicidade “in vitro” contra células tumorais. Os ensaios indicam o potencial anticâncer do 2,3,9-trimetoxipterocarpano.

Palavras-chave: Pterocarpanos, ciclo celular, câncer, atividade antitumoral

## ABSTRACT

**Anticancer properties of naturally occurring pterocarpan.** PhD Thesis. Author: Gardenia Carmen Gadelha Militão. Advisor: Letícia Veras Costa-Lotufo, PhD. Fortaleza, November 30th, 2007. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Pterocarpan are compounds with a tetracyclic ring system derived from the basic isoflavonoid skeleton. The purpose of this study was to evaluate the antitumor activity of pterocarpan and investigate the mode of pharmacological action of these compounds. The compound 2,3,9-trimethoxypterocarpan showed cytotoxic activity against all tumor cell lines tested. Only L929, a normal cell line, was not affected ( $IC_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$ ). Peripheral blood mononucleated cells (PMBC) also seemed to be resistant to 2,3,9-trimethoxypterocarpan. The cytotoxicity of the two trimethoxylated pterocarpan derivatives, 3,9,10-trimethoxypterocarpan e 3,4,9-trimethoxypterocarpan, was also evaluated and neither of these reduced tumor cell count. In order to understand the mode of action of these pterocarpan, MCF-7 cytoskeleton was studied using immunofluorescence. After 24 hours, treated cells were arrested at prometaphase. Some of these cells presented a monoaster spindle while other presented a multiaster spindle. No morphological alterations in interphasic microtubules nor actin was observed after treatment with 2,3,9-trimethoxypterocarpan. The measurement of cellular DNA content using flow cytometry indicated that 2,3,9-trimethoxypterocarpan caused cell cycle arrest at G2/M after 24 h incubation. Most of the arrested cells re-entered cell cycle after an additional 24h-period of incubation in a drug-free medium, indicating that the effect is reversible. However, after 48h treatment, the subdiploid DNA content increased and morphological analysis revealed the presence of multinucleated cells. *In vitro* enzymatic assays demonstrated that the cytotoxic effect of this compound was not due to topoisomerase I inhibition. *In vivo* antitumor activity was assessed using the Sarcoma 180 model. Only 3,9-dimethoxypterocarpan caused 27 % of tumor growth inhibition. In order to verify whether hepatic metabolization was leading to pterocarpan inactivation, a synthetic metaloporphyrin model was used. The metabolite obtained from 2,3,9- trimethoxypterocarpan reactions was inactive against tumor cell lines. This study highlights the anticancer potential of 2,3,9-trimethoxypterocarpan.

Key words: pterocarpan, cell cycle, cancer, antitumor activity

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – A célula segue uma seqüência de eventos que é governada por fatores internos e externos chamada ciclo celular .....	20
<b>Figura 2</b> – A: Nível de ciclinas durante o ciclo celular; B: Progressão do ciclo celular de G1 para S.....	21
<b>Figura 3</b> – Parada do ciclo celular na transição G1/S.....	23
<b>Figura 4</b> – As fases da mitose.....	25
<b>Figura 5</b> - Estrutura química dos fármacos que atuam na mitose .....	27
<b>Figura 6</b> – Estruturas químicas do paclitaxel (1) e do docetaxel (2).....	29
<b>Figura 7</b> – Estruturas químicas da podofilotoxina (3), do etoposido (4) e do tenoposido (5).....	30
<b>Figura 8</b> – Estruturas químicas da camptotecina (6), topotecan (7) e Irinotecan (8)	31
<b>Figura 9</b> – Estruturas químicas da vincristina (9), da vimblastina (10) e da vinorelbina (11).....	32
<b>Figura 10</b> – Estrutura química da combrestatina A-4 (12).....	33
<b>Figura 11</b> – Biossíntese de algumas classes de flavonóides e isoflavonoides.....	34
<b>Figura 12</b> – Estrutura química dos pterocarpanos com atividade biológica.....	36
<b>Figura 13</b> – <i>Platymiscium Floribundum</i> .....	52
<b>Figura 14</b> – Estrutura química dos pterocarpanos 3,9,10-trimetoxipterocarpano (31) e 3,4,9-trimetoxipterocarpano (32).....	53
<b>Figura 15</b> – Efeito do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano na viabilidade de HL60, Molt-4, Jurkat e K562 .....	71
<b>Figura 16</b> – Atividade do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano e da doxorubicina na concentração de 10µg/mL em células mononucleadas do sangue periférico avaliada pela exclusão do azul de tripan.....	73
<b>Figura 17</b> – - Imunofluorescência para citoesqueleto em células MCF-7.....	76
<b>Figura 18</b> - Imagens de células MCF-7, T47D, HS58T e BRL3A incubadas com meio (controle) ou tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano na concentração de 2,5 µg/mL por 24h.....	80
<b>Figura 19</b> - Imagens da rede de microtúbulos (tubulina) de células MCF-7, T47D, HS58T e BRL3A incubadas com meio (controle) ou tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano .....	81

<b>Figura 20</b> - Imunofluorescência para lâmina B.....	84
<b>Figura 21</b> - Fotografias de células MCF-7 coradas com hematoxilina e eosina. A e D; controle, 24 e 48 h de incubação, respectivamente .....	86
<b>Figura 22</b> - Fotomicrografia de células MCF-7 vivas em microscópio de inversão.	90
<b>Figura 23</b> - Imagens de células MCF-7 coradas com Cy-5 (tubulina, azul), faloidina-FITC (actina, verde) e iodeto de propídeo (núcleo, vermelho) obtidas em microscópio confocal.....	90
<b>Figura 24</b> - Imagens de células MCF-7 incubadas com meio (controle) ou tratadas com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (2,5 µg/mL) na concentração de 2,5 µg/mL com marcação para o complexo de Golgi (vermelho) e para o núcleo (azul).....	92
<b>Figura 25</b> Avaliação da atividade do 2,3,9-trimetoxipterocarpano no relaxamento de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG), por eletroforese horizontal em gel de agarose 1 % .....	94
<b>Figura 26</b> - Massa tumoral úmida de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento.....	96
<b>Figura 27</b> - Análise histológica do fígado de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento.....	100
<b>Figura 28</b> - Análise histológica do rim de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento.....	101
<b>Figura 29</b> - Análise histológica do baço de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento.....	102
<b>Figura 30</b> - Análise histológica do tumor de camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento.....	103
<b>Figura 31</b> - Cromatograma obtido no CG/EM da reação com 3,9-dimetoxipterocarpano e do padrão.....	107
<b>Figura 32</b> - Espectro de massa obtido no GC/EM da reação com 3,9-dimetoxipterocarpano e do padrão .....	108



- Figura 33** - Cromatograma obtido no CG/EM. da reação com 2,3,9-dimetoxipterocarpano e do padrão..... 109
- Figura 34** - Espectro de massa obtido no GC/EM. A: Espectro de massa do pico com tempo de retenção em 29,75 obtido da amostra padrão. B: Espectro de massa obtido da biblioteca do CG/EM por comparação e similaridade ao espectro obtido no padrão. C: Espectro de massa do pico com tempo de retenção 28,36 min obtido da amostra reacional. D: Espectro de massa obtido da biblioteca do CG/EM por comparação e similaridade ao espectro obtido do pico 30,57 min da amostra reacional 110
- Figura 35** - Cromatograma do composto 2,3,9-dimetoxipterocarpano e da mistura reacional obtido no CLAE..... 111
- Figura 36** - Cromatograma obtido no CG/EM. A: cromatograma do pico com tempo de retenção 16,11 min coletado no HPLC, a seta indica o pico com tempo de retenção 30,58 min e  $m/z$  330. B: cromatograma do pico com tempo de retenção 18,57 min coletado no CLAE, a seta indica o pico com tempo de retenção 30,717 min e  $m/z$  330..... 112
- Figura 37** - Espectro de massa obtido no CG/EM. A: Espectro de massa do pico com tempo de retenção 30,58 min obtido após análise da fração 16,11 min coletada no HPLC. B: Espectro de massa do pico com tempo de retenção 30,72 min obtido após análise da fração 18,57 min coletada no CLAE..... 113
- Figura 38** - - Cromatograma e espectro de massa obtido no CG/EM. A: cromatograma da fração obtida após cromatografia em placa preparativa, o pico com tempo de renção em 30,62 apresenta  $m/z$  330. B: espectro de massa do pico com tempo de retenção de 30,62 min..... 114

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade *in vitro* 48
- Tabela 2** – Atividade citotóxica do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano e da doxorubicina em linhagens de células tumorais. 70
- Tabela 3** – Citotoxicidade do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano em células leucêmicas. 72
- Tabela 4** – Índice de fases em células MCF-7 tratadas por 24 h com os compostos 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27), 3,9-dimetoxipterocarpano (28), 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (13), 3-4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (30) e 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (29). 78
- Tabela 5** – Índice de fases em células tumorais tratadas por 24 h com os composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano na concentração de 2,5 µg/mL. 82
- Tabela 6** – Análise do ciclo celular por citometria de fluxo. As células MCF-7 foram tratadas com o 2,3,9-trimetoxipterocarpano (2.5 µg/mL) por 24 h e 48 h, lavadas (l) e reincubadas (r) por 24h em meio livre de droga. • 88
- Tabela 7** – Efeito sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento com 2,3,9-trimetoxipterocarpano nas doses de 10 e 25 mg/kg/dia e 3,9-dimetoxipterocarpano na dose de 50 mg/kg/dia. 99

## ABREVIATURAS

<b>CG/EM</b>	Cromatógrafo a Gás Acoplado ao Espectro de Massa
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração Inibitória Média
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>E.P.M.</b>	Erro Padrão da Média
<b>HE</b>	Hematoxilina/Eosina
<b>MeP</b>	Metaloporfirina
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RPMI</b>	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
<b>UV</b>	Ultra-Violeta
<b>Ip</b>	Via Intraperitoneal
<b>5-FU</b>	5-Fluorouracil

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Câncer.....	18
1.2. Ciclo celular.....	19
1.3. Produtos Naturais como fontes de drogas antitumorais.....	27
1.4. Pterocarpanos.....	34
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. Geral .....	41
2.2. Específicos.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1. Materiais Utilizados.....	42
3.1.1 Equipamentos.....	42
3.1.2 Soluções, reagentes e fármacos.....	43
3.1.3 Modelos biológicos.....	48
3.2 Metodologia experimental .....	50
3.2.1 Obtenção dos pterocarpanos (13, 27, 28, 29, 30) de <i>Platymiscium floribundum</i> .....	50
3.2.2. Obtenção de derivados dos pterocarpanos .....	52
3.2.3. Estudo da atividade citotóxica dos pterocarpanos .....	54
3.2.3.1 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais e célula normal <i>in vitro</i> .....	54
3.2.3.2 Avaliação da atividade antileucêmica .....	55
3.2.3.3 Avaliação da atividade antiproliferativa em células mononucleadas do sangue periférico .....	56
3.2.4 Estudo do mecanismo de ação .....	56

3.2.4.1	Imunofluorescência para citoesqueleto .....	56
3.2.4.2	Índice de fases .....	57
3.2.4.3	Imunofluorescência para citoesqueleto e determinação do índice de fases num painel de três linhagens tumorais e uma linhagem normal .....	58
3.2.4.4	Imunofluorescência para lamina B.....	59
3.2.4.5	Avaliação do efeito da droga tempo-dependente através da análise morfológica .....	59
3.2.4.6	Análise do ciclo celular por citometria de fluxo .....	60
3.2.4.7	Análise das células mitóticas após um curto tratamento com a droga ..	61
3.2.4.8	Posicionamento do Complexo de Golgi em células MCF7.....	61
3.2.4.9	Ensaio de relaxamento do DNA .....	62
3.2.5	Estudo da atividade antitumoral de pterocarpanos em camindongos transplantedos com Sarcoma 180 .....	63
3.2.5.1	Análise Histopatológica .....	65
3.2.6	Estudo da metabolização do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) <i>in vitro</i> .....	65
3.2.6.1	Reação de metabolismo oxidativo <i>in vitro</i> : reações de oxidação biomiméticas catalisadas por metaloporfirina sintética .....	65
3.2.6.2	Análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM) .....	66
3.2.6.3	Separação por CLAE .....	66
3.2.6.4	Purificação por cromatografia em camada delgada .....	66
4-	RESULTADOS.....	68
4.1.	Estudo da atividade citotóxica dos pterocarpanos.....	68
4.1.1	Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais e célula normal <i>in vitro</i> .....	68
4.1.2	Avaliação da atividade antileucêmica .....	52
4.1.3	Avaliação da atividade antiproliferativa em células mononucleadas do sangue periférico .....	73
4.2	Estudo do mecanismo de ação .....	74
4.2.1	Imunofluorescência para citoesqueleto .....	74
4.2.2	Índice de fases .....	77
4.2.3	Imunofluorescência para citoesqueleto e determinação do índice de	

fases num painel de três linhagens tumorais e uma linhagem normal .....	79
4.2.4 Imunofluorescência para lamina B.....	83
4.2.5 Avaliação do efeito da droga tempo-dependente através da análise morfológica .....	85
4.2.6 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo .....	87
4.2.7 Análise das células mitóticas após um curto tratamento com o fármaco..	89
4.2.8 Posicionamento do Complexo de Golgi em células MCF7.....	91
4.2.9 Ensaio de relaxamento do DNA .....	93
4.3 Estudo da atividade antitumoral de pterocarpanos em camindongos transplantados com Sarcoma 180 .....	95
4.3.1 Análise Histopatológica dos órgãos.....	97
4.4 Reação de metabolismo oxidativo in vitro: reações de oxidação biomiméticas catalisadas por metaloporfirina sintética .....	104
5. DISCUSSÃO.....	115
6. CONCLUSÃO.....	134
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135

# 1. Introdução

## 1.1. Câncer

As células do câncer possuem defeitos nos mecanismos que governam a proliferação normal. Entre as características do tumor maligno estão a auto-suficiência da sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade a inibidores do crescimento, inibição da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese, poder de invasão e capacidade de metastizar-se (Hanahan & Weinberg, 2000). Essas características não surgem simplesmente através de um processo de crescimento descontrolado, mas sim através de um processo de evolução celular desencadeado por alterações genéticas (Hartwell & Castan, 1994).

Em última instância, pode-se afirmar que o câncer é uma doença genética onde há um acúmulo de mutações principalmente nos proto-oncogenes e nos genes supressores de tumor (Foster, 2007). Os proto-oncogenes promovem a proliferação ordenada enquanto os genes supressores de tumor mantêm essa proliferação sob controle, restringindo o crescimento celular. O mau funcionamento dos mecanismos de regulação do ciclo celular permite a passagem das células mutadas pelo ciclo, acumulando mutações que contribuem para o surgimento das características do tumor maligno (Foster, 2007; Louro *et al.*, 2002).

Atualmente nos Estados Unidos uma em cada quatro mortes é devido ao câncer, e em 2007 está previsto 1.444.920 novos casos de câncer e 559.650 mortes (Jemal *et al.* 2007). No Brasil as neoplasias malignas vêm aumentando à medida que ocorre o controle progressivo de outras doenças e o conseqüente envelhecimento populacional. O número de internações por neoplasias malignas (CID 10-II 058-089) de junho/2006 a maio/2007 no Sistema Único de Saúde do Brasil foi de 425.610 com o valor total das

autorizações de internação hospitalar pagas em R\$ 393.559.087,54 e 37.863 óbitos nesse mesmo período (Datasus, 2007).

Em 2008 são esperados 231.860 novos casos de câncer para o sexo masculino e 234.870 para sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (115 mil casos novos) terá maior incidência na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (49 mil), mama feminina (49 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (27 mil), estômago (22 mil) e colo do útero (19 mil). Os tumores mais incidentes para o sexo masculino serão devidos ao câncer de pele não melanoma (56 mil casos novos), próstata (49 mil), pulmão (18 mil), estômago (14 mil) e cólon e reto (12 mil). Para o sexo feminino, destacam-se os tumores de pele não melanoma (59 mil casos novos), mama (49 mil), colo do útero (19 mil), cólon e reto (14 mil) e pulmão (9 mil) (INCA, 2007).

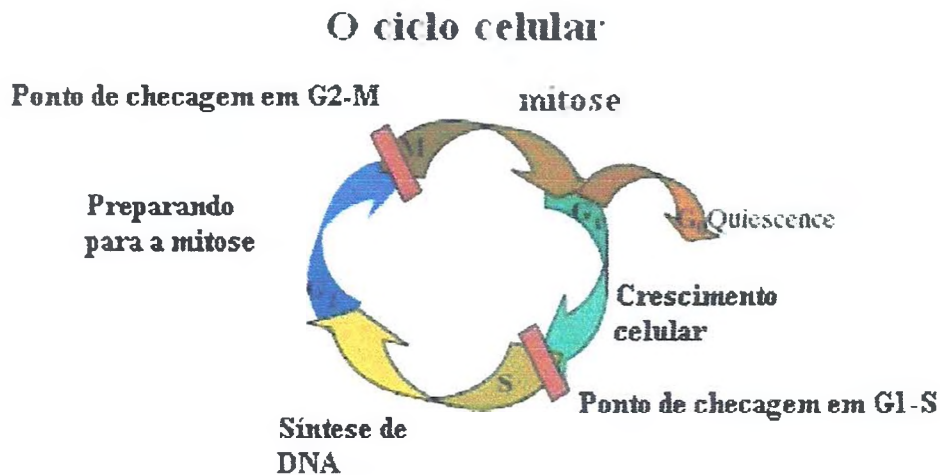
## **1.2. Ciclo celular**

O ciclo celular é uma seqüência de eventos a qual permite que as células cresçam e se dividam. O estímulo para o crescimento começa com a liberação de fatores de crescimento, os quais se ligam a receptores na membrana da célula e desencadeiam a liberação de fatores de transcrição. Essa seqüência de eventos impulsiona a célula pelo ciclo celular (Foster, 2007).

As células que irão replicar movem-se da fase G<sub>0</sub> (célula em repouso) para a fase G<sub>1</sub>, onde tem início a síntese de RNA e proteínas. O balanço entre sinais proliferativos e de inibição da proliferação em G<sub>1</sub> irão determinar se o ciclo vai progredir para a fase S, onde se inicia a replicação ou síntese do DNA. A fase S é seguida por G<sub>2</sub>, onde as células se preparam para entrar na mitose e se dividir. O ciclo celular também apresenta sistemas de vigilância chamados pontos de verificação



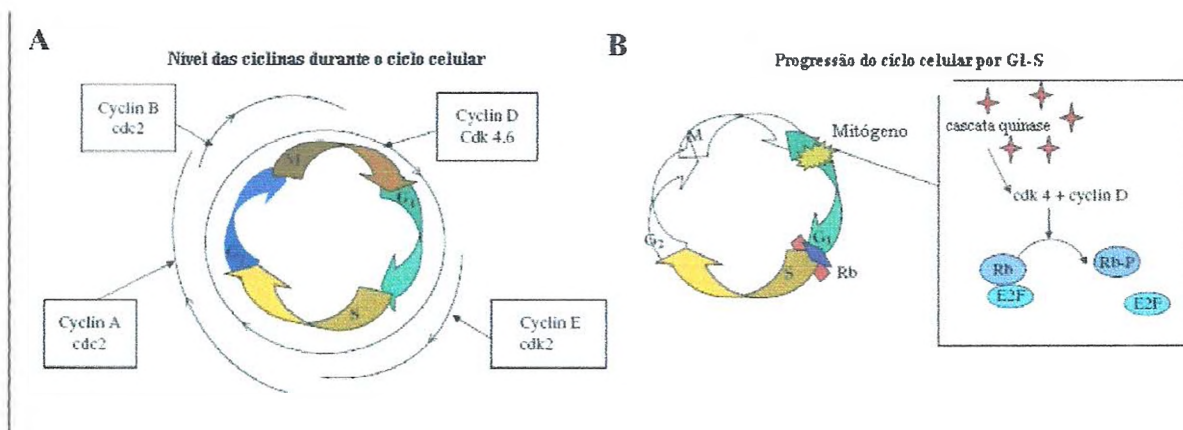
(checkpoints) que desempenham papel importante na manutenção da integridade do genoma (Foster, 2007; Louro *et al.*, 2002) (figura 1).



**Figura 1** - A célula segue uma seqüência de eventos que é governada por fatores internos e externos chamada ciclo celular. Na fase G1 ocorre o crescimento celular, após a passagem pelo primeiro ponto de checagem entre G1 e S a célula começa a sintetizar DNA que resulta na duplicação do conteúdo de DNA. Em G2 a célula se prepara para entrar na mitose onde ocorre a divisão em duas células idênticas. (Fonte: Foster, 2007)

A fosforilação de uma série de substratos por membros da família das quinases dependentes de ciclina (CDK) promove a progressão através de cada fase do ciclo celular. Cada CDK é dependente de uma ciclina, portanto a atividade de cada CDK é regulada pelos níveis da sua ciclina e também pela expressão de inibidores da CDK (Nakayama, 2006). O estímulo para o crescimento é recebido pela célula no início de G1 resultando no aumento dos níveis de ciclina D, seguido de um aumento nos níveis de ciclina E. O complexo ciclina D/cdk4 fosforila a proteína Rb que é codificada por um

gene supressor de tumor. A proteína Rb se liga a fatores de transcrição pertencentes à família E2F, inativando-os. Quando fosforilada a proteína Rb libera E2F para seu estado ativo promovendo a transcrição de genes necessários à entrada na fase S (Figura 2) (Marx, 1994; Louro *et al.*, 2002; Foster, 2007).



**Figura 2** – A: Nível de ciclinas durante o ciclo celular. Os níveis de ciclina D aumentam no começo da fase G1 e permanecem constantes no resto do ciclo. Na transição G1-S os níveis de ciclina E estão elevados, já na transição S - G2 a ciclina A está presente. A ciclina B surge na transição G2 - M. B: Progressão do ciclo celular de G1 para S. A sinalização por mitógenos desencadeia a cascata ras quinase que aumenta os níveis de ciclina D que se liga a cdK4. O complexo ciclina D/Cdk4 fosforila Rb, liberando o fator de transcrição E2-F que promove a transcrição de genes necessários à entrada na fase S (Fonte: Foster, 2007).

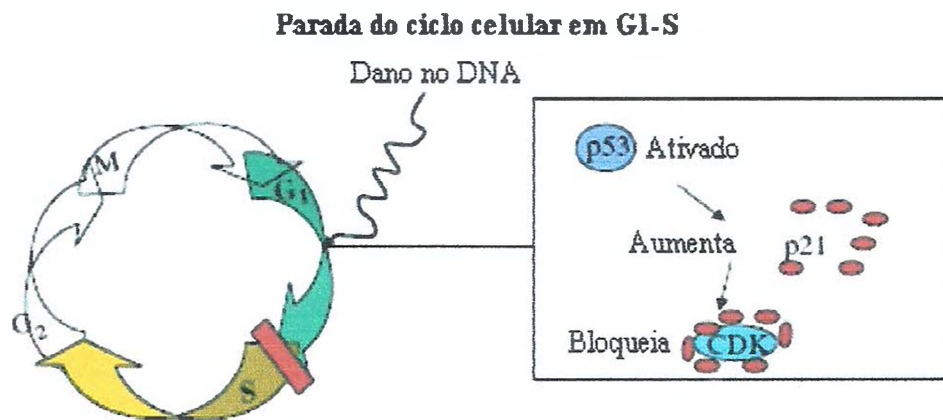
Os mecanismos descritos na figura 2 estão desordenados nas células do câncer. O gene da ciclina D está amplificado e produzindo uma maior quantidade dessa proteína em câncer esofágico e em câncer de mama (Marx, 1994). O oncogene PRAD1 é resultado de um rearranjo genético, identificado nos carcinomas de paratireóide, no qual se encontra superexpresso e tem como produto a ciclina D. A expressão excessiva de ciclina D encurta a fase G1, diminuindo parcialmente a demanda por mitógenos para a

proliferação celular (Louro *et al.*, 2002). A produção de ciclina E também está aumentada em uma grande variedade de cânceres, incluindo o câncer de pulmão, colón e de ovário (Marx, 1994). Os genes das quinases dependentes de ciclina também sofrem mutações. O gene da Cdk4 está frequentemente amplificado em alguns cânceres (Foster, 2007).

A perda ou inativação dos genes supressores de tumor também leva ao câncer. A proteína Rb que regula o ciclo celular encontra-se desativada em retinoblastomas e em vários outros tumores humanos (Louro *et al.*, 2002). O retinoblastoma é um tumor maligno, com aparecimento na infância, localizado nas células sensoriais da retina. Mutações afetando os dois alelos do gene supressor de tumor (RB1) é pré-requisito para o desenvolvimento desse tumor (Louro *et al.*, 2002; Vidal & Koff, 2000).

As proteínas p15 e p16 que são inibidoras específicas de cdk4 e cdk6 e dos complexos ciclina-D-cdk4/6 encontram-se com frequência deletadas em tumores primários (Louro *et al.*, 2002). A supressão da expressão de p16, juntamente com a perda do gene p53, acelera o crescimento e causa transformação das células humanas (Voorhoeve & Agami, 2003).

TP53 é um gene supressor de tumor que codifica a proteína p53. A perda ou mutação do TP53 está associada com o aumento da susceptibilidade ao câncer (Vousden & Lane, 2007). Hipóxia, privação de nutrientes e dano no DNA podem ativar p53 resultando em parada do ciclo celular, reparo do DNA ou morte celular. A proteína p53 responde ao dano no DNA aumentando a transcrição da proteína p21, um inibidor das cdk's causando parada do ciclo celular em G1 (Vidal & Koff, 2000; Tyteca *et al.*, 2006) (Figura 3).



**Figura 3** – Parada do ciclo celular na transição G1/S. O dano no DNA eleva os níveis de p53, este por sua vez, aumenta a transcrição de p21, um inibidor da cdK. A inibição da cdk impede a sua ligação com a Ciclina D evitando dessa forma a transcrição de genes essenciais à progressão do ciclo, causando parada do ciclo celular (Fonte: Foster, 2007).

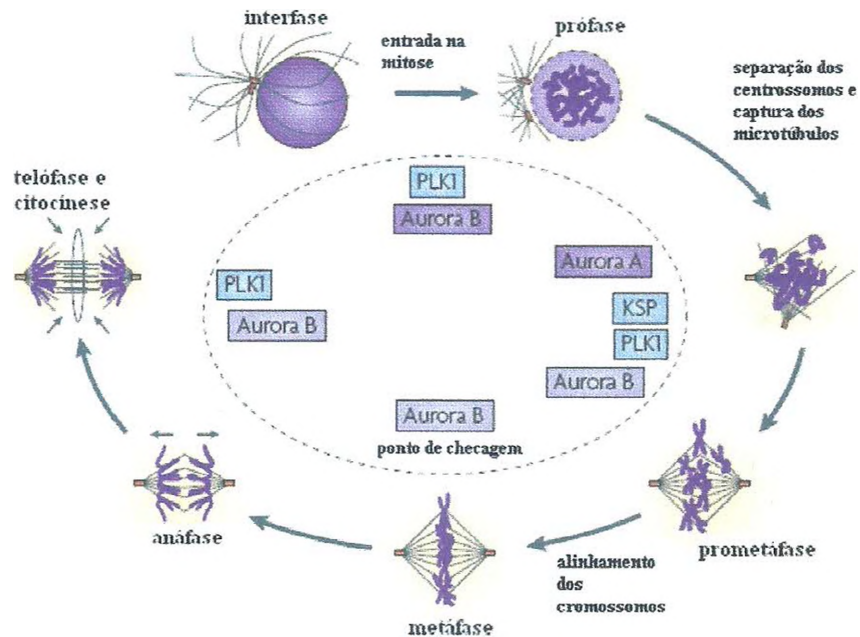
A ativação de p53 mediada pelo dano no DNA pode levar a morte celular programada ou apoptose. A apoptose é caracterizada por uma série de alterações morfológicas das células: diminuição do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação dos corpos apoptóticos o qual consiste em organelas celulares e/ou material nuclear envolvido pela membrana plasmática. (Cruchten & Broeck, 2002). A maioria das características morfológicas encontradas na apoptose é resultado da ativação de proteases denominadas caspases (Hengartner, 2000). Todas as células contêm caspases estando presente na forma inativa ou pró-caspases (Cruchten & Broeck, 2002). Existem dois mecanismos bem estudados sobre a ativação de caspases: um mecanismo via receptor, o qual ativa a caspase-8 e outro mecanismo via mitocôndria que ativa caspase-9. Ambos mecanismos resultam na ativação de caspase-3, um executor da apoptose (Hengartner, 2000; Cruchten & Broeck, 2002). A acetilação do p53 no seu domínio de ligação ao DNA é o passo decisivo para a escolha entre a

parada do ciclo celular e a apoptose frente a um dano no DNA (Tyteca *et al.*, 2006). Na presença de pouco dano ao DNA, p53 está desacetilado e induz parada do ciclo celular via ativação de p21. O aumento do dano ao DNA induz acetilação do p53 que reduz a transcrição de p21 e ativa a transcrição de genes pró-apoptóticos (Tyteca *et al.*, 2006).

A proteína p53 também previne a passagem de células da fase G2 para a mitose em células com dano no DNA através da inibição da cdks, e da indução da transcrição do gene 14-3-3 $\sigma$  o qual inibe a entrada em G2 (Chan *et al.*, 1999; Foster 2007). O 14-3-3 $\sigma$  se combina com cdc25 no citoplasma inibindo sua entrada no núcleo levando a parada do ciclo. Cdc25 é uma fosfatase essencial para ativação do complexo ciclinaB-CDK1 que estimula a entrada da célula na mitose (Chan *et al.*, 1999; Foster 2007). Dessa forma existe um eficiente mecanismo de controle, antes da mitose, prevenindo o dano genético nas células, porém esses mecanismos estão inativados em muitos tipos de câncer, levando ao acúmulo de mutações que influencia na transformação das células.

A mitose é tradicionalmente subdividida em cinco fases morfológicamente distintas: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase. Na prófase, a condensação dos cromossomos se inicia, os centrossomos duplicados se separam e algumas proteínas do ponto de checagem da mitose, como BUB1 e BUBR1 se acumulam nos cinetócoros. Com a quebra do envelope nuclear na prometáfase os cromossomos se espalham no citoplasma e o ponto de checagem da mitose é ativado em cada cinetócoro livre. Os microtúbulos são capturados por ambos os cinetócoros do par de cromátides alinhando os cromossomos na placa metafásica e silenciando o ponto de checagem. Durante a anáfase ocorre separação das cromátides irmãs. Enquanto a citocinese é completada na telófase a cromatina se descondensa e o envelope nuclear se reestrutura (Kops *et al.*, 2005) (Figura 4).





**Figura 4** – As fases da mitose. A progressão através dos estágios morfológicos da mitose está sendo mostrada. A quinase mitótica (KSP) é necessária para a formação do fuso bipolar gerada através da separação dos centríolos. Aurora A é necessária para a maturação do centríolo e formação do fuso bipolar no começo da prófase. Aurora B está envolvida na condensação dos cromossomos, no alinhamento dos cromossomos na placa metafásica, no ponto de checagem da mitose e na citocinese. Na mitose a polo quinase (PLK1) participa da entrada da célula na mitose, maturação dos centríolos, separação das cromátides irmãs e citocinese (Fonte: Jackson *et al.*, 2007).

Nos últimos anos vários componentes reguladores da mitose têm sido identificados. Até agora as moléculas regulatórias envolvidas na progressão através da mitose mais estudadas são as quinases da família da Polo, Bub e Aurora (Wood *et al.*, 2001). Para entrar na mitose a quinase-dependente-de-Ciclina 1 (CDK-1) deve ser ativada através da remoção de grupos fosfato pela enzima CDC25C e se ligar a Ciclina B1, formando o complexo CDK1/CiclinaB. Polo quinase 1 (PLK1), uma serina/treonina quinase da família da Pólo, ativa CDC25C e também fosforila ciclina B1, resultando em entrada do núcleo e ligação a CDK1 (Jackson *et al.*, 2007). PLK1 também participa da

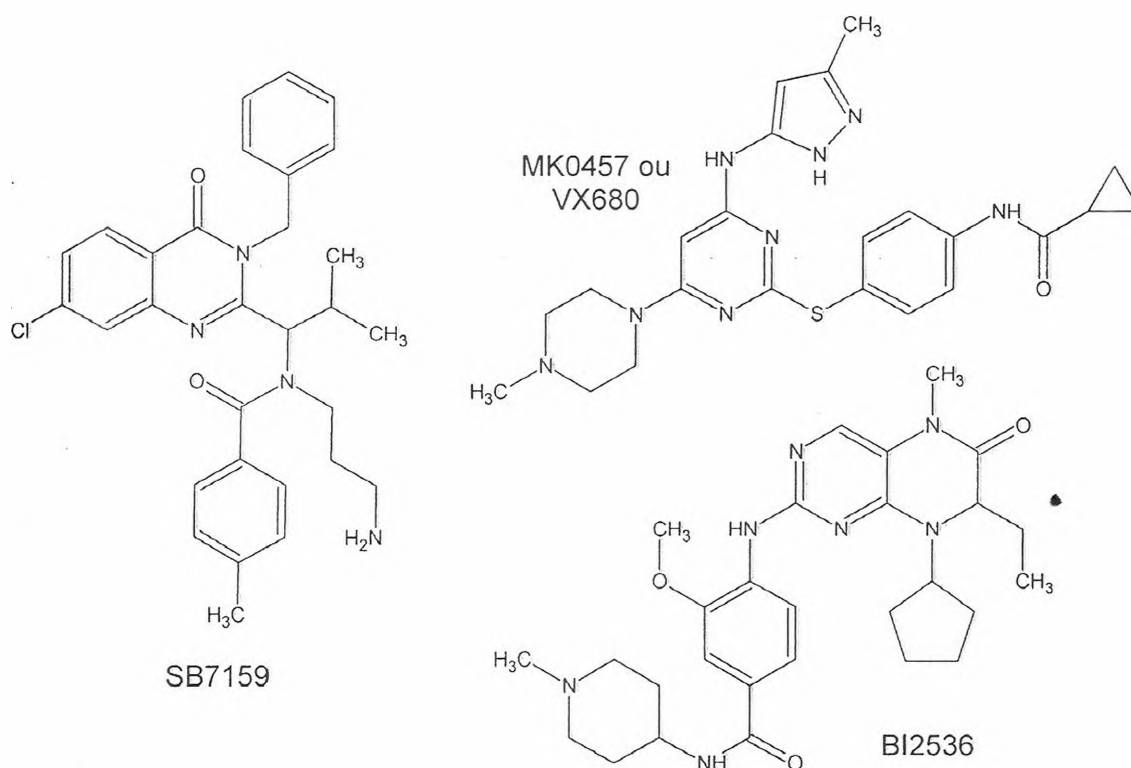
maturação e separação dos centrossomos, na separação das cromátides irmãs e na citocinese. Superexpressão da PLK1 parece estar associada com o câncer (Jackson *et al.*, 2007). A Inibição da PLK1 em várias linhagens por pequenas moléculas como BI 2536 resulta em parada na mitose e conseqüente apoptose (Lenart *et al.*, 2007).

Outra quinase envolvida na mitose pertence à família da Aurora. Os membros da família da Aurora nas células dos mamíferos são Aurora A, B e C. A aurora A é essencial para a maturação e separação dos centrossomos durante a prófase, enquanto que a Aurora B está envolvida na condensação dos cromossomos, no alinhamento dos cromossomos na placa metafásica, no ponto de checagem da mitose e na citocinese. As funções da Aurora C ainda não foram bem esclarecidas (Jackson *et al.*, 2007).

Ambos os reguladores da mitose descritos acima estão envolvidos na ordenação correta dos eventos dentro da mitose. O fuso mitótico regula os aspectos mecânicos da mitose sendo este formado por microtúbulos e muitas outras proteínas que participam na formação do fuso bipolar e na progressão da célula através da mitose (Wood *et al.*, 2001). Os microtúbulos são polímeros de  $\alpha$  e  $\beta$ - tubulina que compõem o citoesqueleto da célula e além de participar na mitose, tem papel importante na manutenção da forma da célula e no transporte de vesículas através da célula (Jordan & Wilson, 2004). As proteínas motoras pertencentes à família das quinesinas são exemplos de outros componentes do fuso que atuam junto aos microtúbulos. Quinesina mitótica (KSP) ou EG5, por exemplo, é uma proteína motora pertencente ao subgrupo da kinesina-5 que participa da separação dos centrossomos e formação do fuso bipolar (Tao *et al.*, 2005). A expressão do mRNA do KSP está aumentada em células em divisão comparada com células que não estão proliferando e ocorre superexpressão em tecido tumoral comparado com o tecido normal adjacente (Tao *et al.*, 2005). Inibição da KSP causa

parada do ciclo celular na mitose com formação do fuso mitótico monopolar (Mayer *et al.*, 1999; Tao *et al.*, 2005).

O conhecimento sobre as proteínas com funções específicas na mitose tem contribuído para o estudo de compostos com atividade antiproliferativa que tem como alvo farmacológico a Polo quinase, a Aurora quinase e a quinesina mitótica KSP (Tao *et al.*, 2005). Alguns candidatos a fármacos já estão em estudo clínico como o SB-715992, um inibidor da KSP, BI 2536, um inibidor da Polo quinase e MK-0457 (VX680), um inibidor da Aurora A, B e C (Schmidt & Bastians, 2007) (Figura 5).



**Figura 5** – Estrutura química dos fármacos que atuam na mitose, SB7159, MK0457 e BI2536.

### 1.3. Produtos Naturais como fonte de fármacos antitumorais

Os compostos derivados de plantas tem sido uma fonte de moléculas clinicamente úteis no tratamento do câncer (Cragg & Newman, 2005). Entre essas moléculas estão a vimblastina, vincristina, os derivados da camptotecina, topotecan e

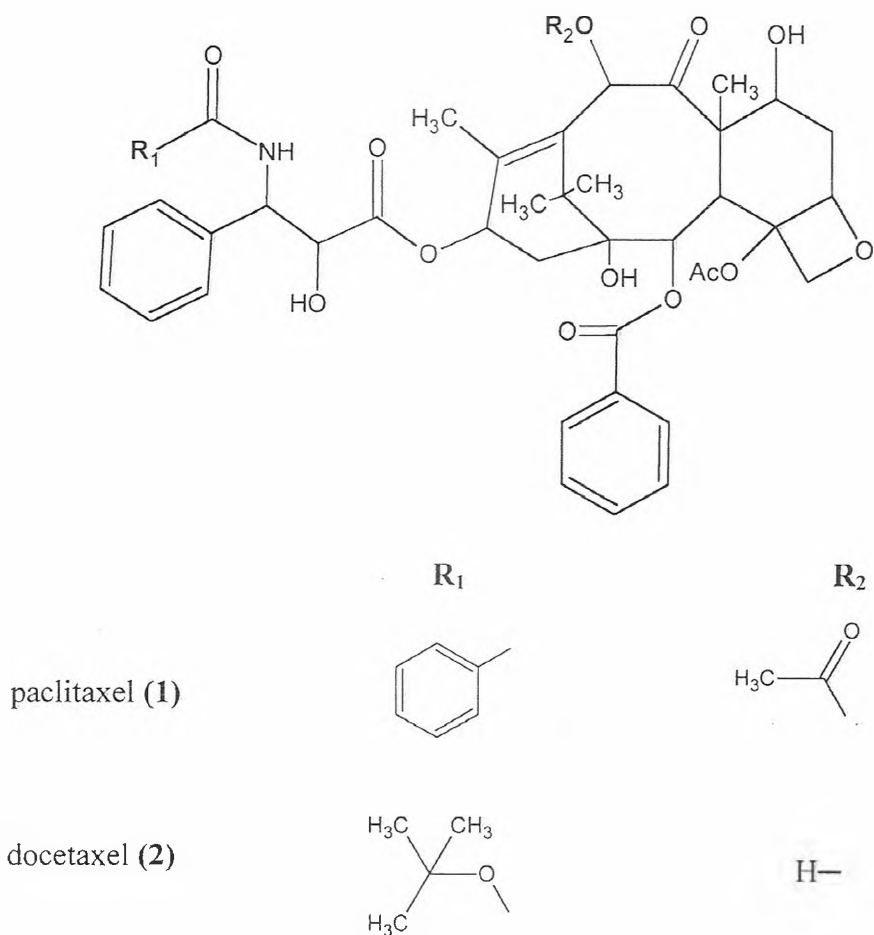


irinotecan, etoposido derivado da podofilotoxina e o paclitaxel (Taxol®) (Cragg & Newman, 2005).

O paclitaxel (1) foi primeiramente isolado da *Taxus brevifolia*, na década de sessenta como um agente citotóxico, sendo descoberto depois que atuava como um estabilizador de microtúbulos impedindo a divisão celular (Kingston, 1996). O paclitaxel se liga com grande afinidade a subunidade  $\beta$ -tubulina ao longo do comprimento do microtúbulo e em elevadas concentrações aumenta a polimerização do microtúbulo. Baixas concentrações de paclitaxel reduzem a instabilidade dinâmica dos microtúbulos sem aumentar sua polimerização causando bloqueio da mitose na transição da metáfase/anáfase (Jordan & Wilson, 2004). Apesar das dificuldades de isolamento e formulação, bem como do baixo rendimento, em 1977 o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) investiu em larga escala nos testes clínicos do taxol como um agente anticâncer. Vale ressaltar que para a realização destes primeiros testes clínicos, foram necessárias 4000 árvores que forneceram 360g de taxol (1) (Mann, 2002). Em 1992, o taxol (1) foi aprovado para o tratamento de câncer de ovário resistente a drogas e em 1994 foi aprovado para o tratamento do câncer de mama levando ao sacrifício de 38000 árvores (Kingston, 2000; Mann, 2002).

O fornecimento do fármaco só foi solucionado após o achado de um precursor não citotóxico, 10-deacetilbaccatin III, extraído de folhas do teixo europeu, *Taxus Baccata*, uma fonte renovável, que poderia ser facilmente convertido ao paclitaxel e a derivados mais potentes. Modificações na cadeia lateral ligada ao C13 do anel dos taxanos levaram ao desenvolvimento de um análogo semi-sintético do paclitaxel, o docetaxel (2) (Chabner *et al.*, 1996). A potência do docetaxel (2) é maior do que a do paclitaxel (1) (Korolkovas, 1998; Mann, 2002). O paclitaxel, usado para o tratamento de

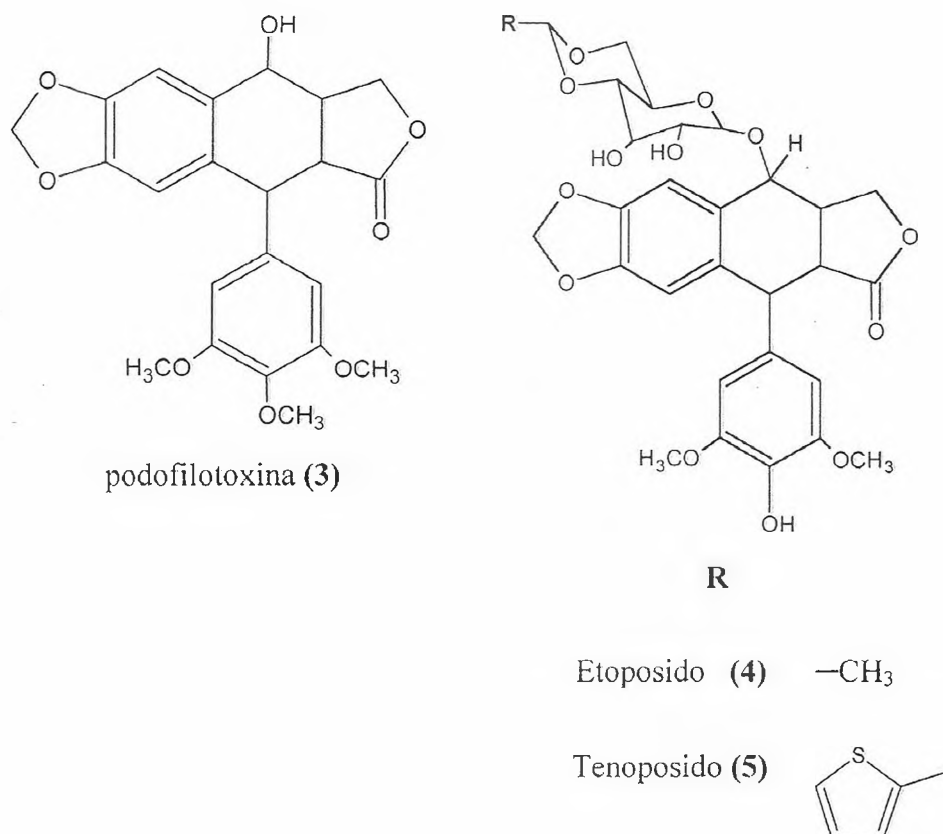
câncer de ovário e mama, é o agente antineoplásico mais vendido, com arrecadação de mais de um bilhão e meio de dólares no ano de 2000 (Mann, 2002).



**Figura 6** – Estruturas químicas do paclitaxel (1) e do docetaxel (2).

A podofilotoxina (3) é conhecida há muitos anos como o agente citotóxico encontrado no rizoma da planta *Podophyllum peltatum* (Srivastava *et al.*, 2005). De fato, os índios americanos já utilizavam o extrato das raízes de *P. peltatum* no tratamento do câncer de pele e verrugas (Mann, 2002). Análogos semi-sintéticos da podofilotoxina (3), o etoposídeo (4) e o teniposídeo (5) foram obtidos através do estudo da relação estrutura-atividade. Esses compostos diferem somente pela presença do grupo metila (4) no lugar do grupo tenillidíno (5) no açúcar piranosídico (Bohlin & Rosen 1996). A podofilotoxina (3) atua ao inibir a polimerização dos microtúbulos e também

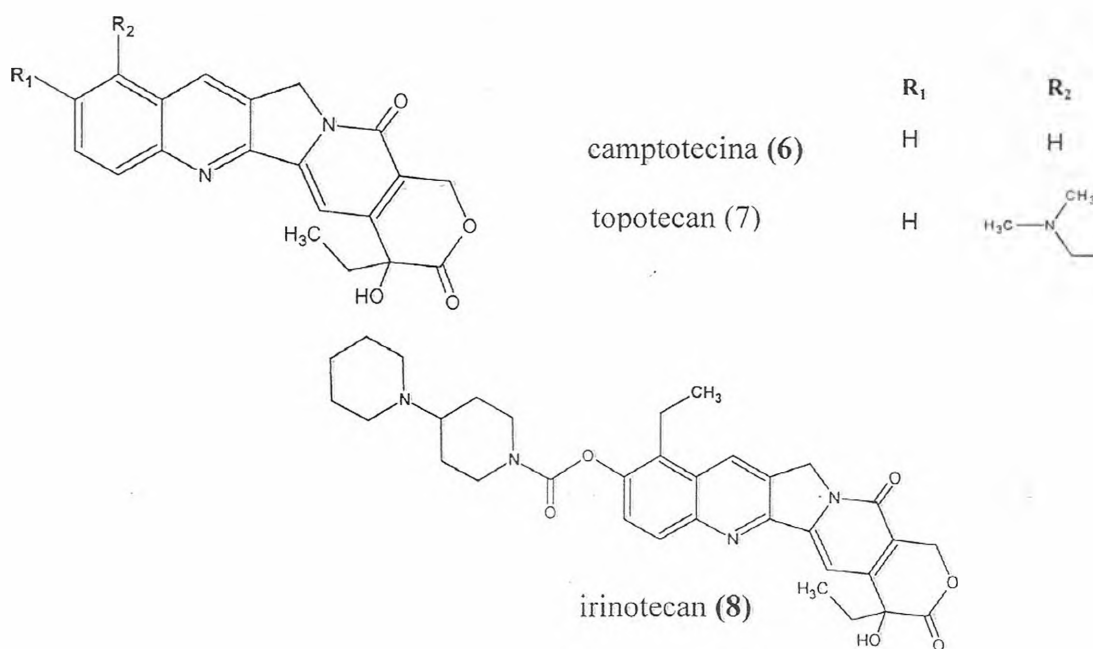
inibe a topoisomerase II (Srivastava *et al.*, 2005). As modificações estruturais que produziram o etoposido (4) e teniposido (5) também alteraram o mecanismo de ação, pois passaram a possuir somente a atividade inibidora da topoisomerase II (Srivastava *et al.*, 2005). O anel trimetoxilado da podofilotoxina confere a atividade inibidora dos microtúbulos, porém quando o grupamento *p*-metoxila deste mesmo anel é desmetilado produzindo um grupo hidroxila, a atividade inibidora da topoisomerase II aumenta (Srivastava *et al.*, 2005).



**Figura 7** – Estruturas químicas da podofilotoxina (3), do etoposido (4) e do teniposido (5).

A camptotecina (6) é um alcalóide pentacíclico presente na árvore chinesa *Camptotheca acuminata* que mostrou uma atividade impressionante contra leucemia e contra uma variedade de tumores sólidos. Apesar da camptotecina apresentar propriedades farmacocinéticas inadequadas devido, em parte, a sua reduzida

solubilidade e de seus derivados na forma de sal sódico terem sido retirados de estudos clínicos por causa de uma série de efeitos tóxicos, uma série de derivados foram aprovados para o uso clínico, como o topotecan (7) e o irinotecan (8), ou estão em estudos clínicos (Barreiro & Fraga, 2001; Srivastava *et al.*, 2005). Esses compostos causam inibição da topoisomerase I.

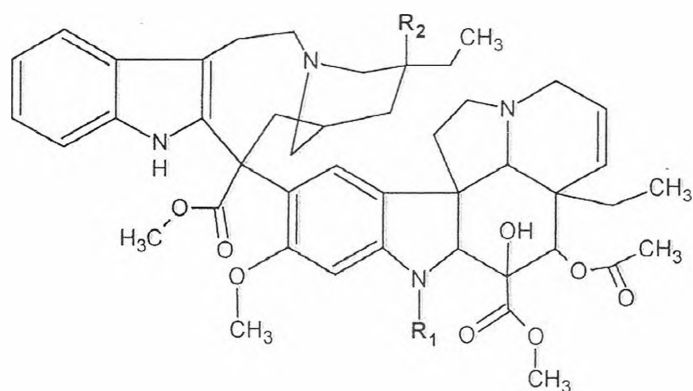


**Figura 8-** Estruturas químicas da camptotecina (6), do topotecan (7) e do irinotecan (8).

Os alcalóides da vinca, vincristina e vimblastina (9 e 10), são extraídos da planta *Catharanthus roseus*. Esses compostos atuam inibindo a polimerização de microtúbulos, bloqueando a formação do fuso mitótico, resultando na parada do processo de mitose na metáfase. Em baixas concentrações, porém clinicamente relevantes, a vimblastina não despoli- microtúbulos, mas bloqueia a célula na mitose ao alterar a dinâmica dos microtúbulos (Jordan & Wilson, 2004). Embora tenham estrutura química e mecanismo de ação semelhante, apresentam diferentes espectros de atividade e de efeitos adversos (Hait *et al.*, 2006). Essas características geraram interesse na pesquisa de novos análogos com o objetivo de identificar

compostos mais ativos e com menor toxicidade exibindo um espectro de atividade citotóxica maior (Kruczynski & Hill, 2001).

A vinorelbina (**11**), um exemplo de derivado da vimblastina, é um composto semi-sintético que está produzindo grandes avanços clínicos e é ativa em câncer de mama e câncer de pulmão (Hait et al., 2006). Os estudos da relação estrutura atividade dos alcalóides da vinca demonstraram que a remoção de alguns grupamentos acaba com a atividade biológica. A retirada do grupamento acetila no carbono C4 da vimblastina elimina a atividade antileucêmica, assim como a acetilação dos grupos hidroxila (Chabner *et al.*, 1996).

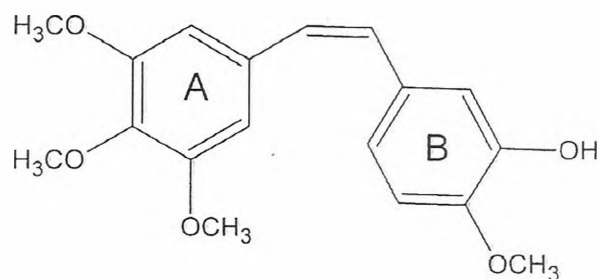


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
vincristina ( <b>9</b> )	—CHO	OH
vinblastina ( <b>10</b> )	—CH <sub>3</sub>	OH
vinorelbina ( <b>11</b> )	—CH <sub>3</sub>	—H

**Figura 9** – Estruturas químicas da vincristina (**9**), da vimblastina (**10**) e da vinorelbina.

As combrestatinas são compostos inibidores da polimerização dos microtúbulos isolados de *Combretum caffrum*, uma árvore sul-africana. A combrestatina mais potente, combrestatina A-4 (**12**) é um estilbeno simples que compete com a colchicina pelo seu sítio de ligação à tubulina (Srivastava *et al.*, 2005). Os estudos de relação

estrutura-atividade mostraram que o grupo benzeno trimetoxilado é essencial para a atividade e que o grupo 4-metila ou 4-metoxila no anel B é requisito para a atividade citotóxica (Srivastava *et al.*, 2005).



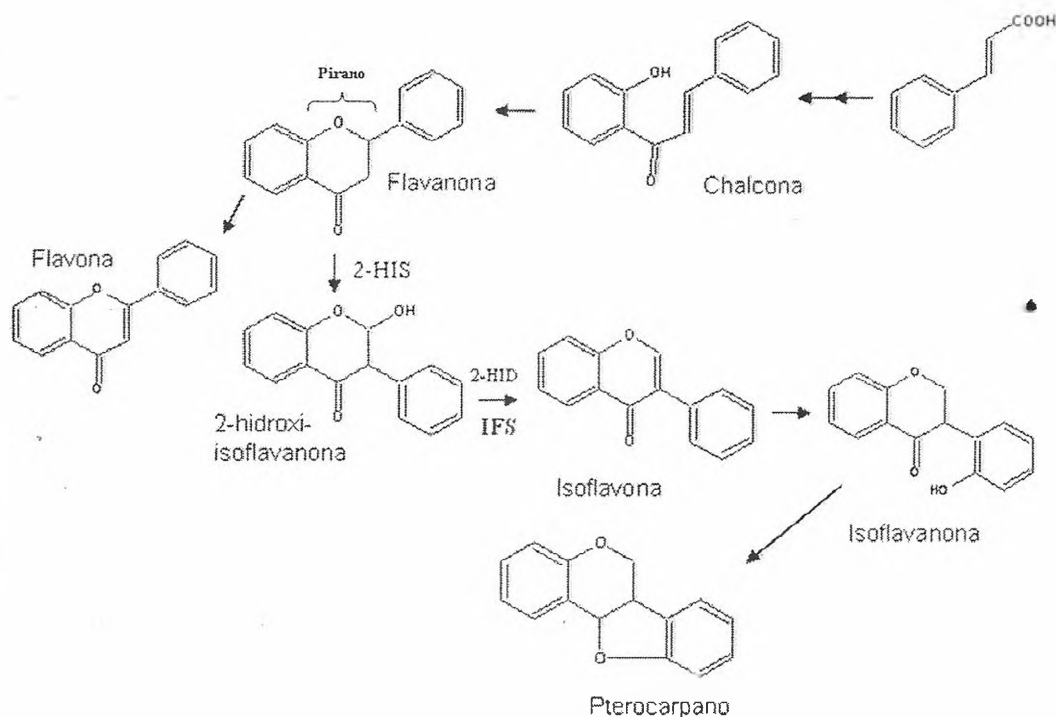
**Figura 10** – Estrutura química da combrestatina A-4 (12).

Vários fármacos usados na terapia anticâncer foram desenvolvidas a partir de produtos naturais obtidos de fontes microbianas e marinhas. Exemplos de drogas obtidas de microorganismos que já foram aprovadas para uso clínico são: actinomicina, bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirrubicina, idarrubicina, mitomicina C e estreptozocina (Rocha *et al.*, 2001). Quanto aos organismos marinhos, cerca de 3000 novos compostos foram isolados dessa fonte e essas novas moléculas vêm demonstrando atividade citotóxica contra diversos tipos de tumores (Newman & Cragg, 2006) A citarabina é um exemplo de composto aprovado como agente antineoplásico obtido de organismos marinhos.

Diante de tantos exemplos de fármacos obtidos de produtos naturais, é válido continuar a busca por substâncias com atividade biológica tanto para servir como fármaco utilizado na terapêutica como uma possível ferramenta farmacológica no auxílio a pesquisa pré-clínica.

#### 1.4. Pterocarpanos

Isoflavonóides constituem uma subclasse dos flavonóides produzidos a partir da migração do grupo fenil da posição 2 do pirano, pertencente ao esqueleto dos flavonóides, para a posição 3 do mesmo anel, catalizada pela enzima isoflavona sintase (Middleton *et al.*, 2000) (Figura 11). Os isoflavonóides apresentam uma diversidade estrutural importante: além das isoflavonas, isoflavononas, isoflavenos e aril-3-cumarinas, encontram-se estruturas ciclizadas como os pterocarpanos (Simões *et al.*, 2003). Os pterocarpanos (Figura 11) representam a maior classe de isoflavonóides, depois das isoflavonas. Apresentam um núcleo tetracíclico derivado do núcleo fundamental das isoflavanonas (Simões *et al.*, 2003) (Figura 11).



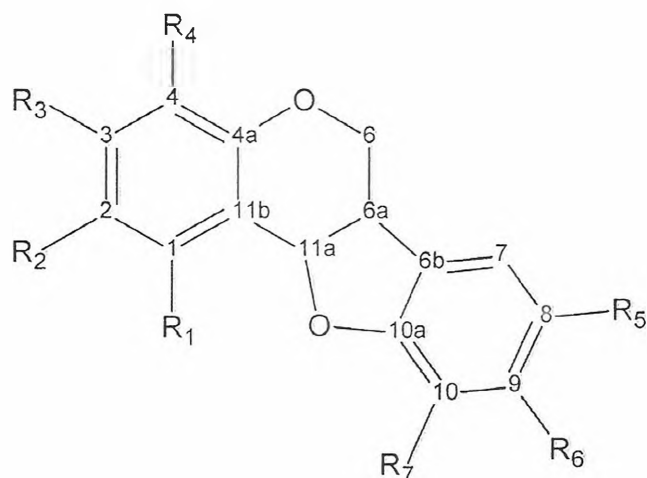
**Figura 11** - Biossíntese de algumas classes de flavonóides e isoflavonóides. 2-HIS: 2-hidroxiisoflavanona sintase; 2-HID: 2-hidroxiisoflavanona desidratase; IFS: isoflavona sintase (Dixon & Steele, 1999).

Muitos pterocarpanos possuem atividade biológica potente contra vírus, micróbios e sistemas celulares animais (Engler *et al.*, 1993). Podem ser produzidos pela planta como um mecanismo de defesa contra o ataque de fungos (Macias *et al.*, 1999). A concentração dos pterocarpanos medicarpina (**13**) (3-hidroxi-9-metoxipterocarpano) e mackiaina (**14**) (3-hidroxi-8,9-metilenodioxipterocarpano) (figura 12) nas raízes do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) aumentam na presença de duas cepas do fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cicerei* causando resistência à infecção (Stevenson *et al.*, 1997).

A atividade antimicrobiana de alguns pterocarpanos foi descrita por Mitscher *et al.* (1988), mostrando que os compostos ericristina (**15**) (2,10-diprenil-3-hidroxi-9-metoxipterocarpano) e eritrabissina-II (**16**) (2,10-diprenil-3,9-dihidroxipterocarpano) são ativos contra *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis*. O pterocarpano 1-metoxi-3,9-dihidroxi-10-prenilpterocarpano (**17**) mostrou atividade anti-*Helicobacter pylori*, contra cepas resistentes a claritromicina, a amoxicilina e cepas sensíveis à associação de claritromicina+amoxicilina. *H. pylori* é uma bactéria que habita o estômago e o intestino, sendo geralmente reconhecida como agente etiológico da úlcera péptica e do câncer gástrico (Fukai *et al.*, 2002).

A atividade antiviral foi descrita por Engler *et al.* (1993). Nesse trabalho, vários pterocarpanos foram avaliados contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV-I) e muitos mostraram atividade significativa. O estudo da relação estrutura-atividade mostrou que os pterocarpanos que continham um grupo metoxila em C-3, uma hidroxila em C-8 e um substituinte metoxila em C-9 exibiam maior atividade do que aqueles compostos em que faltava algum desses grupos.





- (13) R1 = R2 = R4 = R5 = R7 = H, R3 = OH, R6 = OCH3  
 (14) R1 = R2 = R4 = R7 = H, R3 = OH, R5 = R6 = O-CH2-O  
 (15) R1 = R4 = R5 = H, R2 = R7 = prenil, R3 = OH, R6 = OCH3  
 (16) R1 = R4 = R5 = H, R2 = R7 = prenil, R3 = R6 = OH  
 (17) R1 = OCH3, R2 = R4 = R5 = H, R3 = R6 = OH, R7 = prenil  
 (18) R1 = R2 = R7 = H, R3 = OH, R4 = prenil hidroxilado, R5 = R6 = O-CH2-O  
 (19) R1 = R4 = R7 = H, R2 = prenil hidroxilado, R3 = OH, R5 = R6 = O-CH2-O  
 (20) R1 = R2 = R7 = H, R3 = OH, R4 = prenil, R5 = R6 = O-CH2-O  
 (21) R1 = R2 = R7 = H, R3 = OH, R4 = benzil, R5 = R6 = O-CH2-O  
 (22) R1 = R2 = R7 = H, R3 = R4 = OH, R5 = R6 = O-CH2-O  
 (23) R1 = R2 = R7 = H, R3 = OCH3, R4 = OH, R5 = R6 = O-CH2-O  
 (24) R1 = R2 = R4 = R5 = H, R3 = R6 = OH, R7 = prenil  
 (25) R1 = R2 = R7 = H, R3 = R6 = OH, R4 = R5 = prenil  
 (26) R1 = R2 = R7 = H, R3 = R4 = ciclo hexano, R5 = R6 = O-CH2-O  
 (27) R1 = R4 = R5 = R7 = H, R2 = R3 = R6 = OCH3  
 (28) R1 = R2 = R4 = R5 = R7 = H, R3 = R6 = OCH3  
 (29) R1 = R2 = R4 = R5 = H, R3 = R7 = OH, R6 = OCH3  
 (30) R1 = R2 = R5 = R7 = H, R3 = R4 = OH, R6 = OCH3

**Figura 12** - Estrutura química dos pterocarpanos com atividade biológica

Alguns pterocarpanos prenilados apresentam atividade inibidora do veneno de cobra. As cabnegrinas AI (18) e AII (19) foram os primeiros pterocarpanos isolados do fitoterápico “Específico Pessoa” com atividade antimiotóxica (Nakagawa et al., 1982). 4'-dehidroxicabnegrina AI (20), um pterocarpano isolado de *Harpalyce brasiliiana*, e seu derivado, 3-hidroxi-4-benzil-8,9-metilenodioxipterocarpano (21) apresentaram atividade antimiotóxica em ensaios utilizando o veneno de *Bothrops jararacussu*. O composto 21 também apresentou atividade antiproteolítica e inibidora da fosfolipase A2 (Silva et al., 2004).

Existem alguns exemplos de pterocarpanos que apresentam atividade antiproliferativa. Três pterocarpanos isolados das flores da *Petalostemon purpureos* apresentaram atividade em carcinoma nasofaríngeo humano (KB). O composto (+)-3,4-dihidroxi-8,9-metilenodioxipterocarpano (22) mostrou-se ativo com  $CI_{50}$  de 0,9  $\mu\text{g/mL}$ , já os compostos (+)-4-hidroxi-3-metoxi-8,9-metilenodioxipterocarpano (23) e maackiaina (14) mostraram-se moderadamente citotóxicos, com  $CI_{50}$  de 4,0 e 5,6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A presença do catecol parece ser responsável pelo aumento da atividade citotóxica (Chaudhuri et al., 1995).

O composto 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (13) também apresenta atividade citotóxica nas células KB com  $CI_{50}$  de 2,4  $\mu\text{g/mL}$  (Seo et al., 2001). Além desses compostos, dois pterocarpanos prenilados demonstraram atividade antiproliferativa: a faseolidina (24) (3,9-dihidroxi-10-prenil-pterocarpano) que se mostrou moderadamente ativa em CHOC (carcinoma de ovário de hamster) e CHOC-PGO (carcinoma de ovário de hamster, expressando altos níveis de glicoproteína P) com  $CI_{50}$  de 4,0 e 7,6  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Dagne et al., 1993). O pterocarpano Eribraedin C (25) (3,9-dihidroxi-4,8-prenil-pterocarpano) isolado de *Bituminaria bituminosa* causou apoptose em células de carcinoma de cólon LoVo e HT29 (Maurich et al., 2006).

Num fracionamento bioguiado a partir extrato etanólico das raízes de *Harpalyce brasiliiana*, realizado no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, seis pterocarpanos foram isolados e todos apresentaram atividade antimetabólica em ovos do ouriço-do-mar. *Lytechinus variegatus* (Militão *et al.*, 2007). Dentre os compostos isolados leiocarpina (**26**) foi o composto mais ativo com  $CI_{50}$  variando de 0,1 a 1,2  $\mu\text{g/mL}$ , seguido por cabnegrina A1 (**18**) (0,3-1,8  $\mu\text{g/mL}$ ) e cabnegrina AII (**19**) (1,4-7,3  $\mu\text{g/mL}$ ), 4'-dehidroxicabnegrina A1 (**20**) (2,9-17,1  $\mu\text{g/mL}$ ), medicarpina (**13**) (2,2-11,6  $\mu\text{g/mL}$ ) e mackiaina (**14**) (3,8-4,9  $\mu\text{g/mL}$ ). A atividade citotóxica desses compostos também foi avaliada em três linhagens tumorais, HI.60 (leucemia), MDA-MB4-35 (carcinoma de mama) e HCT-8 (cólon) (Militão *et al.*, 2007). Nesse ensaio o composto 4'-dehidroxicabnegrina A1 mostrou-se mais ativo com  $CI_{50}$  variando de 3,1 a 8,5  $\mu\text{g/mL}$ , todos os outros pterocarpanos apresentaram baixa atividade citotóxica com  $CI_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$  (Militão *et al.*, 2007).

Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo, pterocarpanos isolados de *Platymiscium floribundum* também apresentaram atividade antimetabólica nos ovos do ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*) (Militão *et al.*, 2005). *Platymiscium floribundum* é uma árvore encontrada no nordeste brasileiro conhecida popularmente como "Sacambu" ou "Jacarandá do Litoral". Sua madeira de cor avermelhada é bastante resistente ao ataque de organismos xilófagos, sendo por isto muito utilizada na construção civil, manufatura de móveis, como também em peças torneadas e puxadores de gavetas (Cajazeiras, 2003). O estudo fitoquímico de *Platymiscium floribundum* resultou no isolamento de cinco pterocarpanos, 2,3,9- trimetoxipterocarpano (**27**), 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**13**), 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**), 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**29**), 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**30**), dentre outros compostos (Cajazeiras, 2003).

O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) mostrou-se extremamente ativo no ensaio de atividade antimitótica em ovos do ouriço-do-mar com  $CI_{50}$  variando de 0,004 a 0,003  $\mu\text{g/mL}$ . A ordem de atividade para as substâncias testadas foi: 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) > 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (13) > 3,9-dimetoxipterocarpano (28) > 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (29)  $\geq$  3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (30) (Militão *et al.*, 2005). O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) foi 1000 vezes mais ativo do que a doxorrubicina e o etoposido nesse ensaio (Militão *et al.*, 2005). De acordo com Jacobs e colaboradores, se uma substância promove 100 % de inibição nesse ensaio na concentração de 16  $\mu\text{g/mL}$  ou menos esse composto pode ser considerado bastante ativo e devem ser, a seguir, estudados em testes *in vivo*, pois os resultados com esse bioensaio são bastante confiáveis.

Em um ensaio de atividade citotóxica contra células tumorais o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) apresentou  $CI_{50}$  menor que 1  $\mu\text{g/mL}$  nas linhagens HCT-8, MCF-7, HL60 e CEM e  $CI_{50}$  igual a 2,9  $\mu\text{g/mL}$  em melanoma murino B16 (Falcão *et al.*, 2005). A ordem de atividade para as substâncias testadas foi: 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) > 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (13) > 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (30) > 3,9-dimetoxipterocarpano (28) > 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (29).

Estudos têm revelado que os pterocarpanos prenilados apresentam menor atividade antimitótica e citotóxica comparado aos pterocarpanos não prenilados e a presença da metoxila em C2 parece aumentar a atividades, já que o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano mostrou-se bastante ativo em ambas os ensaios (Militão, 2005; Militão *et al.*, 2005, Militão *et al.*, 2007).

A avaliação da atividade indutora de apoptose dos compostos 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27), 3,9-dimetoxipterocarpano (28), 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (13) e 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (30) (Figura 12) em células tumorais dos foi realizada com HL60 (leucemia promielocítica). A integridade da membrana plasmática, o conteúdo de DNA e a despolarização da mitocôndria foram estudados através da citometria de fluxo. Um Kit colorimétrico foi usado para verificar a ativação de caspase-3. Os ensaios demonstraram que os compostos 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) na concentração de 1,25 µg/mL e 3,9-dimetoxipterocarpano (28) na concentração de 12,5 µg/mL causaram fragmentação do DNA, despolarização da mitocôndria e ativação de caspase-3 sem causar alteração na membrana plasmática, achados característicos de apoptose, enquanto os compostos 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (13) e 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (30) induziram necrose pois na concentração de 12,5 µg/mL ambas causaram dano na membrana plasmática. O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) causou parada do ciclo celular em G2/M nas concentrações testadas (1,25 e 2,5 µg/mL) enquanto o composto 3,9-dimetoxipterocarpano (28) causou parada do ciclo em G2/M apenas na menor concentração testada (12,5 µg/mL) e intensa fragmentação do DNA na concentração de 25 µg/mL .

Os resultados mostrados indicam que o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) apresenta potencial como droga antitumoral. A avaliação da atividade antitumoral *in vivo* e estudos de mecanismo de ação devem ser realizados para compreender melhor a atividade farmacológica desse composto, sendo estes os objetivos principais deste trabalho.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antitumoral de pterocarpanos através de estudos *in vitro* e *in vivo* e determinar os grupamentos necessários à atividade biológica.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Avaliação da atividade citotóxica do 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) em células tumorais de diferentes linhagens
2. Determinar a seletividade do 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) através da utilização de células normais
3. Estudar a cinética da atividade antileucêmica do 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27)
4. Determinar os mecanismos de ação dos pterocarpanos 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (13), 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27), 3,9-dimetoxipterocarpano (28), 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (29) e 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (30), através de ensaios de imunofluorescência sobre o citoesqueleto da célula.
5. Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* de pterocarpanos.
6. Avaliar a metabolização de pterocarpanos em modelos *in vitro*.

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Materiais utilizados**

##### **3.1.1. Equipamentos**

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2

Agitador de tubo, Donner AD 8850

Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di

Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212

Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403

Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin

Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte Mini system

Cromatógrafo a Gás Acoplado ao Espectro de Massa – Shimadzu-QP2010

Deonizador de água Milli-Q, Milipore

Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter

Fluxo laminar, VECO

HPLC - Shimadzu

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

Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070

Microondas, Panasonic

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

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot

Microscópio de fluorescência, Olympus

Microscópio laser confocal (Zeiss LSM 510)

Micrótomo, SLEE Mainz

pHmetro, Micronal B474

Pipetas automáticas, Gilson

Sistema de Eletroforese Horizontal mini Submarine, Amersham Biosciences

Sistema de Fotodocumentação, Kodak

### 3.1.2. Soluções, reagentes e fármacos

Ácido Clorídrico	-	Vetec
Acetato de etila	-	Merk
Agarose 1 %	0,5 g de agarose	FMC -
	Água deionizada q. s. p. 50 mL	Bioproducts
Anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina de camundongo	-	Sigma
Anticorpo anti-lamina B	-	Sigma
Anticorpo secundário anti-goat-FITC	-	Sigma



Anticorpo secundário (IgG) conjugado com Cy5	-	Sigma
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan	Sigma
	PBS q.s.p. 100 mL de solução	
Bodipy Ceramide (Molecular Probes) 1mM em etanol	-	Invitogen
Bodipy Ceramide: solução de uso para marcação do complexo de Golgi	50 µL de Bodipy Ceramide 1mM; 150 µL etanol; 3,4 mg de BSA; 10 mL de DMEM sem soro fetal bovino	
Camptotecina	-	TopoGEN
Citrato de Sódio	-	Grupo Química
Cloreto de Sódio (NaCl)	-	absynth
DAPI	-	
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	Vetec
Doxorrubicina – fornecida pelo Instituto do Câncer do Ceará – ICC	-	Zodiac
Eosina 0,5%	0,5 g de Eosina; 80 mL de Álcool etílico; 0,5 mL de	Doles

Ácido acético; 20 mL H<sub>2</sub>O

Faloidina-FITC	-	Sigma
Ficoll	-	Sigma
Fitohemaglutinina	-	Sigma
Formaldeído 10 %	100 mL de formaldeído H <sub>2</sub> O q. s. p. 1 L	Dinâmica
Hexano	-	Vetec
Hematoxilina 0,1%	0,5 g de Hematoxilina 10 mL de Glicerina 25 g de Sulfato de alumínio	Doles Labsynth Labsynth
Iodeto de propídeo 50 µg/mL	0,1 g de Iodeto de potássio H <sub>2</sub> O q.s.p. 500 mL de solução 5 mg de iodeto de propídeo PBS q.s.p. 50 mL	Labsynth • -
Meio de cultura para células RPMI 1640	Diluído em água deionizada, filtrado em filtro millipore (0,22 µm) e complementado com SBF 10 %, 1 % de glutamina, 1 % de antibióticos, 1 % de bicarbonato de sódio (0,75 %) e 25 mM	Sigma Cultilab

	de HEPES	
Meio DMEM para cultura de células	Dulbecco's modified eagle medium- Glicose, L-glutamina, piridoxina, 110 mg/mL e piruvato de sódio	Gibco
	Bicarbonato de sódio 3.2 g	Dinâmica
	HEPES 6g	Reagen
	q.s.p. 1L H <sub>2</sub> O	
Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL	Cultilab
	Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab
	Cloreto de Sódio = 0,600g	
	Cloreto de Potássio = 0,030g	
Ringer-lactato	Cloreto de Cálcio 2H <sub>2</sub> O = 0,020g	Laboratórios Biosintética
	Lactato de Sódio = 0,30g	
	Água q. s. p. 100 mL	
Sulfato de Gentamicina	-	Gentamicin Novafarma
RNase 10mg/mL	-	Amresco
Soro fetal bovino	-	Cultilab
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio	Labsynth

	2,14 g de NaHPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Labsynth
	0,276 g de NaHPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Labsynth
	H <sub>2</sub> O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	-
	0,1 g de citrato de sódio	Grupo química
Tampão de lise (para análise do conteúdo de DNA)	0,1 mL de Triton X-100	Isofar
	5 mg de iodeto de propídeo	Sigma
	100 mL de H <sub>2</sub> O	
Topoisomerase I Drug Screening Kit		TopoGEN
Vecta-shild		Vector laboratories
	50 mL de Tripsina 2,5 %	Cultilab
Tripsina 0,25%	0,125 g de EDTA	Proquímios
	450 mL de PBS	-
Triton X -100		Isofar
	100 mL de formaldeído	
Xilol 10 %		Dinâmica
	H <sub>2</sub> O q. s. p. 1 L	
		ICN
5- Fluorouracil	2,5 mg/mL	Farmacêutica

### 3.1.3 Modelos biológicos

Camundongos albinos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss

Linhagens celulares tumorais mantidas em cultura (**Tabela 1**)

Linfócitos humanos isolados de voluntários sadios

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

<b>Linhagem Celular</b>	<b>Tipo Histológico do Câncer/Origem</b>	<b>Concentração de Plaqueamento (células/mL)</b>	<b>Meio Utilizado</b>
<b>HL-60</b>	Leucemia promielocítica humana	$0,3 \times 10^6$	RPMI
<b>MDA-MB 435</b>	Carcinoma de mama humano	$0,1 \times 10^6$	RPMI
<b>MCF-7</b>	Carcinoma de mama humano	$0,1 \times 10^6$ e $5 \times 10^4$	DMEM
<b>HCT-8</b>	Carcinoma de cólon humano	$0,7 \times 10^5$	RPMI
<b>PC-3</b>	Carcinoma de próstata humano	$0,1 \times 10^6$	RPMI
<b>SF-295</b>	Glioblastoma humano	$0,1 \times 10^6$	RPMI
<b>MX-1</b>	Carcinoma de mama	$0,1 \times 10^6$	RPMI

	humano		
<b>L929</b>	Fibroblasto murino	$0,7 \times 10^5$	DMEM
<b>K562</b>	Leucemia mielóide crônica humana	$0,3 \times 10^6$	RPMI
<b>Jurkat</b>	Leucemia linfocítica humana	$0,3 \times 10^6$	RPMI
<b>Molt-4</b>	Leucemia linfocítica humana	$0,3 \times 10^6$	RPMI
<b>T47D</b>	Carcinoma de mama humano	$5 \times 10^4$	DMEM
<b>HS58T</b>	Carcinoma de mama humano	$5 \times 10^4$	DMEM
<b>BRL3A</b>	Fígado murino	$5 \times 10^4$	DMEM

## 3.2. Metodologia Experimental

### 3.2.1. Obtenção dos pterocarpanos (13, 27, 28, 29 e 30) de *Platymiscium floribundum*

O trabalho de isolamento e determinação estrutural foi realizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará sob orientação dos professores Edilberto Rocha Silveira e Mary Anne Sousa Lima.

*P. floribundum* Vog (Figura 12) foi coletada no município de Acarape, estado do Ceará, e identificada pelo professor Afrânio Gomes Fernandes (Universidade Federal do Ceará). A exsicata (no. 31052) foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

O lenho do caule da *P. floribundum* (1,7 kg) foi seco ao ar, pulverizado e extraído com hexano (4000 mL) a temperatura ambiente. O solvente foi removido por pressão reduzida produzindo um óleo viscoso marrom (7,0 g). O resíduo obtido após extração com hexano foi extraído com  $\text{CHCl}_3$  (4000 mL) produzindo um extrato resinoso marrom (76,0g) e depois com EtOH produzindo outro extrato marrom resinoso (35,0 g).

Parte do extrato clorofórmico (50,0 g) foi adsorvido em gel de sílica (5,0 g) e cromatografado em coluna com Si gel (150 g) por eluição com hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , EtOAc e MeOH em misturas binárias de polaridade crescente, produzindo 10 frações reunidas por semelhança na cromatografia em camada delgada (solvente, volume, peso): *A* (hexano, 250 mL, 20,0 mg); *B* (hexano: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  7:3, 250 mL, 30,0 mg); *C* (hexano: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:1, 250 mL, 3,1 g); *D* (hexano: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:1, 500 mL, 6,9 g); *E* ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 350 mL, 39,0 mg); *F* ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 250 mL, 22,7 g); *G* ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt 1:1, 150 mL, 3,0 g), *H* ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt 1:1, 250 mL, 1,8 g), *I* (AcOEt, 350 mL, 1,2 g) e *J*

(MeOH, 50 mL, 9,1 g). A partir da fração C (3,1g), um precipitado foi formado e filtrado, produzindo cristais incolores de 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**29**) m.p. 118-120 (lit. 121 °C) (Kurosawa *et al.*, 1978). Fração E (390,0 mg) foi recromatografada com Si gel (20g) por eluição com hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt and MeOH. Seis frações com polaridades crescentes, reunidas por semelhança na cromatografia em camada delgada, foram obtidas: *E*<sub>1</sub> (hexano, 125 mL, 38,0 mg), *E*<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 125 mL, 20,0 mg), *E*<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 7:3, 100 mL, 0,19 g), *E*<sub>4</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt 1:1, 125 mL, 21,0 mg), *E*<sub>5</sub> (AcOEt, 25 mL, 20,0 mg) e *E*<sub>6</sub> (MeOH, 25 mL, 33,0 mg). A fração *E*<sub>1</sub> foi submetida à cromatografia por centrifugação (Cromatroton), usando uma mistura de hexano/AcOEt 1:1 como eluente para produzir um sólido amarelado 3,9-dimetoxipterocarpano (homopterocarpana) (**28**) (20,0 mg, rendimento 0,04%) m.p. 87.6-87.8 (lit. 83.0-85.0) (McMurry *et al.*, 1972). A fração *E*<sub>3</sub> foi purificada em sephadex LH-20 por eluição com CHCl<sub>3</sub>/ MeOH 1:1 produzindo dois sólidos amarelados, 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) (30,0 mg, rendimento 0,06%), m.p. 123-125 °C (lit. 122-124 °C) (Pueppke & VanEtten, 1975) e 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano, (**30**) (8,0 mg), m.p. 167.0-168.7 °C (lit. 168.0 °C) (Ingham, 1976). A fração G produziu um precipitado que foi separado do líquido sobrenadante produzindo 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (medicarpina) (**13**), m.p. 125.0-127.0 °C (lit. 123-125 °C) (Letchier & Shirley, 1976).





**Figura 13** - *Platymiscium Floribundum* fotografada no estado do Ceará.

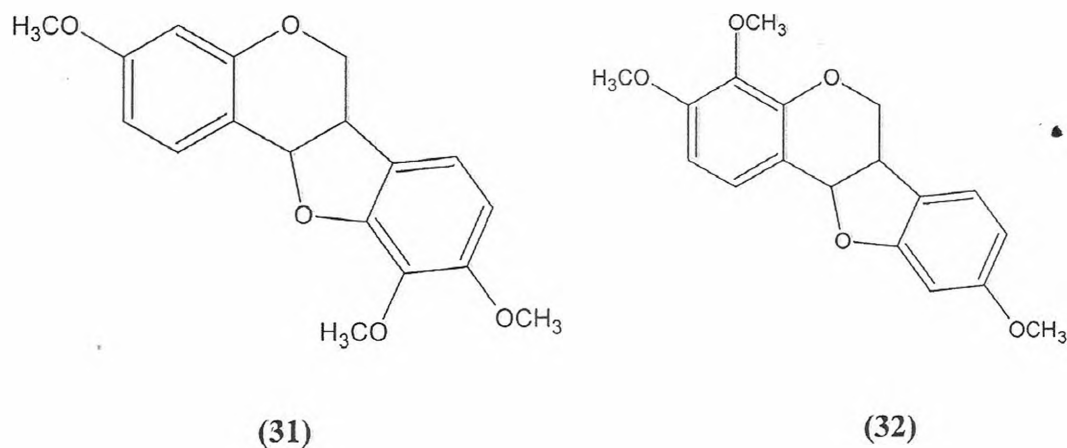
### 3.2.2 Obtenção de derivados dos pterocarpanos

A produção dos derivados de pterocarpanos foi realizada no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará sob orientação dos professores Edilberto Rocha Silveira e Mary Anne Sousa Lima.

O composto 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**29**) (51 mg) foi submetido a refluxo por 1 hora em 5 mL de acetona tratada com drierite ( $\text{CaSO}_4$ ), 108 mg de carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) e 0,1 mL de sulfato de dimetila [ $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ ]. A mistura reacional foi filtrada e o sal lavado com alguns mililitros de acetona tratada, em seguida o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto da reação foi solubilizado em 10 mL de  $\text{CHCl}_3$  e agitado com  $\text{NH}_4\text{OH}$  10 % por 15 minutos. Após separação a fase  $\text{NH}_4\text{OH}$  10% foi lavada com 10mL de clorofórmio. As duas fases foram misturadas e lavadas com (4x10mL) de água e secadas com sulfato de sódio anidro. O solvente foi

evaporado, obtendo 54,7 mg do produto 3,9,10-trimetoxipterocarpano (**31**, figura 13) (rendimento 97,7%).

O composto 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**30**) (41 mg) foi submetido a refluxo por 1 hora em 5 mL de acetona tratada com drierite ( $\text{CaSO}_4$ ), 78 mg de carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) e 0,1 mL de sulfato de dimetila  $[(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4]$ . A mistura reacional foi filtrada e o sal lavado com alguns mililitros de acetona tratada, em seguida o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto da reação foi solubilizado em 10 mL de  $\text{CHCl}_3$  e agitado com  $\text{NH}_4\text{OH}$  10 % por 15 minutos. Após separação a fase  $\text{NH}_4\text{OH}$  10% foi lavada com 10mL de clorofórmio. As duas fases foram misturadas e lavadas com (4x10mL) de água e secadas com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado, obtendo 40,0 mg do produto 3,4,9-trimetoxipterocarpano (**32**, figura 13) (rendimento 90%).



**Figura 14** – Estrutura química dos pterocarpanos 3,9,10-trimetoxipterocarpano (**31**) e 3,4,9-trimetoxipterocarpano (**32**).

### 3.2.3 Estudo da atividade citotóxica dos pterocarpanos

#### 3.2.3.1 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais e célula normal *in vitro*.

A citotoxicidade foi avaliada através do método do MTT (Mosmann, 1983) utilizando oito linhagens celulares (tabela 1) obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD). O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (Mosmann, 1983), permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas.

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL para células em suspensão); utilizando o meio de cultura RPMI 1640 ou o meio DMEM complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades e incubadas com as substâncias teste por 72 h. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 150 µL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuscitado em 150µL 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 550 nm. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade. As substâncias foram testadas em diluição seriada, em duplicata. Foi registrado o gráfico absorvância x concentração e determinado suas  $CI_{50}$  (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software).

### **3.2.3.2 Avaliação da atividade antileucêmica**

Células HL-60 (leucemia promielocítica), Jurkat e Molt-4 (leucemia linfocítica) e K562 (leucemia mielóide crônica) obtidas do National Cancer Institute - USA foram mantidas em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM glutamina, 100 U/mL penicilina, 100  $\mu$ g/mL estreptomicina a 37°C com 5%  $CO_2$ . Para todos os experimentos as células foram plaqueadas na concentração de  $(3 \times 10^5 \text{ cells/mL})$ . A viabilidade celular foi determinada pela exclusão do corante azul de tripan após incubação das células com a droga nas concentrações de (0,1; 0,3; 1; 3 e 10  $\mu$ g/mL). Aliquotas foram removidas da cultura após 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 horas, e as células que excluíram o azul de tripan foram contadas em câmara de Neubauer. Foi registrado o gráfico número de células x concentração e determinadas suas  $CI_{50}$  (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) em cada tempo de incubação realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 3.0 (GraphPad Software). As  $CI_{50}$  foram comparadas por análise de variância (ANOVA) seguido por Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

### **3.2.3.3 Avaliação da atividade antiproliferativa em células mononucleadas do sangue periférico**

As células mononucleadas foram obtidas do sangue periférico de voluntários sadios após centrifugação em gradiente de Ficoll. As células foram removidas, lavadas com tampão fosfato e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino fetal, 100 U/mL penicillina, 100 µg/mL streptomicina para uma concentração final de  $3 \times 10^5$  cells/ml. Fitohemaglutinina (3%) foi adicionada para induzir a proliferação dos linfócitos. A atividade antiproliferativa do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) e doxorrubicina (10 µg/mL) foi avaliada pela contagem das células que excluam o corante azul de tripan após períodos de incubação de 24, 48 e 72h. O resultado foi representado como a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos.

### **3.2.4. Estudos do mecanismo de ação**

#### **3.2.4.1 Imunofluorescência para citoesqueleto**

O ensaio permite analisar o núcleo, a actina e a tubulina da célula. As células MCF-7 foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL sobre lamínulas e incubadas por um período de 24 h. Após a incubação as drogas foram adicionadas na concentração de 25 µg/mL para 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**), 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**13**), 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**30**), 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**29**) e na concentração de 2,5 µg/mL para 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**). Após 24 h as células foram lavadas com tampão fosfato, fixadas com formaldeído 3,7% por 10 min e permeabilizadas com Triton (0,1%) por 15 min. Anticorpos primários para  $\alpha$ -tubulina foram adicionados e após 24 h o anticorpo secundário (IgG) conjugado com Cy5 foi adicionado por 3h. Para visualização da

actina, as células foram incubadas com faloidina-FICT por 15 min. As células foram tratadas com RNAase na concentração de 10mg/mL por 15 min e em seguida iodeto de propídio 10 µg/mL foi adicionado por 15 min para visualização do núcleo. As lamínulas foram montadas em lâminas com Vecta-shild (Vector Laboratories). As imagens foram obtidas em microscópio confocal (Zeiss LSM 510) com laser de argônio (458, 488 e 514 nm), hélio-neon 1 (543 nm) e hélio-neon 2 (633nm) conectado a um microscópio de fluorescência invertido, Zeis anxiovert 100 M.

#### **3.2.4.2 Índice de fases**

A contagem do índice de fases permite identificar em qual estágio da mitose as células estão bloqueadas. Células MCF-7 foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL sobre lamínulas e incubadas por um período de 24 h. Depois do tempo de incubação as drogas foram adicionadas nas concentrações de 25 µg/mL para os compostos 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**), 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**13**), 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**30**), 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**29**) e na concentração de 2,5 µg/mL para 2,3,9-trimetoxipterocarpano. Após 24 h as células foram lavadas com tampão fosfato, fixadas com formaldeído 3,7% por 10 min e permeabilizadas com Triton (0.1%) por 15 min. As células foram tratadas com RNAase na concentração de 10 mg/ml por 15 min e em seguida iodeto de propídio 10 µg/mL foi adicionado por 15 min para visualização do núcleo. As lamínulas foram montadas em lâminas com Vecta-shild (Vector Laboratories). Mil células por lâmina foram contadas em microscópio de fluorescência e classificadas em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão da média de  $n$  experimentos e analisados pelo teste  $\chi^2$ , com nível de significância de 5%.

### **3.2.4.3 Imunofluorescência para citoesqueleto e determinação do índice de fases num painel de três linhagens tumorais e uma linhagem normal.**

O ensaio permite analisar o núcleo, a actina e a tubulina da célula. A ampliação do painel de linhagens permite avaliar a seletividade da droga. As células MCF-7, T47D, HS58T (carcinomas de mama) obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) e BRL3A obtida de cultura primária de células epiteliais do fígado foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL sobre lamínulas e incubadas por 24 h. Após esse período as células foram tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) na concentração de  $2,5 \mu\text{g/mL}$  por 24h, em seguida as células foram lavadas com tampão fosfato, fixadas com formaldeído 3,7% por 10 min e permeabilizadas com Triton (0,1%) por 15 min. Anticorpos primários para  $\alpha$ -tubulina foram adicionados e após 24 h o anticorpo secundário (IgG) conjugado com Cy5 foi adicionado por 3h. Para visualização da actina, as células foram incubadas com faloidina-FITC por 15 min. As células foram tratadas com RNAase na concentração de 10mg/ml por 15 min e em seguida iodeto de propídio  $10 \mu\text{g/mL}$  foi adicionado por 15 min para visualização do núcleo. As lamínulas foram montadas em lâminas com Vectashild (Vector Laboratories). As imagens foram obtidas em microscópio confocal (Zeiss LSM 510). A determinação do índice de fase foi realizada utilizando as mesmas lâminas preparadas acima. Mil células por lâmina foram contadas em microscópio de fluorescência e classificadas em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão da média de n experimentos e analisados pelo teste  $\chi^2$ , com nível de significância de 5%.

#### **3.2.4.4 Imunofluorescência para Lamina B**

A clivagem da membrana nuclear é um evento que marca a passagem da célula da prófase para a prometáfase (Weaver & Cleaveland 2005). A lamina B é um componente da membrana nuclear, sua marcação permite visualizar a carioteca. As células MCF-7 e T47 D foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL sobre lamínulas e incubadas por 24 h. Após esse período as células foram tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) na concentração de  $2,5 \mu\text{g/mL}$  por 24h, em seguida as células foram lavadas com tampão fosfato, fixadas com formaldeído 3,7% por 10 min e permeabilizadas com Triton (0,1%) por 15 min. Anticorpos primários para lamina B foram adicionados e após 24 h o anticorpo secundário (IgG) conjugado com FITC foi adicionado por 3h. As lamínulas foram montadas em lâminas com Vecta-shild (Vector Laboratories). As imagens foram obtidas em microscópio confocal (Zeiss LSM 510)

#### **3.2.4.5 Avaliação do efeito da droga tempo-dependente através da análise morfológica.**

Células MCF-7 foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL, após um período de 24 h o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) na concentração de  $2,5 \mu\text{g/mL}$  foi adicionado e as células incubadas por 24 ou 48h. Após o período de tratamento as células foram lavadas com tampão fosfato e reincubadas com o meio por mais 24h. Para observar a morfologia, as células foram tripsinizadas e resuspendidas em meio.  $50\mu\text{L}$  da suspensão de células foram adicionadas à centrífuga de lâmina (cytospin). Após a adesão das células na lâmina as células foram fixadas com metanol por 1 minuto e coradas hematoxilina e eosina.



A coloração utilizada nesse experimento permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. A hematoxilina é um corante basófilo que tem afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo uma cor azul. A eosina, ao contrário, liga-se ao citoplasma conferindo-lhe uma coloração rósea. As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio óptico para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

#### **3.2.4.6 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.**

Esse teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo se ligar ao DNA. Inicialmente a membrana plasmática das células é lisada por um detergente para que o iodeto de propídeo possa se ligar ao núcleo. Células com o conteúdo de DNA duplicado (G2/M) emitirão alta fluorescência, já núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado (DNA subdiploide) incorporam menor quantidade de iodeto de propídeo e por isso emitem menor fluorescência sugestivo de apoptose.

Células MCF-7 foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL, após um período de 24 h o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) na concentração de 2,5  $\mu\text{g/mL}$  foi adicionado e as células incubadas por 24 e 48h. Após o período de tratamento as células foram recolhidas para a análise do conteúdo de DNA ou foram lavadas com tampão fosfato e reincubadas com o meio por 24h. Para quantificar o DNA, as células foram tripsinizadas e resuspendidas em meio. Cem  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foram adicionadas a 100  $\mu\text{L}$  de solução de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% de triton X-100 e 50  $\mu\text{g/mL}$  de iodeto de propídeo). Após um período de trinta minutos, as amostras foram analisadas por citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mini System® usando programa

Cytosoft 4.1 para leitura e análise das amostras onde o aparelho contava cinco mil eventos. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão da média de  $n$  experimentos e analisados por Teste  $t$  de *Student*, com nível de significância de 5%.

#### **3.2.4.7 Análise das células mitóticas após um curto tratamento com a droga**

Células MCF-7 foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL, após um período de 24 h o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) na concentração de 2,5  $\mu\text{g/mL}$  foi adicionado e as células incubadas por 24 h. Em seguida o meio foi retirado e, as células lavadas com PBS e 1 mL de meio novo foi adicionado. Com o objetivo de tentar separar as células em mitose por força mecânica o meio foi retirado e adicionado várias vezes. As células que se soltaram juntamente com o meio foi adicionada em outra placa, e após 6 e 24 h foram fixadas e coradas com CY-5 (tubulina), Faloidina-FITC (actina) e iodeto de propídeo (núcleo) de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.4.1. As células que permaneceram aderidas foram reincubadas em meio completo por 24h e coradas como descrito acima. As imagens foram obtidas em microscópio confocal (Zeiss LSM 510)

#### **3.2.4.8 Posicionamento do Complexo de Golgi em células MCF-7.**

Células tratadas com drogas inibidoras de proteínas motoras da grande família das kinesinas causam alteração na localização das organelas citoplasmáticas como os lisossomas e o complexo de Golgi (Mayer *et al.*, 1999). Células MCF-7 foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL sobre lamínulas e incubadas por 24 h. Após esse período as células foram tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano na concentração de 2,5  $\mu\text{g/mL}$  por 24h, em seguida as células foram lavadas com tampão fosfato e incubadas no gelo com a solução contendo o marcador do complexo de golgi, Bodipy Ceramide por 30 minutos (5  $\mu\text{M}$  Bodipy

Ceramide, 0,34 % BSA, 1,5% etanol). Após a marcação foi adicionado meio DMEM com 10% de soro fetal bovino por 30 minutos. O meio foi removido, as células foram lavadas com PBS, fixadas com formaldeído 3,7% por 20 minutos. DAPI foi adicionado para corar o núcleo e as lamínulas foram montadas em lâminas com Vecta-shild (Vector Laboratories). As imagens foram obtidas em microscópio confocal (Zeiss LSM 510)

#### **3.2.4.9 Ensaio de Relaxamento do DNA**

Para efeitos de estudo de relaxamento de DNA superhelicoidizado, foi avaliado a ação inibitória do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) sobre a enzima Topoisomerase I humana (Topoisomerase I Drug Screening Kit, TopoGEN, Inc., Columbus, USA) de acordo com Bezerra *et al.* (2007). Um microlitro (250 ng) de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG, uma derivação do pUC 19) foi incubado com a Topo I (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 2 e 4 µg/mL de 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**), para um volume final de 20 µL. A droga Camptotecina (0,1 mM) foi usada como controle positivo. A parada da reação foi feita adicionando 2 µL de SDS 10 % (para facilitar o bloqueio da enzima no complexo de clivagem) e 50 µg/mL de proteinase K (para digerir ligações protéicas). As amostras foram misturadas ao tampão de amostra contendo o corante azul de bromofenol (0,25 %). Em seguida, as amostras foram 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, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta.

### **3.2.5 Estudo da atividade antitumoral de pterocarpanos em camundongos transplantados com Sarcoma 180.**

A regressão total de tumores nos animais, a redução no crescimento dos tumores sensíveis ao composto e/ou ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os animais não tratados são fatores diretamente relacionados à atividade antitumoral. 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 tumor utilizado foi o Sarcoma 180, o qual foi descoberto em 1914 no 'Crocker Laboratory (Columbia University, New York)', sendo originalmente um tumor sólido, surgido espontaneamente na região axilar de camundongos. Foi um tumor inicialmente classificado como carcinoma mamário. Porém, após vários transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa por volta de 1919 e, desde então, mantém-se inalterado até os dias de hoje.

Para a avaliação do efeito antitumoral dois pterocarpanos foram utilizados, o composto 3,9-dimetoxipterocarpano (28) foi testado inicialmente, em virtude da grande disponibilidade da droga, em seguida o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) foi testado após obtenção de quantidades suficientes para o ensaio. O experimento foi realizado em camundongos albinos (*Mus musculus*) Swiss machos adultos sadios provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN - UFC). Esses animais foram divididos aleatoriamente em 7 grupos (n = 10 para cada grupo) com pesos variando entre 22 e 25 g ( $p > 0,05$ ).

O modelo tumoral - tumor sólido do tipo Sarcoma 180 - foi utilizado com 10 dias de implantação na região axilar direita. O animal doador, ou da manutenção, foi sacrificado por deslocamento cervical, sendo realizado assepsia com álcool iodado. Em

seguida, foi retirado o líquido ascítico da cavidade abdominal e preparado uma suspensão de células com 5,0 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem de células. Nos animais receptores, foram injetadas  $2 \times 10^6$  céls/0,5 mL na região axilar esquerda dos camundongos. Após 24 h de inoculação, o tratamento foi iniciado e realizado durante 7 dias consecutivos, utilizando como controle negativo, o veículo de diluição (DMSO 4 %) e como controle positivo, o quimioterápico 5-fluorouracil (25 mg/kg/dia). Para o composto 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**) foi estabelecida a dose de 50 mg/kg/dia e para o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**), foram estabelecidas as doses de 10 e 25 mg/kg/dia, ambas administradas via intraperitoneal (i.p.).

Todos os grupos foram mantidos sob as mesmas condições e sob regime de ingestão *ad libitum* de ração comercial (Purina, São Paulo) e água clorada durante todo o período do experimento.

Após sete dias de tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo seus órgãos (rins, baço e fígado) 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:

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

Onde:

A = média dos pesos dos tumores no grupo controle.

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

Os resultados (peso relativo dos órgãos e peso dos tumores) foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. A diferença entre os grupos foi analisada por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA) e considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

### **3.2.5.1 Análise Histopatológicas**

Imediatamente após a dissecação, os órgãos e os tumores foram armazenados em formol 3,7 % para posterior análise macroscópica. Em seguida, os tecidos foram processados, embebidos em parafina e secções de 3-5  $\mu\text{m}$  de espessura foram preparadas em lâminas. Depois de fixadas em formol 10 %, desparafinizadas em xilol por 15 min e desidratadas em álcool em crescentes concentrações, as lâminas foram lavadas em água destilada, coradas com Hematoxilina/eosina e examinadas em microscópio óptico (x400).

### **3.2.6 Estudo da metabolização do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) *in vitro*.**

#### **3.2.6.1 Reação de metabolismo oxidativo *in vitro*: reações de oxidação biomimética catalisadas por metaloporfirina sintética.**

As misturas reacionais (2 mL) em diclorometano continham 6mM de substrato (2,3,9-trimetoxipterocarpano ou 3,9-dimetoxipterocarpano), 0,3 mM do catalisador (Fe[TPP]Cl) e 9 mM de oxidante (iodozilbenzeno ou PhIO). Os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente, sob atmosfera de ar, em frascos de vidro e com agitação magnética. As reações de oxidação preliminares foram analisadas por CG-EM visando observar possíveis íons oxidados pelo incremento nos valores de  $m/z$ . O tempo de reação foi iniciado a partir da adição do PhIO com um total de 2 h. Após esse

período o solvente foi secado e a reação interrompida. A reação de metabolização com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) foi repetida cinco vezes com o objetivo de obter material suficiente para proceder a separação dos produtos por HPLC.

### **3.2.6.2 Análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM)**

As análises foram realizadas em Cromatógrafo a Gás Acoplado ao Espectro de Massa – Shimadzu-QP2010. As amostras dissolvidas em diclorometano (1 $\mu$ L) foram injetadas no CG/EM com temperatura de injeção de 220° C, pressão 75.4 KPa, fluxo total de 43,4 mL/min, fluxo na coluna 1,3 mL/minuto, velocidade linear de 41,4 cm/s.

### **3.2.6.3 Separação por CLAE**

As análises por CLAE foram realizadas em um sistema cromatográfico Shimadzu constituído de duas bombas LC-20AD, controlador CBN-20A, DIODE ARRAY DETECTOR (DAD)SPD-M20A e injetor Rheodyne 7725 empregando-se um mostrador de 20-50  $\mu$ L. As separações foram realizadas a 23° C em uma coluna ShimPack ODS-C-18 (205 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m, Shimadzu). O fluxo foi estabelecido em 1,0 mL/min, sendo composta por H<sub>2</sub>O (bomba A) e Acetonitrila (bomba B). Gradiente de eluição: 0,01 min, 20% B; 35 min 60% B; 40 min 100% B; 45 min 20% B; 50 min 20% B.

### **3.2.6.4 Purificação por cromatografia em camada delgada**

A amostra foi diluída em diclorometano e aplicada na base da placa preparativa. O solvente para eluição foi hexano - acetato de etila 7:3. Após a secagem do solvente, a placa foi exposta à luz UV e as regiões correspondentes às substâncias foram delimitadas. Três áreas foram selecionadas e nessa região a sílica foi retirada e as substâncias contidas em cada região foram extraídas com acetato de etila e submetidas à

análise por CG/MS. A substância que possuía massa suficiente foi submetida à avaliação da atividade citotóxica pelo método do MTT.



## 4. Resultados

### 4.1 Estudo da atividade citotóxica dos pterocarpanos

#### 4.1.1 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais e célula normal *in vitro*.

O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) mostrou-se bastante ativo em todas as linhagens tumorais testadas (tabela 2). A  $CI_{50}$  variou de 0,3 a 4,1  $\mu M$  onde o carcinoma de próstata (PC3) e o carcinoma de mama (MX-1) foram as linhagens mais resistentes. Já na linhagem de fibroblasto murino, o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas ( $CI_{50} > 80 \mu M$ ). Os derivados semi-sintéticos 3,9,10-trimetoxipterocarpano (**31**) e 3,4,9-trimetoxipterocarpano (**32**) foram testados nas linhagens SF-295, MDA-MB 435 e HCT-8, porém apresentaram  $CI_{50} > 80 \mu M$ . A doxorrubicina foi utilizada com controle positivo apresentando atividade em todas as linhagens testadas com  $CI_{50}$  de 0,03  $\mu M$  na linhagem HL-60 a 0,81  $\mu M$  na linhagem MDA-MB-435 (Tabela 2).

#### 4.1.2 Avaliação da atividade antileucêmica

Na tentativa de entender a cinética de atividade citotóxica do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) e determinar se atividade antiproliferativa em diversas linhagens leucêmicas, quatro linhagens tumorais foram utilizadas (Jurkat, Molt-4, K562 e HL60). O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) inibiu todas as linhagens testadas de maneira tempo e dose- dependente (Figura 15).

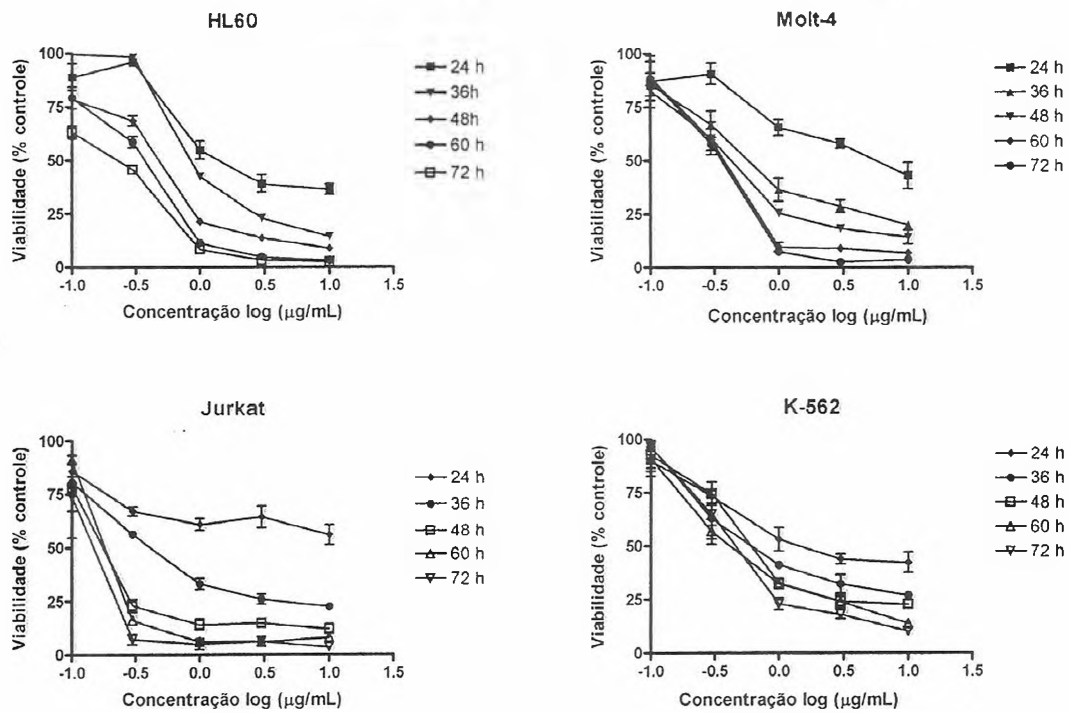
O tratamento das células com o pterocarpano por até 12 h não causou morte celular ( $CI_{50} > 31,8 \mu M$ ). Após 24 h de incubação as leucemias linfoblásticas (Jurkat e Molt-4) mostraram-se menos sensíveis ( $CI_{50} > 31,8$  e  $18,8 \pm 3,5 \mu M$ , respectivamente)

quando comparado com a HL60 ( $8,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$ ) e K562 ( $8,9 \pm 2,0 \mu\text{M}$ ). Após 36 h os valores variaram de 1,6 a  $3,5 \mu\text{M}$  sem diferença significativa entre as linhagens celulares. 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) atingiu atividade máxima após 48 h de incubação onde a K562 foi a linhagem mais resistente ( $2,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ), seguida pela Molt-4 e HL60 (ambas com  $\text{CI}_{50} > 1,4 \mu\text{M}$ ), e Jurkat ( $\text{CI}_{50} 0,3 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 3).

**Tabela 2** -Atividade citotóxica do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano e da doxorrubicina em linhagens de células tumorais. Os resultados são apresentados em valores de  $CI_{50}$  com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear para leucemia (HL-60), carcinoma de mama (MCF-7, MDAMB-435, MX-1), carcinoma de cólon (HCT-8), carcinoma de próstata (PC3), glioblastoma (SF-295) e fibroblasto murino (L929).

Composto	Linhagem celular $CI_{50}$ (CI 95%) $\mu\text{g/mL}$ ( $\mu\text{M}$ )							
	HL-60	HCT-8	MDA-MB 435	MCF-7	MX-1	SF295	PC-3	L929
2,3,9-trimetoxi- pterocarpano	0,09 (0,3) 0,07-0,12	0,7 (2,3) 0,3-1,6	0,2 (0,6) 0,08 – 0,7	0,7 (2,3) 0,4-1,4	1,3 (4,1) 0,7-2,3	0,5 (1,6) 0,2-1,4	1,3 (4,1) 0,7-2,3	> 25 (80)
3,9-dimetoxi- pterocarpano*	10,4 (38,5) 8,9-12,0	14,9(55,4) 12,6-17,8	n.d.	19,5(72,1) 15,6-24,2	n.d	n.d	n.d	n.d
Doxorrubicina	0,02 (0,03) 0,01-0,02	0,04 (0,07) 0,03 – 0,05	0,47 (0,81) 0,34 – 0,65	0,20 (0,34) 0,17 - 0,24	0,076 (0,13) 0,054-0,10	0,16 (0,27) 0,13-0,23	0,45 (0,77) 0,38-0,68	n.d.

\* Dados obtidos na dissertação de mestrado (Militão, 2005) para efeito de comparação.



**Figura 15** – Efeito do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano na viabilidade de HL60, Molt-4, Jurkat e K562. As células foram expostas ao composto nas concentrações de 0,1 a 10 µg/mL por 24, 36, 48, 60 e 72 h. Os controles foram considerados como 100% da viabilidade. Os pontos da curva foram obtidos da média de quatro experimentos independentes.

**Tabela 3** - Citotoxicidade do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano em células leucêmicas. Os dados são apresentados como valores de  $CI_{50} \pm$  E.P.M. para as linhagens HL60 (leucemia promielocítica), K562 (leucemia mielóide crônica), Jurkat e Molt-4 (leucemias linfocíticas) a partir de dois experimentos independentes .

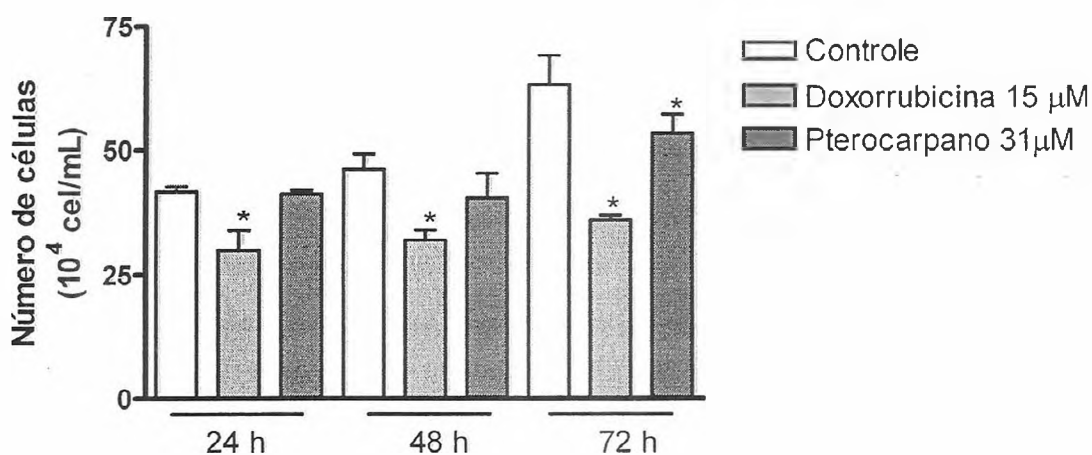
Células	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas	36 horas	48 horas	60 horas	72 horas
	$\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$	$\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$	$\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$	$\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$	$\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$	$\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$	$\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$	$\mu\text{g/ml}(\mu\text{M})$
HL-60	>10 (31,8)	>10 (31,8)	>10 (31,8)	$2,5 \pm 0,3$ (8,0)*	$1,1 \pm 0,03$ (3,5)*	$0,4 \pm 0,06$ (1,4)	$0,3 \pm 0,02$ (0,9)	$0,2 \pm 0,02$ (0,6)
JUKART	>10 (31,8)	>10 (31,8)	>10 (31,8)	>10 (31,8)	$0,5 \pm 0,02$ (1,6)*	$0,1 \pm 0,03$ (0,3) <sup>a</sup>	$0,2 \pm 0,02$ (0,6)	$0,1 \pm 0,02$ (0,3)
K-562	>10 (31,8)	>10 (31,8)	>10 (31,8)	$2,8 \pm 0,67$ (8,9)*	$1,0 \pm 0,24$ (3,3)	$0,8 \pm 0,1$ (2,5) <sup>a</sup>	$0,5 \pm 0,09$ (1,6) <sup>a</sup>	$0,5 \pm 0,03$ (1,6) <sup>a</sup>
MOLT-4	>10 (31,8)	>10 (31,8)	>10 (31,8)	$5,9 \pm 1,1$ (18,8)* <sup>a</sup>	$1,1 \pm 0,36$ (3,5)	$0,4 \pm 0,49$ (1,4)	$0,3 \pm 0,36$ (0,9)	$0,3 \pm 0,04$ (0,9) <sup>a</sup>

\*,  $p < 0,05$   $CI_{50}$  em cada linhagem celular comparadas por ANOVA seguida de Newman-Keuls

a,  $p < 0,05$   $CI_{50}$  em cada tempo comparadas por ANOVA seguida de Newman-Keuls

#### 4.1.3 Avaliação da atividade antiproliferativa em células mononucleadas do sangue periférico.

O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) testado na concentração de 31,0  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{g/mL}$ ) não reduziu o número de células mononucleadas após 24 e 48 h de incubação e após 72 h causou 19% de inibição (Figura 16). A doxorubicina testada na concentração de 15  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{g/mL}$ ) após 24, 48 e 72 h de incubação reduziu o número de células em 28, 31 e 43%, respectivamente (Figura 16).



**Figura 16** - Atividade do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano e da doxorubicina na concentração de 30  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{g/mL}$ ) e 15  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{g/mL}$ ), respectivamente, em células mononucleadas do sangue periférico avaliada pela exclusão do azul de tripan. Os dados correspondem a média  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$ , ANOVA seguida Newman-Keuls.

## 4.2. Estudo do mecanismo de ação

Estudos anteriores mostraram que os compostos isolados de *Platymiscium floribundum* 2,3,9- trimetoxipterocarpano (27), 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (13), 3,9-dimetoxipterocarpano (28), 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (30) apresentaram atividade citotóxica em células tumorais porém com mecanismos diferentes. Os compostos 2,3,9- trimetoxipterocarpano (27) e 3,9-dimetoxipterocarpano (28) causaram parada no ciclo celular em G2/M e morte por apoptose, enquanto que os compostos 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (30) e 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (13) causaram necrose (Militão 2005). Em virtude desses resultados todos os pterocarpanos isolados de *Platymiscium floribundum* foram inicialmente testados para determinação do mecanismo de ação citotóxica.

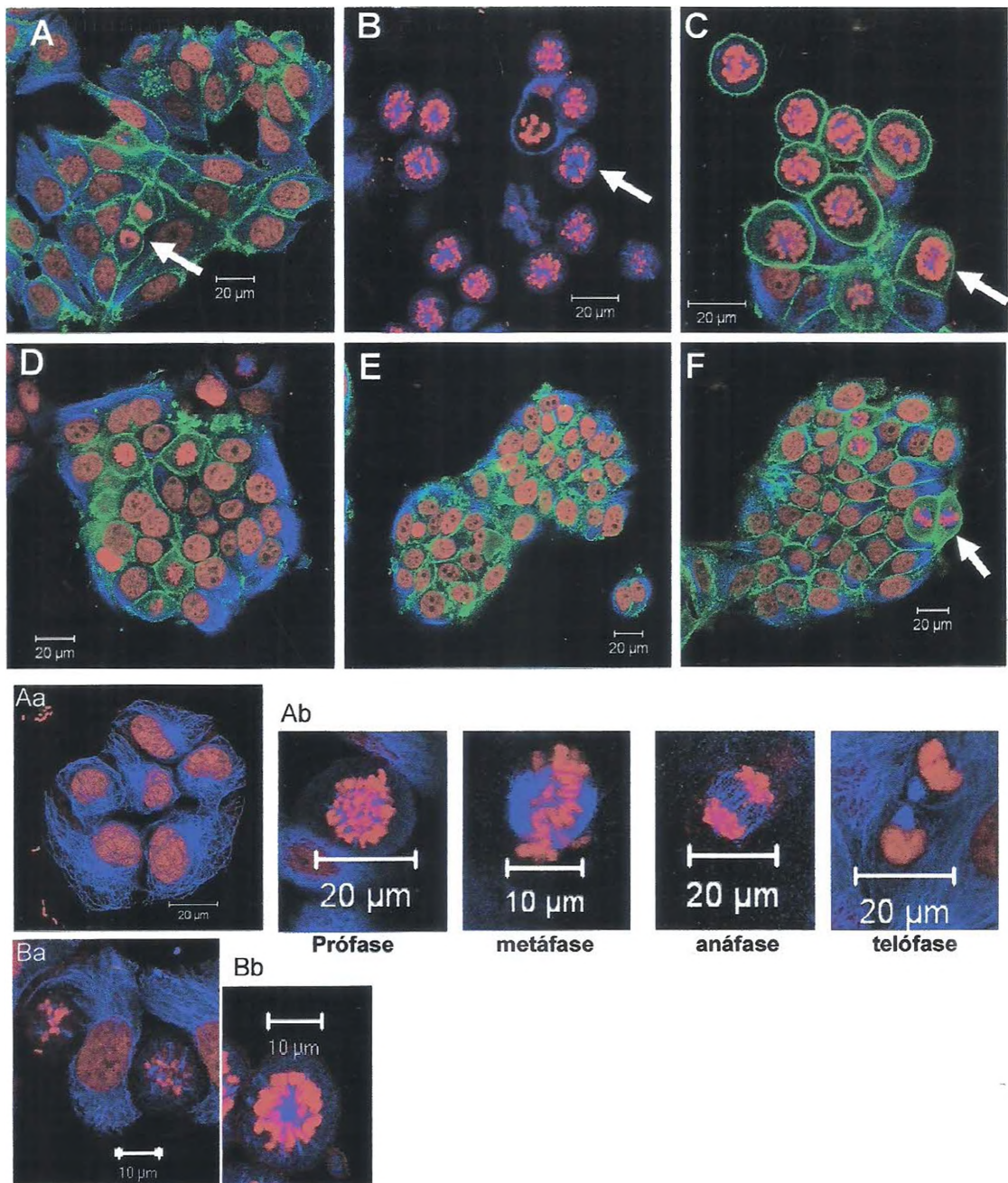
### 4.2.1. Imunofluorescência para citoesqueleto

No controle, foi possível observar todas as fases da mitose, mostrando que existe progressão das células em divisão (Figura 17). A marcação do citoesqueleto e do núcleo revelou que muitas células MCF-7 tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) na concentração de 2,5 µg/mL estavam bloqueadas na mitose com morfologia característica de prófase/prometáfase, sem causar alteração na actina ou nos microtúbulos (Figura 17). A maioria das células bloqueadas na mitose apresentava os cromossomos distribuídos na célula em forma de anel com o fuso monoastral (Figura 17). A presença de figuras mitóticas também foi observada nas células tratadas com 3,9-dimetoxipterocarpano (28), 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (13) e 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (29) na concentração de 25 µg/mL. Não

t

houve aumento no número de células na mitose após tratamento com o composto 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**30**) (25 µg/mL). Nenhuma alteração nos microtúbulos e na actina foi detectada (figura 17).





**Figura 17** - Imunofluorescência para citoesqueleto em células MCF-7. Azul (tubulina), verde (actina) e vermelho (núcleo). A, Aa (intérfase) e Ab (mitose) : controle; B, Ba (interfase), Bb (mitose): 2,3,9-trimetoxipterocarpano 2,5 μg/mL; C: 3,9-dimetoxipterocarpano 25 μg/mL; D: 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano 25 μg/mL; E: 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano 25 μg/mL; F: 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano 25 μg/mL. Seta branca: mitose.

#### 4.2.2. Índice de fases

Nesse ensaio também foi possível observar no controle todas as fases da mitose, indicando que existe progressão das células em divisão (Tabela 4). O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) (2,5 µg/mL) aumentou significativamente o número de células em prófase. Nenhuma célula foi observada nas fases subseqüentes da mitose, mostrando que esse composto causa um bloqueio na mitose na transição prófase/prometáfase. Os compostos 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**) e 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**29**) também induziram uma parada em prófase/prometáfase, porém foram observadas algumas células em mitose, anáfase e telófase, sugerindo que algumas células passam pela prófase e não são bloqueadas ou conseguem sair do bloqueio. O composto 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**13**) causou uma leve parada das células em prófase e o composto 3-4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**30**) não causou parada na mitose.

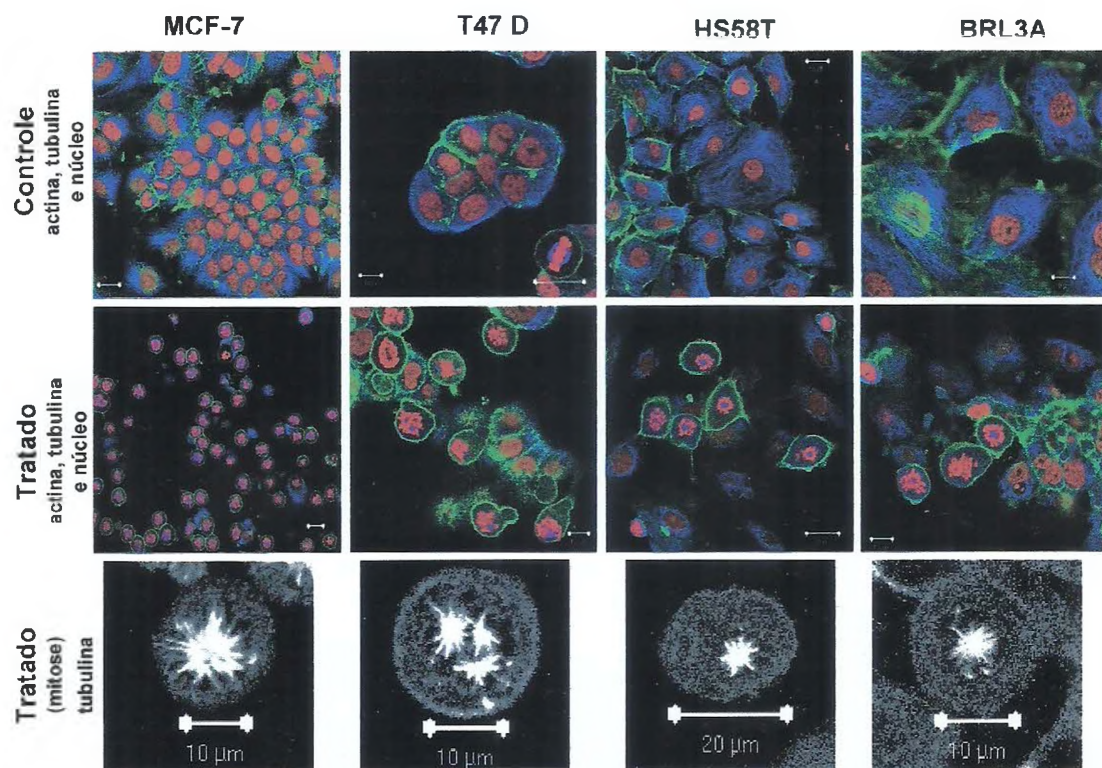
**Tabela 4** - Índice de fases em células MCF-7 tratadas por 24 h com os compostos 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**), 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**), 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**13**), 3-4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**30**) e 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**29**). O número de células na interfase (I), prófase (P), metáfase (M), anáfase (A) e telófase (T) foi determinado após contagem de 1000 células.

Composto	Concentração μg/mL (μM)	I	P	M	An	T
Controle	-	971.5 ± 3.5	14.5 ± 3.5	5.0 ± 0	6.0 ± 0	3.0 ± 0
<b>27</b>	2,5 (8)	696 ± 21.2	304 ± 21.2 *	0	0	0
<b>28</b>	25 (90)	766 ± 19.8	225 ± 26.9 *	8 ± 5.6	0	1 ± 1.4
<b>13</b>	25 (92)	959 ± 5.6	32.5 ± 2.1 *	3.5 ± 0.7	4.5 ± 3.5	0.5 ± 0.7
<b>30</b>	25 (87)	991.5 ± 3.5	8 ± 2.8	0.5 ± 0.7	0	0
<b>29</b>	25 (87)	883 ± 12.7	105 ± 21.9 *	7 ± 7	2 ± 1.4	2.5 ± 0.7

\*  $p < 0.05$  comparado pelo teste do  $\chi^2$ .

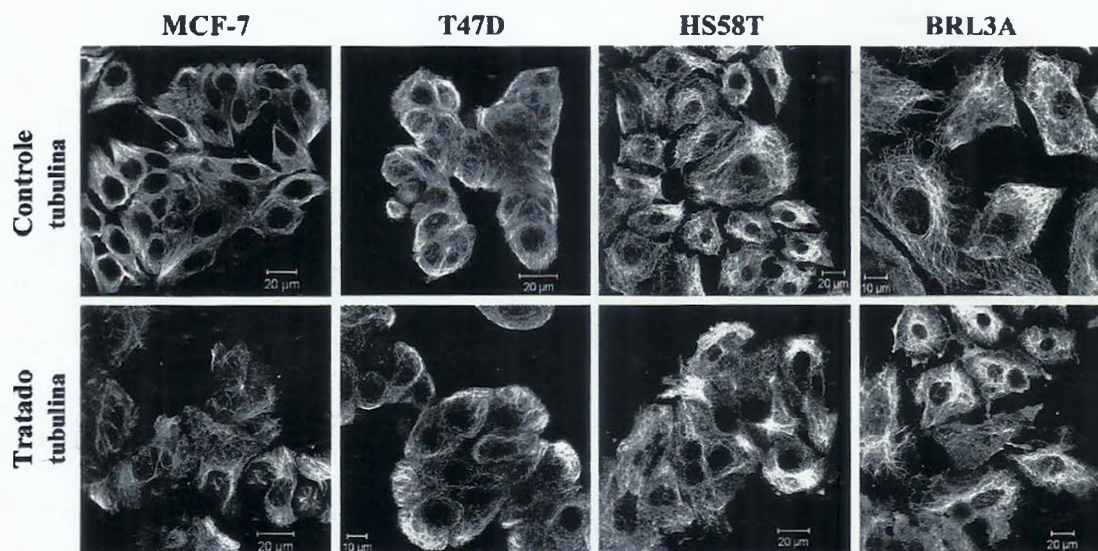
#### **4.2.3. Imunofluorescência para citoesqueleto e determinação do índice de fases num painel de três linhagens tumorais e uma linhagem normal.**

O experimento anterior mostrou que o 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) induziu um bloqueio de um maior número de células em prófase, mesmo sendo testado em concentração dez vezes menores que os outros pterocarpanos, por isso somente essa droga foi testada num painel maior de linhagens. Todas as linhagens tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) (2,5 µg/mL) por 24 h apresentaram grande número de células em prófase/prometáfase (Figura 18). A maioria das células apresentava um fuso mitótico monopolar (Figura 18), porém também foram observados fusos bipolares e tripolares, principalmente na linhagem T47D. Não houve alteração na morfologia dos microtúbulos na interfase (Figura 19). O índice de fases mostrou que o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano testado na concentração de 2,5 µg/mL por 24 h causou parada na mitose tanto em células tumorais (MCF-7 e T47D) quanto na célula normal (BRL3A), mostrando que a droga não foi seletiva para essas células tumorais (tabela 5). Além disso, a característica do bloqueio é a mesma, ou seja, os cromossomos não conseguem se alinhar na placa metafásica, permanecendo bloqueado na prometáfase.



**Figura 18** – Imagens de células MCF-7, T47D, HS58T e BRL3A incubadas com meio (controle) ou tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano na concentração de 2,5 µg/mL por 24h. Verde: actina; azul: tubulina e vermelho: núcleo.





**Figura 19** - Imagens da rede de microtúbulos (tubulina) de células MCF-7, T47D, HS58T e BRL3A incubadas com meio (controle) ou tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano na concentração de 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 24h.

**Tabela 5** - Índice de fases em células MCF-7, T47D e BRL3A tratadas por 24 h com os composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano na concentração de 2,5 µg/mL. O número de células na interfase (I), prófase (P), metáfase (M), anáfase (A) e telófase (T) foi determinado após contagem de 1000 células.

Células	Tratamento	I	P	M	An	T
	Controle	971,5 ± 0,7	21,0 ± 1,4	3,5 ± 0,7	1,0 ± 0	3,0 ± 1,4
MCF-7	(27)	759 ± 36,8	241 ± 36,8*	0	0	0
	Controle	979 ± 2,8	10,5 ± 0,7	5,5 ± 0,7	3,0 ± 1,4	2 ± 0
T47D	(27)	799,5 ± 6,4	200,5 ± 6,4*	0	0	0
	Controle	980,5 ± 0,7	6,5 ± 2,1	7,5 ± 0,7	2,5 ± 0,7	3,0 ± 1,4
BRL3A	(27)	913 ± 11,3	87 ± 11,3*	0	0	0

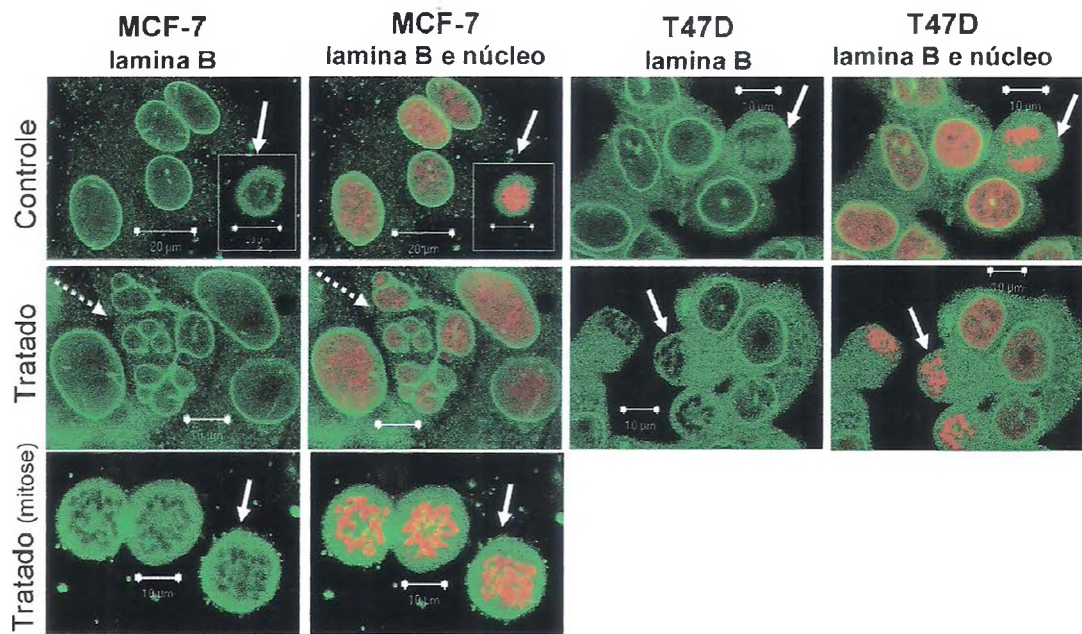
\*  $p < 0.05$  comparado pelo teste do  $\chi^2$ .

#### 4.2.4. Imunofluorescência para Lamina B

Anteriormente foi mostrado que as células tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) apresentavam parada do ciclo celular na mitose em que as células apresentavam morfologia característica da prófase ou prometáfase. Na transição da prófase para a prometáfase ocorre a quebra da membrana nuclear e os cromossomos se espalham. Ao marcar a lamina B, um componente do envelope nuclear, é possível determinar se as células bloqueadas estão na prometáfase.

Células MCF-7 tratadas com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) na concentração de 2,5 µg/mL por 24 h que estavam na mitose não apresentavam membrana nuclear, ou seja, os cromossomos estavam condensados e soltos no citoplasma mostrando que o fármaco induz um bloqueio em prometáfase. O mesmo padrão foi observado em células T47D tratadas com o pterocarpano (**27**). As células MCF-7 na interfase apresentavam membrana nuclear e algumas células multinucleadas foram encontradas (figura 20).



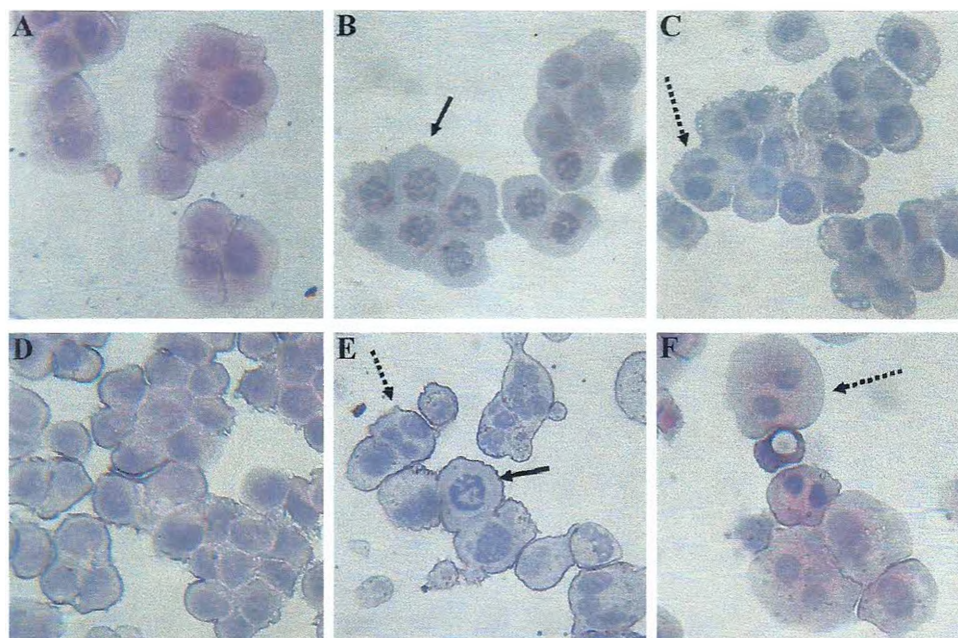


**Figura 20** – Imunofluorescência para lâmina B. Fotografias de células MCF-7 e T47D marcadas com anti lamina B (verde) e núcleo (vermelho). Setas brancas inteiras: mitose. Setas pontilhadas: interfase.

#### 4.2.5. Avaliação do efeito da droga tempo-dependente através da análise morfológica.

O tratamento das células MCF-7 com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano na concentração de 2,5 µg/mL por 24 h causou um bloqueio na prometáfase, como exemplificado anteriormente. Algumas células multinucleadas também foram observadas (figura 21). Com o objetivo de verificar se o bloqueio visualizado após 24h de tratamento com a droga era reversível, as células MCF-7 tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (2,5 µg/mL) foram lavadas e reincubadas em meio livre do fármaco por mais 24h. Após o período livre da droga, o bloqueio foi aparentemente revertido, ou seja, não foi encontrado células em prometáfase e a maioria das células estava em interfase (Figura 21).

Após 48 h de tratamento com o pterocarpano na concentração de 2,5 µg/mL algumas células MCF-7 na mitose em prometáfase ainda foram visualizadas e o número de células multinucleadas aumentou. Células na mitose não foram observadas após reincubação em meio livre do fármaco e uma grande quantidade de células multinucleadas estava presente, além de células com características morfológicas de apoptose (Figura 21).



**Figura 21** – Fotografias de células MCF-7 coradas com hematoxilina e eosina. A e D: controle, 24 e 48 h de incubação, respectivamente. B e E: células tratadas com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (2,5 µg/mL) por 24 e 48 h, respectivamente. C e F: células tratadas com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (2,5 µg/mL) por 24 e 48 h, respectivamente e reincubadas em meio livre de droga por 24 h. Seta preta: mitose. Seta pontilhada: célula multinucleada.

## 2.6. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.

Após 24 h de tratamento com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) (2,5 µg/mL) houve um aumento significativo no número de células em G2/M (32%) comparado com controle (20,5%). Um leve aumento no número de células com o DNA fragmentado foi observado. A reincubação das células MCF-7 em meio livre de droga, causou reversão do bloqueio (tabela 6). A incubação das células com a droga por 48 h também aumentou a porcentagem de células tetraplóides (38,5 %) comparado com o controle (19,8 %). A porcentagem de células com DNA fragmentado aumentou de 1,1% no controle para 14,8% nas células tratadas. A reincubação em meio livre de droga não reverteu o bloqueio em G2/M e a porcentagem de células com DNA subdiploide permaneceu significativamente maior do que o controle (tabela 6).

**Tabela 6** - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo. As células MCF-7 foram tratadas com o 2,3,9-trimetoxipterocarpano (2.5 µg/mL) por 24 h e 48 h, lavadas (l) e reincubadas (r) por 24h em meio livre de droga. Dados são mostrados em porcentagem e representam a média de três experimentos ± DP.

	Sub G0	G0/G1	S	G2/M
Controle 24 h	0.9 ± 0.1	53.1 ± 1.9	17.5 ± 1.1	20.51 ± 1.4
Tratado 24 h	1.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	40.4 ± 2.0 <sup>a</sup>	15.6 ± 3.2	32 ± 1.7 <sup>a</sup>
Controle l/r 24 h	0.3 ± 0.1	57.9 ± 2.1	17.7 ± 0.7	19.7 ± 1.5
Tratado l/r 24 h	0.9 ± 0.3 <sup>b</sup>	57.8 ± 1.8	19.5 ± 0.7	16.0 ± 1.2 <sup>b</sup>
Controle 48 h	1.1 ± 0.4	60.7 ± 1.7	13.2 ± 0.9	19.8 ± 1.7
Tratado 48 h	14.8 ± 2.2 <sup>c</sup>	31.4 ± 2.7 <sup>c</sup>	11.8 ± 0.9	38.5 ± 4.5 <sup>c</sup>
Controle 48 l/r 24h	4.0 ± 1.0	66.9 ± 3.7	9.4 ± 1.3	15.0 ± 1.3
Tratado 48h l/r 24h	13.4 ± 1.8 <sup>d</sup>	47.9 ± 5.1 <sup>d</sup>	9.8 ± 1.0	27.6 ± 3.6 <sup>d</sup>

a, p < 0,05 comparado com o controle 24 h pelo teste t.

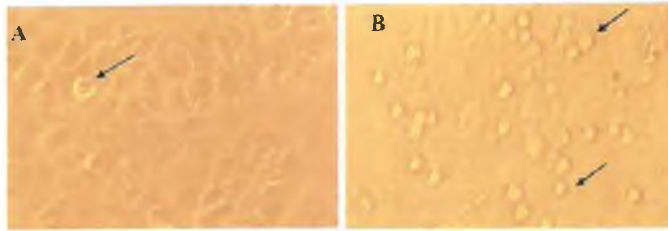
b, p < 0,05 comparado com o controle l/r 24 h pelo teste t.

c, p < 0,05 comparado com o controle l/r 48 h pelo teste t.

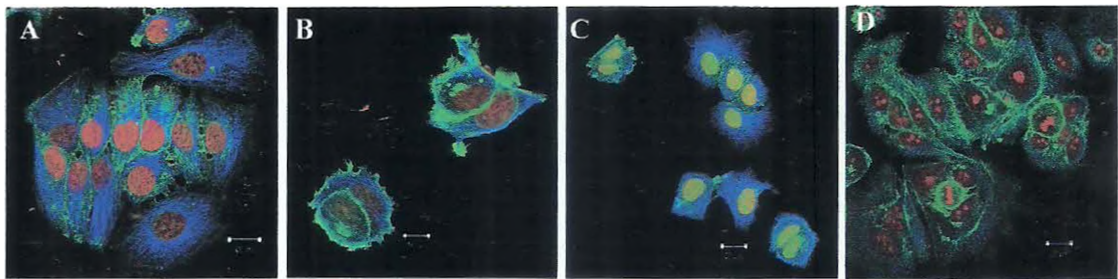
d, p < 0,05 comparado com o controle 48h l/r 24 h pelo teste t.

### **1.2.7. Análise das células mitóticas após um curto tratamento com o pterocarpano 27**

As células em mitose tendem a se desprender parcialmente da placa mostrando uma característica arredondada quando visualizadas vivas (figura 22). As células MCF-7 quando tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) (2,5 µg/mL) por 24 h são bloqueadas na mitose. Essas células em mitose foram separadas por ação mecânica e reincubadas em uma nova placa com meio livre de droga. Após 5h de incubação no meio, as células já haviam completado a mitose e após 24 h de incubação no meio as células apresentavam morfologia igual ao controle (figura 23). As células que permaneceram aderidas e que não estavam na mitose também apresentaram morfologia semelhante ao controle, com exceção da presença de algumas células multinucleadas (figura 23).



**Figura 22** – Fotomicrografia de células MCF-7 vivas em microscópio de inversão. A: controle. B: células tratadas com o 2,3,9-trimetoxipterocarpano na concentração de 2,5 µg/mL, por 24 h. Seta preta: mitose.



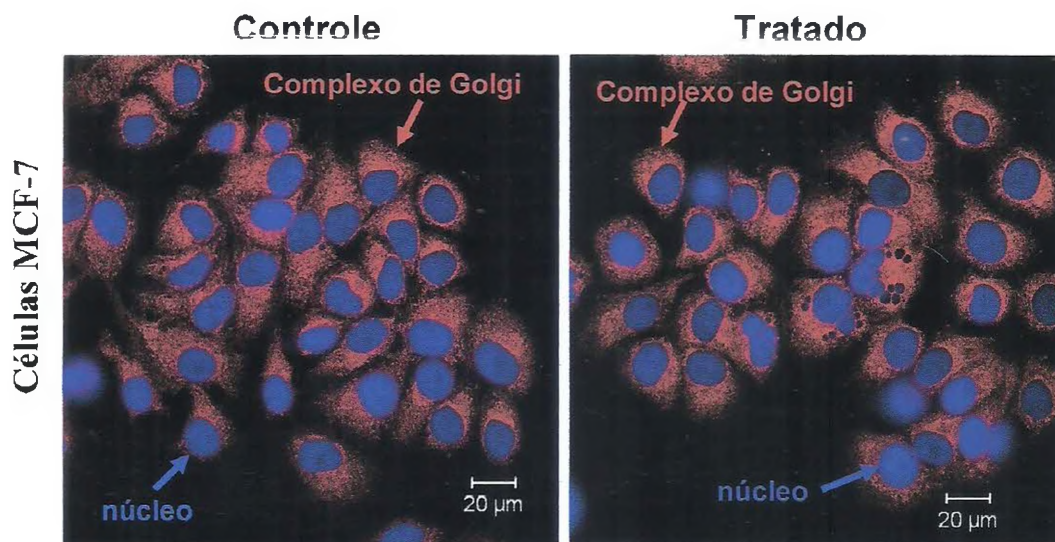
**Figura 23** – Imagens de células MCF-7 coradas com Cy-5 (tubulina, azul), faloidina-FITC (actina, verde) e iodeto de propídeo (núcleo, vermelho) obtidas em microscópio confocal. A: controle. A, B e C: Células previamente tratadas com o 2,3,9-trimetoxipterocarpano na concentração de 2,5 µg/mL por 24 h, separadas por ação mecânica e reincubadas em meio livre de droga por 5h (B) e por 24 h (C) ou que permaneceram aderidas após procedimento de separação.



#### 4.2.8. Posicionamento do Complexo de Golgi em células MCF-7.

Nos resultados anteriores foi demonstrado que as células tratadas com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) eram bloqueadas em prometáfase, muitas apresentando um fuso monoastral. Fármacos que inibem a proteína motora EG5 também causam esse efeito. Essa proteína pertence à família das quinesinas mitóticas que faz parte da superfamília das quinesinas, sendo que outras quinesinas motoras são envolvidas na localização de organelas como o complexo de Golgi no citoplasma e todas elas têm em comum o domínio motor (Mayer et al., 1999). Dessa forma as células MCF-7 foram tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (2,5 µg/mL) por 24 h e em seguida o complexo de Golgi foi marcado com *Bodipy ceramide*. O ensaio mostrou que não existe diferença entre a localização dessa organela no tratado quando comparado com o controle (figura 24). Portanto o pterocarpano **27** não inibe as quinesinas convencionais, porém não é possível determinar por esse experimento se o composto inibe a quinesina mitótica EG5 de forma específica. Também é possível observar que existem células multinucleadas na população tratada (figura 24).

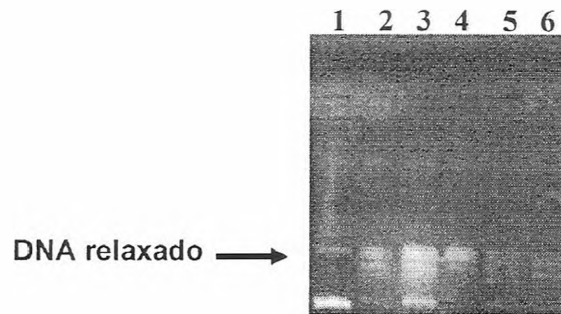




**Figura 24** – Imagens de células MCF-7 incubadas com meio (controle) ou tratadas com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (2,5  $\mu$ g/mL) com marcação para o complexo de Golgi (vermelho) e para o núcleo (azul).

#### 4.2.9. Ensaio de Relaxamento do DNA

A análise do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) sobre a atividade da topoisomerase I foi realizada através do ensaio de relaxamento de DNA plasmidial superhelicoidizado. Como visto na figura 25, nenhuma das concentrações testadas (0,4 e 2,0  $\mu\text{g/mL}$ ), linhas 5 e 6, respectivamente, do pterocarpano foi capaz de alterar a topologia do DNA. Camptotecina 0,1  $\mu\text{M}$ , usada como controle positivo (linha 3), inibiu a atividade da topoisomerase I que resulta na inibição da conversão do substrato superhelicoidizado para a forma relaxada. Fatos esses não observados pelas outras amostras (linhas 2, 3 e 4), uma vez que as bandas notadamente revelaram o relaxamento de DNA, ao contrário do que acontece na linha 1 (branco), dessa vez explicado pela ausência da própria topoisomerase I.



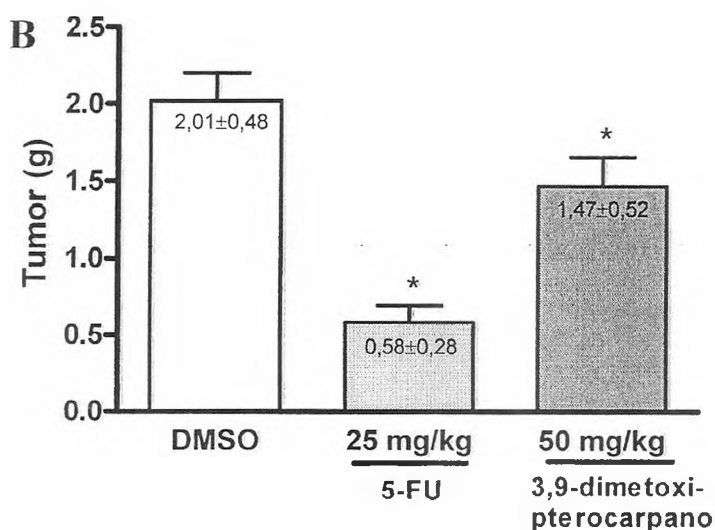
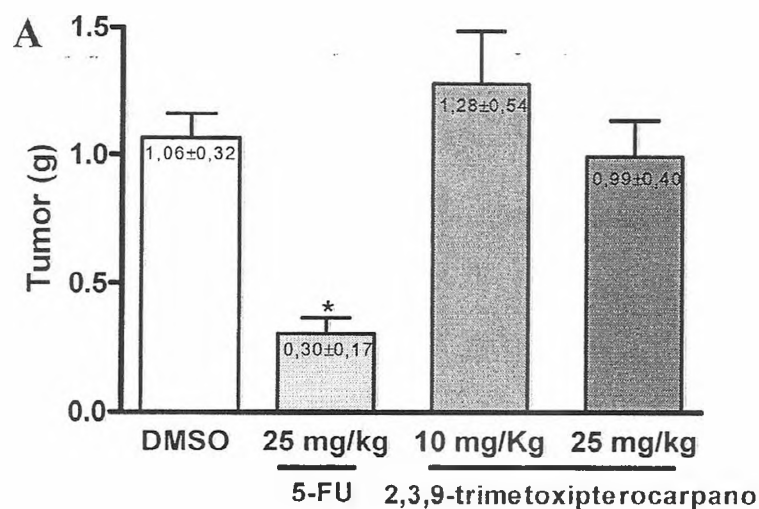
**Figura 25** – Avaliação da atividade do 2,3,9-trimetoxipterocarpano no relaxamento de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG), por eletroforese horizontal em gel de agarose 1 % . Linha 1, 250 ng de pRYG incubados somente na presença do solvente (DMSO 10 %) (branco); Linha 2, 250 ng de pRYG na presença do solvente (DMSO 10 %) e 4 U de Topoisomerase I (controle negativo); Linha 3, Camptotecina 0,1 mM (controle positivo); Linha 4 – DNA relaxado (marcador); Linha 5 e 6, 250 ng de pRYG com 4 U de Topoisomerase I na presença de 0,4 e 2  $\mu\text{g/mL}$  de 2,3,9-trimetoxipterocarpano, respectivamente. Revelação por brometo de etídio.

#### 4.3. Estudo da atividade antitumoral de pterocarpanos em camundongos transplantedos com Sarcoma 180.

O ensaio de atividade antitumoral foi realizado inicialmente com o composto 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**) devido à disponibilidade de grande quantidade desse composto. O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) também foi submetido ao experimento porém em concentrações menores (10 e 25 mg/kg/dia ou 31 e 79  $\mu\text{mol/Kg/dia}$ ) que àquelas usadas para o 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**) (50 mg/kg/dia ou 176  $\mu\text{mol/Kg/dia}$ ).

O tratamento consistiu na administração de 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**) i.p. (50 mg/kg/dia ou 176  $\mu\text{mol/Kg/dia}$ ) ou 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) (10 e 25 mg/kg/dia ou 31 e 79  $\mu\text{mol/Kg/dia}$ ) durante 7 dias consecutivos. No 8<sup>o</sup> dia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para a retirada do tumor, fígado, baço, rins e estômago.

Dentre os compostos testados, apenas 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**) 50 mg/kg/dia foi capaz de diminuir o crescimento da massa tumoral ( $1,47 \pm 0,5$  g) de forma significativa quando comparado ao controle negativo (DMSO 4 %) ( $2,00 \pm 0,48$  g), o mesmo acontecendo com o grupo controle positivo tratado por 5-FU (25 mg/Kg/dia ou 192  $\mu\text{mol/Kg/dia}$ ) ( $0,58 \pm 0,28$  g). Assim, 5-FU 25 mg/Kg/dia ou 79  $\mu\text{mol/Kg/dia}$  e 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**) 50 mg/kg ou 176  $\mu\text{mol/Kg/dia}$  revelaram, respectivamente, um percentual de inibição de crescimento do tumor de  $71,1 \pm 5,4$  % e  $27,15 \pm 9,3$  % ( $p < 0,05$ ). O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) nas doses de 10 mg/kg e 25 mg/kg ou 31 e 79  $\mu\text{mol/Kg/dia}$  não foi eficaz em reduzir a massa tumoral ( $1,28 \pm 0,5$  e  $0,99 \pm 0,4$  g, respectivamente) ( $p > 0,05$ ) comparado com o controle ( $1,06 \pm 0,32$  g) (Figura 26).



**Figura 26** - Massa tumoral úmida de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento. A: O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) na dose de 25 mg/kg/dia (192  $\mu$ mol/Kg/dia) foi usado como controle positivo. A: O composto 2,3,9-dimetoxipterocarpano foi testado na concentração de 10 e 25 mg/kg/dia ou 31 e 79  $\mu$ mol/Kg/dia. B: O composto 3,9-dimetoxipterocarpano foi testado na concentração de 50 mg/Kg/dia (176  $\mu$ mol/Kg/dia). \*  $p < 0,05$  comparado com o controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls test.

#### 4.3.1. Análise Histopatológica dos Órgãos

O peso relativo úmido dos órgãos mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao baço dos grupos tratados com 5-FU 25 mg/kg/dia i.p., demonstrando redução da massa do órgão quando comparado ao grupo controle e o fígado e baço dos animais tratados com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) 10 mg/kg/dia apresentaram um aumento na massa quando comparado ao grupo controle (Tabela 5).

A análise histológica dos órgãos mostrou que no controle (DMSO 4%), o fígado apresentava congestão da veia porta e da veia centrolobular, discreta a moderada tumefação celular dos hepatócitos e hiperplasia das células de Kupffer. Os rins apresentavam hemorragia glomerular e intersticial, discreta tumefação do epitélio tubular e raros cilindrohialinos e no baço foi visualizado folículos linfóides ligeiramente indefinidos provavelmente em consequência dos cortes estarem esgarçados e alguns megacariócitos. O fígado e o baço dos animais tratados com 3,9-dimetoxipterocarpano (28) apresentaram as mesmas alterações histológicas do controle enquanto o rim apresentou moderada tumefação celular e moderada vacuolização do epitélio tubular, alterações reversíveis de toxicidade. Nos órgãos dos animais tratados com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) 10 mg/kg/dia foram encontradas as mesmas características do controle sem evidência de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade.

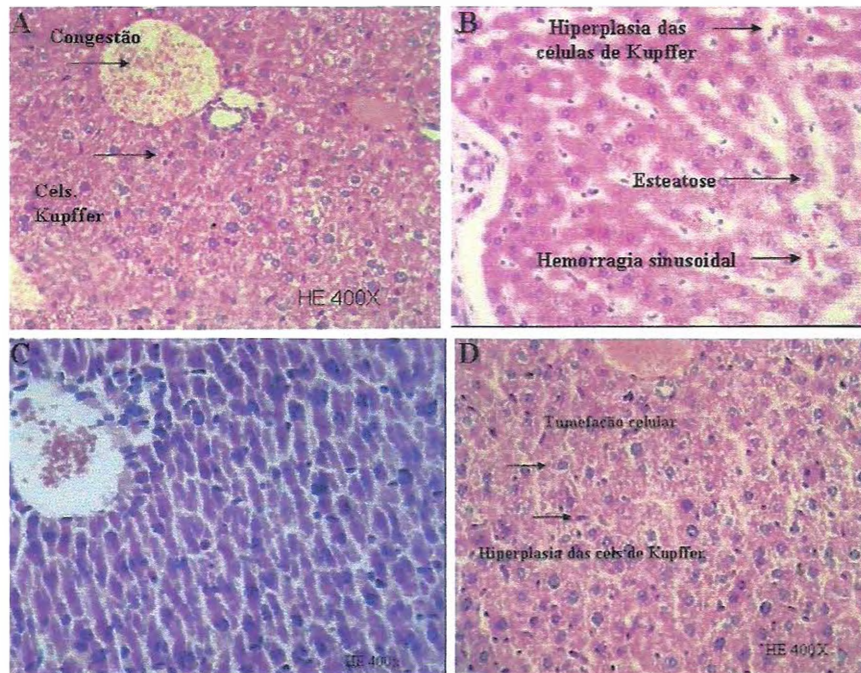
Os animais tratados com 5-FU (25 mg/kg/dia) apresentaram fígados com tumefação celular, trechos focais de esteatose em microgotas, hemorragia sinusoidal e hiperplasia das células de Kupffer. Enquanto nos rins foi observado hemorragia glomerular e tubular, presença de cilindros hialinos e tumefação do epitélio tubular. O baço, significativamente menor, apresentou folículos evidentes e circunscritos.

Os tumores dos animais do grupo controle negativo e dos grupos tratados com 3,9-dimetoxipterocarpano 50 mg/kg/dia i.p. e 2,3,9-trimetoxipterocarpano 10 mg/kg/dia v.o. mostraram características de neoplasia maligna constituída por células redondas, pleomórficas com binucleação, raras mitoses e áreas de coagulação e invasão muscular. Os tumores dos animais tratados com 5-FU, como descrito acima, apresentaram morfologia típica de células neoplásicas, raras mitoses e áreas de necrose de coagulação muito mais extensas do que nos outros grupos (**Figura 30**).

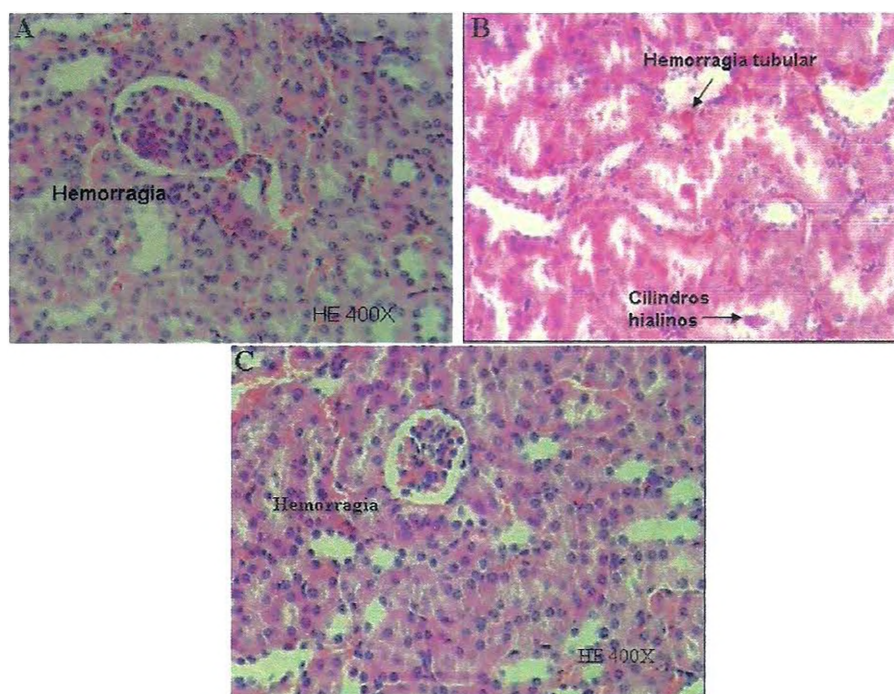
**Tabela 7** – Efeito sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento com 2,3,9-trimetoxipterocarpano nas doses de 10 e 25 mg/kg/dia e 3,9-dimetoxipterocarpano na dose de 50 mg/kg/dia. O controle negativo foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo. Os valores correspondem à média (n = 10) ± E.P.M.

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Peso final dos animais (g)	g/100g de massa corpórea		
			Fígado	Rim	Baço
Controle	-	29,8 ± 3,5	4,8 ± 0,3	1,4 ± 0,5	0,5 ± 0,2
5-FU	25	27,5 ± 4,0	4,5 ± 0,5	1,2 ± 0,2	0,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
Composto 27	10	29,7 ± 3,1	5,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2 <sup>a</sup>
	25	33,9 ± 3,6 <sup>a</sup>	4,8 ± 0,7	1,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1
Controle	-	32,5 ± 2,7	4,8 ± 0,8	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1
5-FU	25	25,0 ± 5,3 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,8	1,0 ± 0,2	0,2 ± 0,1 <sup>a</sup>
Composto 28	50	33,3 ± 2,5	4,4 ± 0,4	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,2

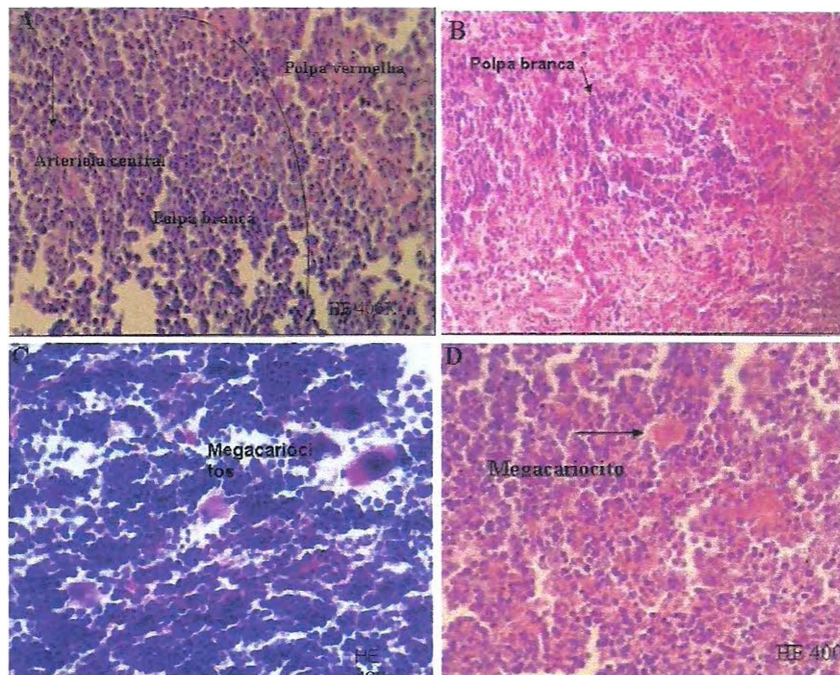




**Figura 27** - Análise histológica do fígado de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). Os compostos 3,9-dimetoxipterocarpano e 2,3,9-trimetoxipterocarpano foram administrados via intraperitoneal (50 mg/kg/dia, C) (10 mg/kg/dia, D), respectivamente. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.

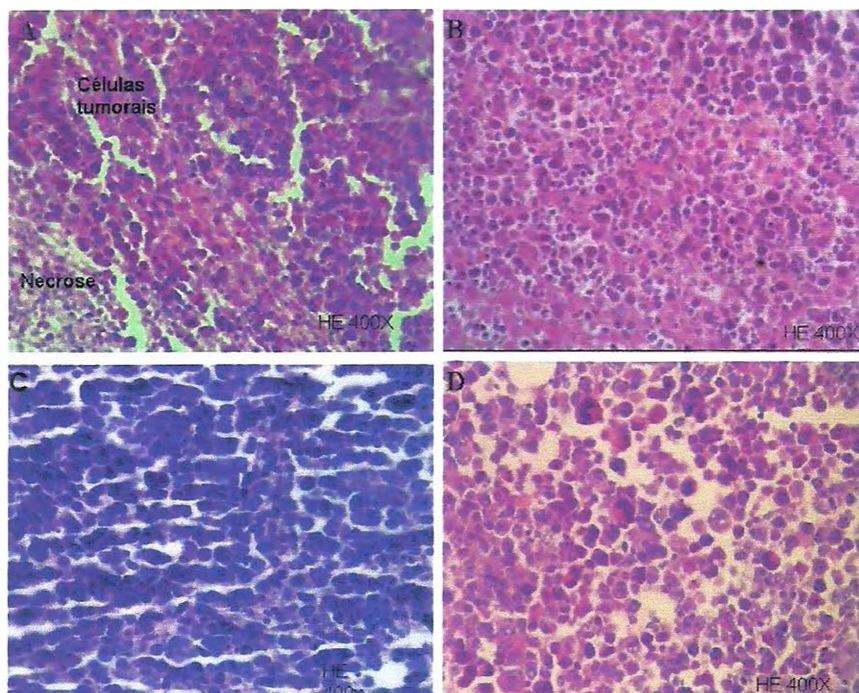


**Figura 28** - Análise histológica do rim de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano foi administrado via intraperitoneal (10 mg/kg/dia. C). Não foi possível fotografar o rim dos animais tratados com 3,9-dimetoxipterocarpano (50 mg/kg/dia). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.



**Figura 29** - Análise histológica do baço de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). Os compostos 3,9-dimetoxipterocarpano e 2,3,9-trimetoxipterocarpano foram administrados via intraperitoneal (50 mg/kg/dia, C) (10 mg/kg/dia, D), respectivamente. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.





**Figura 30** - Análise histológica do tumor de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). Os compostos 3,9-dimetoxipterocarpano e 2,3,9-trimetoxipterocarpano foram administrados via intraperitoneal (50 mg/kg/dia, C) (10 mg/kg/dia, D), respectivamente. Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.

#### 4.4. Reação de metabolismo oxidativo *in vitro*: reações de oxidação biomiméticas catalisadas por metaloporfirina sintética.

A avaliação da atividade antitumoral em camundongos transplantados com Sarcoma 180 mostrou que o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) não apresentava inibição do tumor e o composto 3,9-trimetoxipterocarpano (**28**) em alta dose era fracamente ativo. A metabolização desses compostos pelas enzimas hepáticas do citocromo P-450 pode ser a explicação para a ausência de atividade *in vivo* desses compostos. Dessa forma, foram realizados os ensaios de metabolismo biomimético oxidativo *in vitro*. As metaloporfirinas (MeP) simulam os modelos de enzimas do citocromo P-450 e são capazes de mimetizar processos metabólicos *in vivo*. De acordo com Santos *et al.* (2005), a oxidação catalisada pela MeP serve como um modelo químico para o metabolismo de drogas.

Os compostos (3,9-dimetoxipterocarpano e 2,3,9-trimetoxipterocarpano) foram submetidos à reação de oxidação com (Fe[TPP]Cl) e (iodozilbenzeno ou PhIO). Após o período de reação (2h), as amostras foram secas e novamente diluídas em diclorometano para análise em CG/EM.

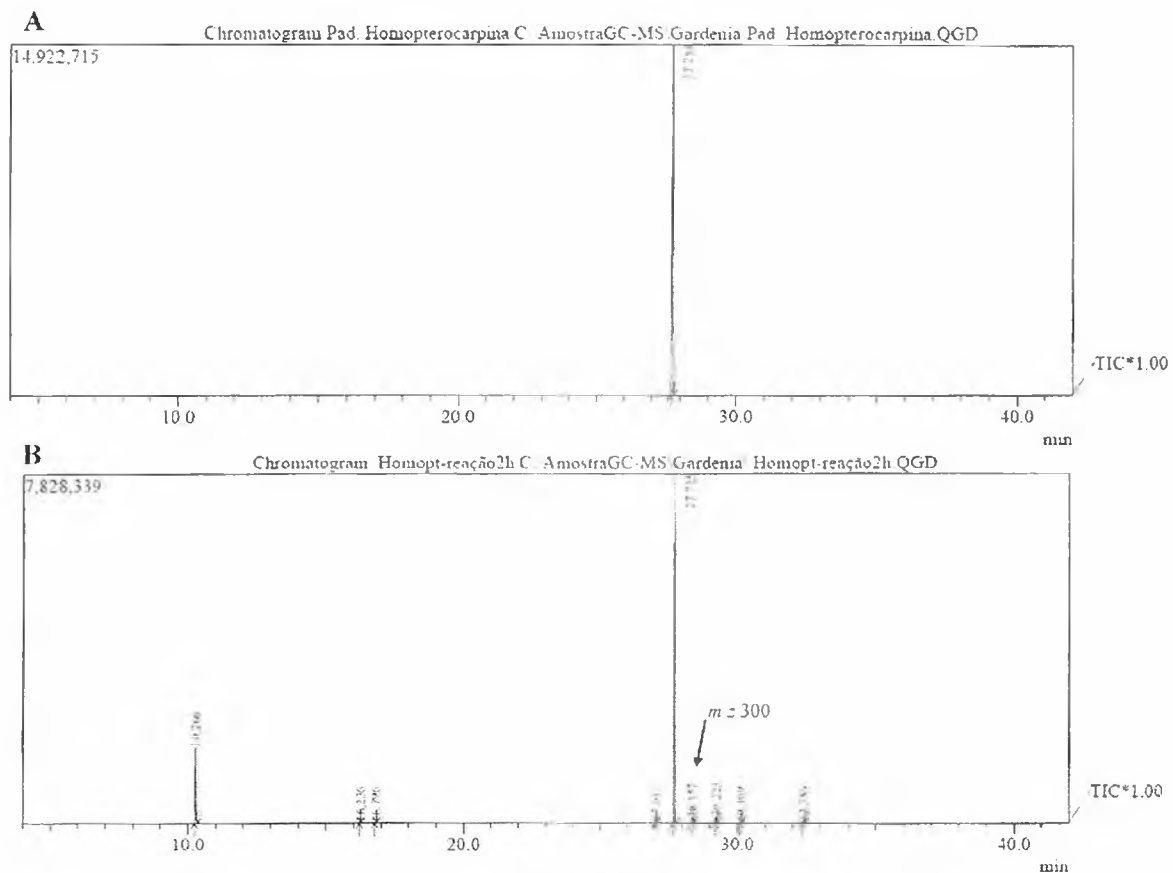
A análise por CG/EM após a reação do composto 3,9-trimetoxipterocarpano (**28**) revelou o surgimento de um sinal com tempo de retenção em 28,36 min e relação massa carga 300 ( $m/z$  330) que não estava presente no padrão, que apresentava apenas o sinal correspondente ao composto **28**, com tempo de retenção 27,75 min e relação  $m/z$  284 (Figura 31). O sinal  $m/z$  300 corresponde à molécula oxidada na posição 6a, de acordo com a biblioteca do GC/EM (Figura 32). A proposta completa de fragmentação foi realizada pelo grupo do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto.

A análise por CG/EM após a reação do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) revelou o surgimento um pico com tempo de retenção de 30,57 min com relação massa carga 330 ( $m/z$  330) que não estava presente no padrão (2,3,9-trimetoxipterocarpano). Vale ressaltar que a análise da amostra padrão do 2,3,9-trimetoxipterocarpano mostrou uma série de impurezas, além de conter o sinal predominante referente ao composto em questão com tempo de retenção de 29,79 min e  $m/z$  314 (Figura 33). O sinal  $m/z$  330 possivelmente corresponde à molécula oxidada (figura 34).

Após a confirmação da presença de oxidação, a reação com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano foi repetida cinco vezes e os produtos reunidos em uma única fração. A mistura reacional foi submetida à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde todos os picos foram recolhidos, exceto àqueles referentes ao meio reacional (Figura 35). Dentre as frações coletadas, as substâncias com tempo de retenção de 16,10 min, 18,56 min e 22,17 min foram analisados por CG/EM. Essas amostras foram escolhidas para análise, uma vez que representavam variações em relação ao composto padrão, sugerindo que as mesmas resultavam da reação de metabolismo. O sinal com tempo de retenção de 18,56 min não se encontrava no padrão, enquanto que o sinal com tempo de retenção de 16,10 min estava aumentado com relação ao padrão. O sinal com tempo de retenção de 22,17 min correspondia ao composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (dados confirmados pelo espectro de massa), majoritário tanto na amostra padrão, quanto na amostra reacional.

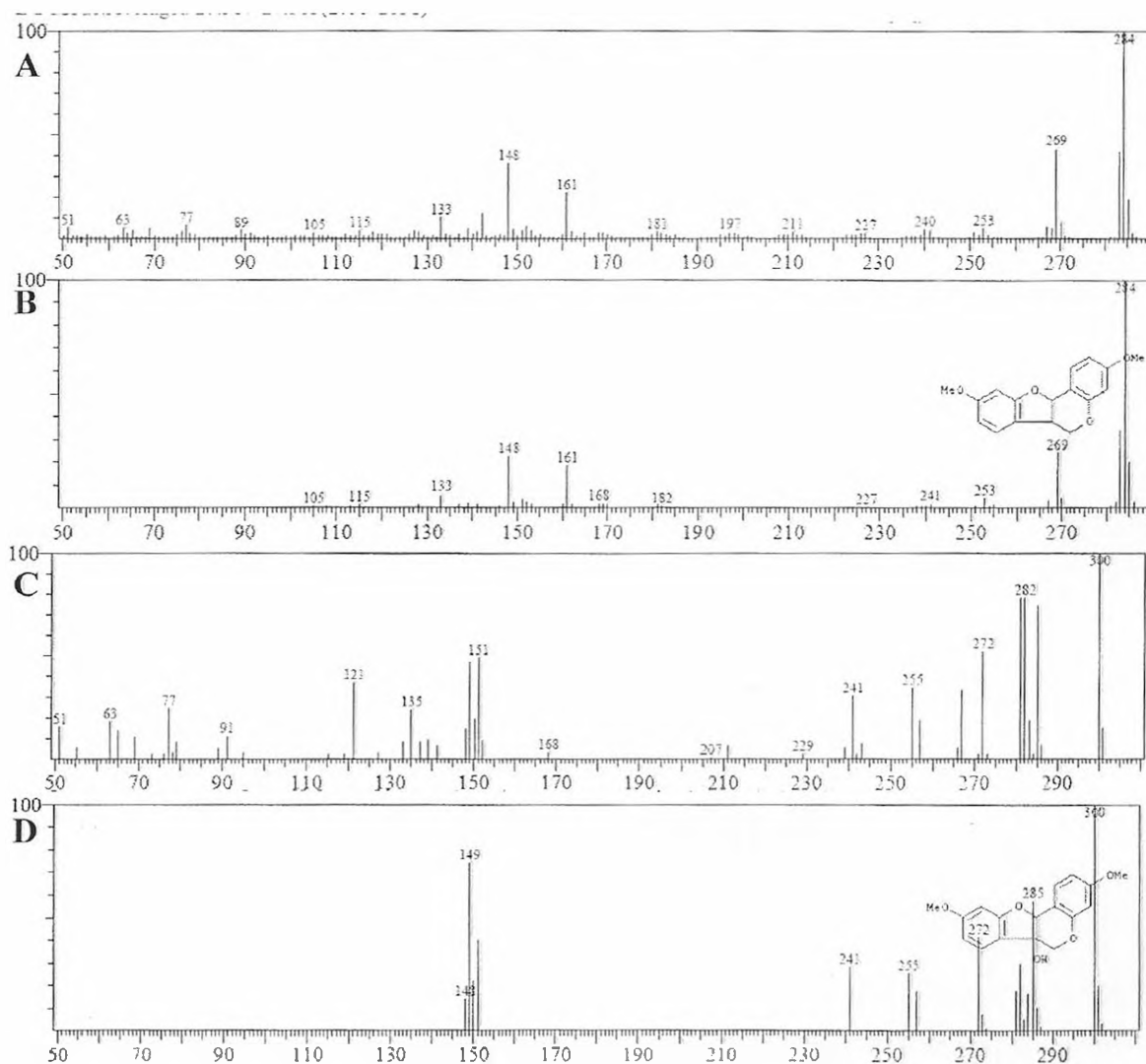
A análise por CG/EM mostrou que tanto o composto obtido pela separação em CLAE cujo tempo de retenção era 16,10 min quanto o pico em 18,56 min possuíam um composto com  $m/z$  330, cujo tempo de retenção no CG era de 30,58 min e 30,72 min, respectivamente, além de outros sinais apresentados na figura 36. A figura 37 mostra o

espectro de massa dos sinais obtidos no CG em 30,58 min e 30,77, confirmando que ambas as amostras possuíam  $m/z$  de 330. O único experimento feito com a amostra coletada em 18,56 min foi a análise por CG/EM devido a pequena quantidade da mesma (figura 37). Já a fração obtida no CLAE com tempo de retenção de 16,10 min foi submetida a cromatografia em placa preparativa, resultando na separação do composto com  $m/z$  330 como molécula majoritária (figura 38). A atividade citotóxica dessa amostra foi avaliada pelo método do MTT em três linhagens tumorais, MDAMB435, HCT-8 e SF295, não apresentando atividade nas concentrações testadas ( $CI_{50} > 5 \mu\text{g/mL}$ ).

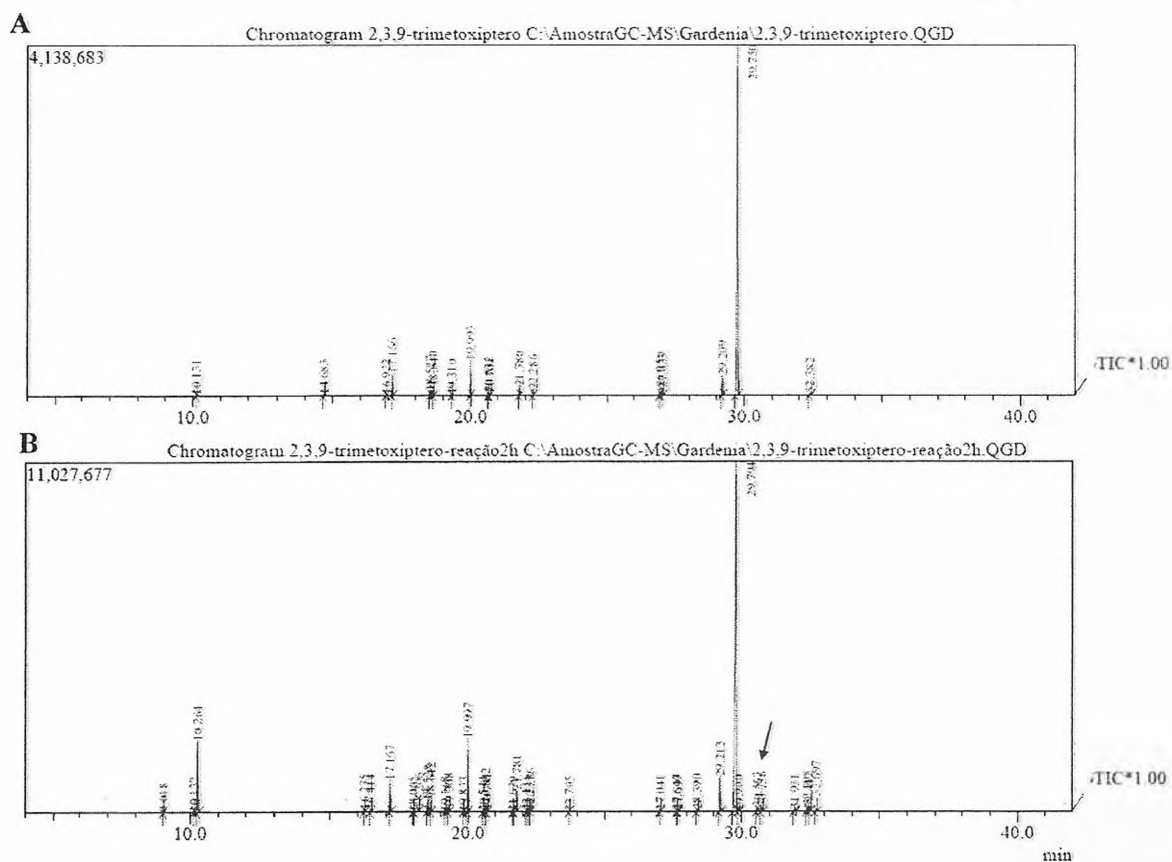


**Figura 31** - Cromatograma obtido no CG/EM. A: Cromatograma do composto 3,9-dimetoxipterocarpano (padrão) com tempo de retenção de 27,75 min. B: Cromatograma da reação mostrando um pico majoritário em 27,72 min correspondente ao padrão e um pico em 28,36 min que possui  $m/z$  300.

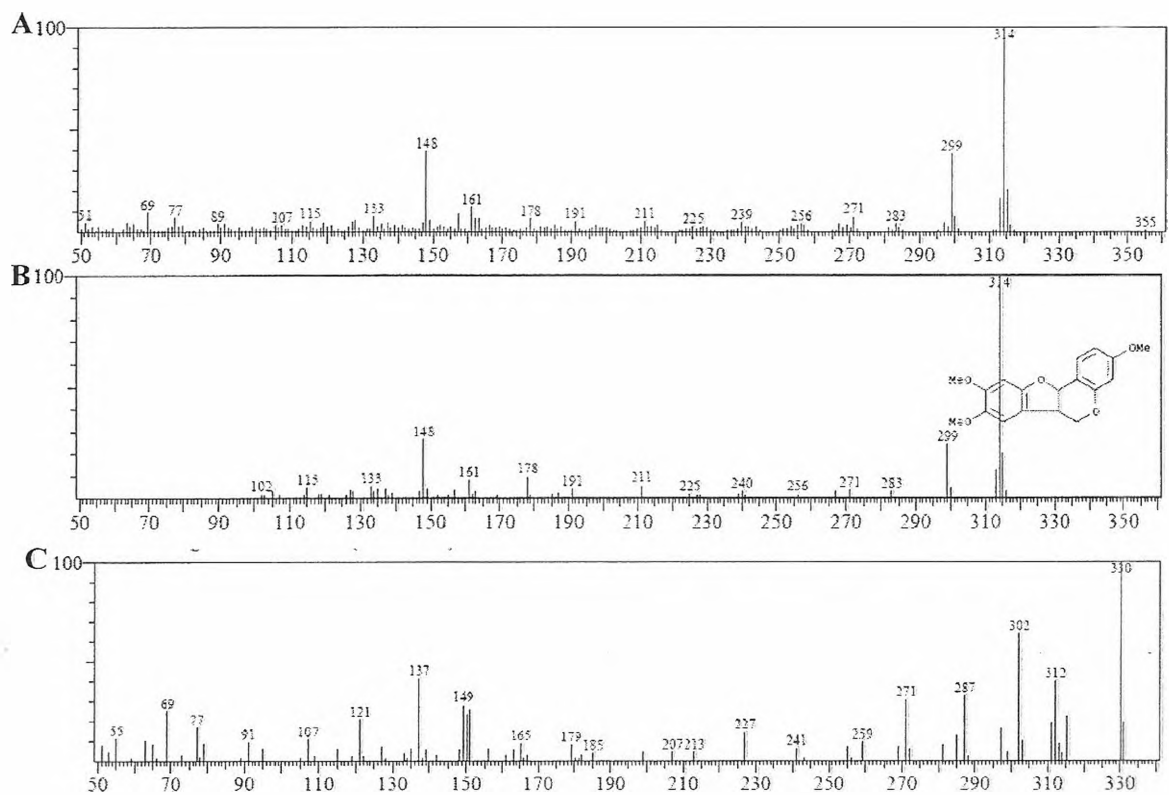




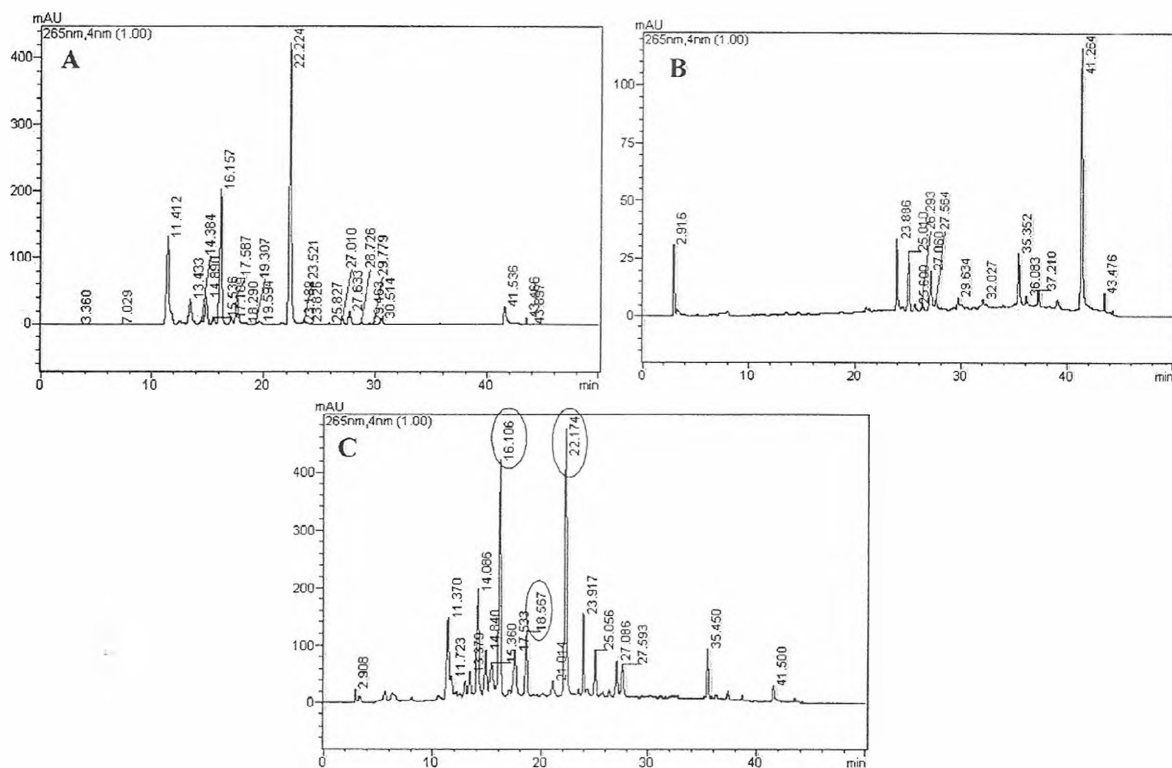
**Figura 32** – Espectro de massa obtido no GC/EM. A: Espectro de massa do pico com tempo de retenção em 27,75 obtido da amostra padrão. B: Espectro de massa obtido da biblioteca do CG/EM por comparação e similaridade ao espectro obtido no padrão. C: Espectro de massa do pico com tempo de retenção 28,36 min obtido da amostra reacional. D: Espectro de massa obtido da biblioteca do CG/EM por comparação e similaridade ao espectro obtido do pico 28,36 min da amostra reacional.



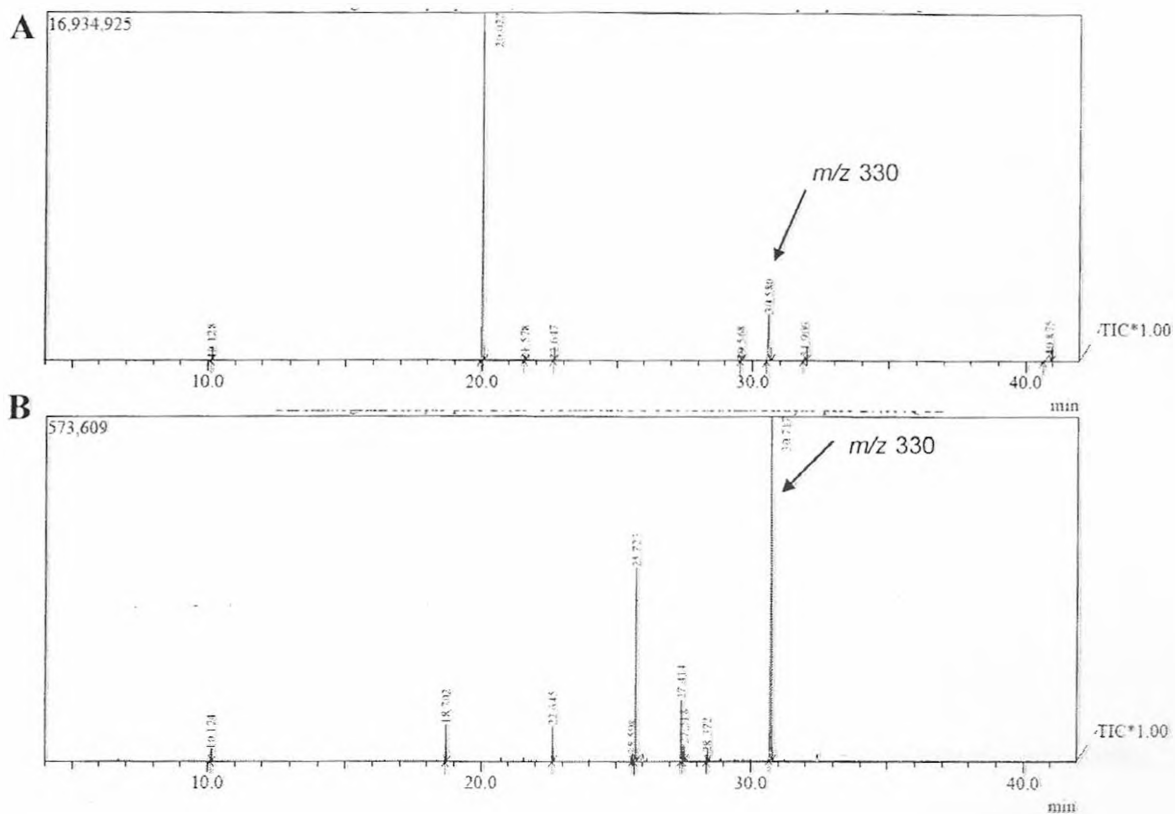
**Figura 33** - Cromatograma obtido no CG/EM. A: Cromatograma do composto 2,3,9-dimetoxipterocarpano (padrão) com tempo de retenção de 29,75 min. B: Cromatograma da reação mostrando um pico majoritário em 29,75 min correspondente ao padrão e um pico em 30,57 min que possui  $m/z$  330.



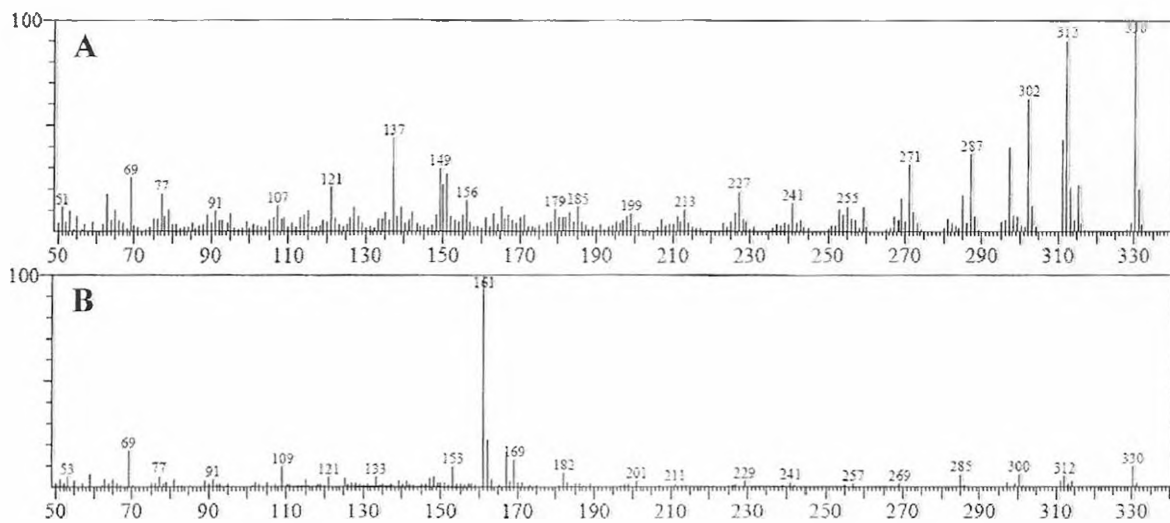
**Figura 34** – Espectro de massa obtido no GC/EM. A: Espectro de massa do pico com tempo de retenção em 29,75 obtido da amostra padrão. B: Espectro de massa obtido da biblioteca do CG/EM por comparação e similaridade ao espectro obtido no padrão. C: Espectro de massa do pico com tempo de retenção 28,36 min obtido da amostra reacional. D: Espectro de massa obtido da biblioteca do CG/EM por comparação e similaridade ao espectro obtido do pico 30,57 min da amostra reacional.



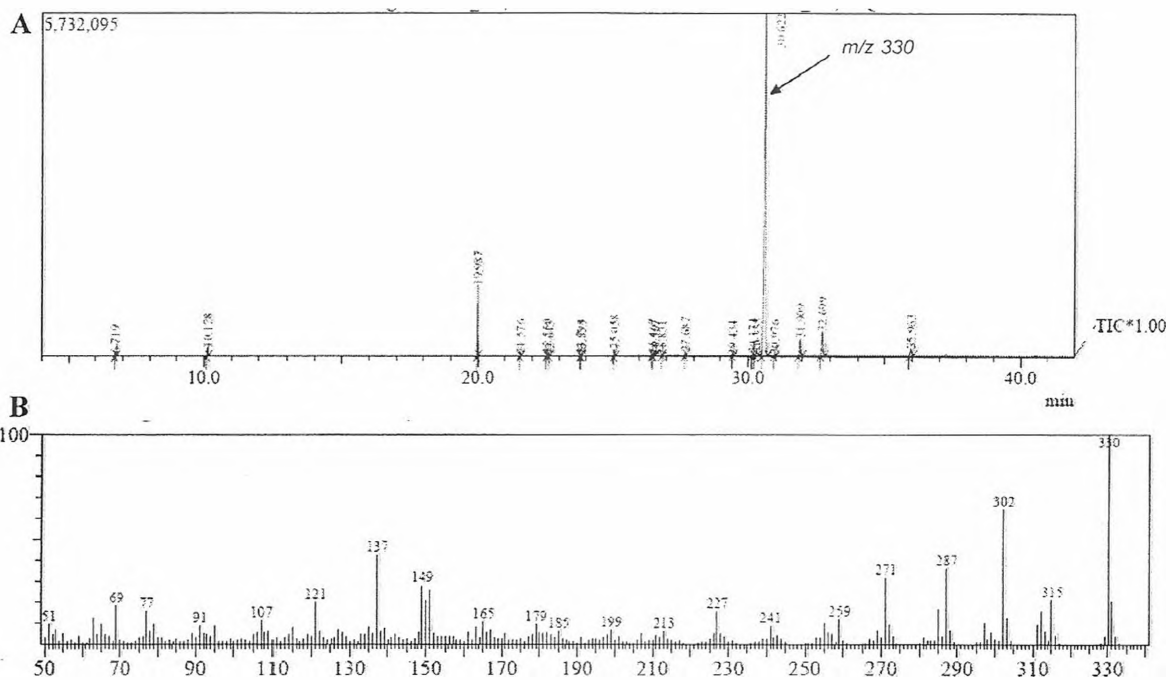
**Figura 35** – Cromatograma obtido no CLAE. A: Cromatograma do padrão (composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano); B: Cromatograma da mistura reacional (metaloporfirina + PhIO); C: Cromatogramama da reação com todos os produtos, os sinais circulosos foram analisados em CG/EM.



**Figura 36** - Cromatograma obtido no CG/EM. A: cromatograma do pico com tempo de retenção 16,11 min coletado no HPLC, a seta indica o pico com tempo de retenção 30,58 min e  $m/z$  330. B: cromatograma do pico com tempo de retenção 18,57 min coletado no CLAE, a seta indica o pico com tempo de retenção 30,717 min e  $m/z$  330.



**Figura 37** - Espectro de massa obtido no CG/EM. A: Espectro de massa do pico com tempo de retenção 30,58 min obtido após análise da fração 16,11 min coletada no HPLC. B: Espectro de massa do pico com tempo de retenção 30,72 min obtido após análise da fração 18,57 min coletada no CLAE.



**Figura 38** - Cromatograma e espectro de massa obtido no CG/EM. A: cromatograma da fração obtida após cromatografia em placa preparativa, o pico com tempo de retenção em 30,62 apresenta  $m/z$  330. B: espectro de massa do pico com tempo de retenção de 30,62 min.

## 5. Discussão

A existência de compostos bioativos em plantas e outras fontes naturais é conhecida há milênios. O uso medicinal de produtos naturais também é bastante antigo, datando de, pelo menos, mil anos antes de Cristo, quando o uso de plantas para tratar o câncer já era citado no Papiro de Ebers (Kingston, 1996). Atualmente, uma grande variedade de metabólitos secundários isolados de plantas tem sido utilizada para o tratamento do câncer, dentre eles, estão a vincristina, a vimblastina, o taxol e alguns derivados de produtos naturais, como o teniposido, etoposido, topotecan e irinotecan (Cragg & Newman, 2005).

Pterocarpanos são metabólitos secundários derivados da isoflavona que possuem um núcleo tetracíclico e, de acordo com Falcão e colaboradores (2005), apresentam atividade antiproliferativa contra células tumorais. Posteriormente, verificou-se que esses pterocarpanos possuíam potente atividade antimetabólica em ovos do ouriço-do-mar (Militão *et al.*, 2005). Em ambos os ensaios o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27), que apresenta uma metoxila em C2, foi mais ativo quando comparado a 3,9-dimetoxipterocarpano (28), 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (13), 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (29) e 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (30), demonstrando a importância desse grupo para a atividade citotóxica.

Resultados, descritos por Militão e colaboradores, obtidos em estudo da atividade desses pterocarpanos em células leucêmicas da linhagem HL60 indicaram que os compostos com maior número de metoxilas, como o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) e 3,9-dimetoxipterocarpano (28), induziram parada do ciclo celular em G2/M e apoptose, enquanto os compostos onde algumas das metoxilas foram



substituída por hidroxilas, como o composto 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**13**) e 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**30**), causavam necrose (Militão *et al.*, 2006).

No presente trabalho a ampliação do painel de linhagens tumorais confirmou a atividade citotóxica do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**), já que este inibiu o crescimento de todas as linhagens testadas. Esse composto, quando testado em L929, uma linhagem fibroblástica originada de tecido conjuntivo de camundongo não causou citotoxicidade, sugerindo uma possível seletividade do pterocarpano para linhagens tumorais. Dois outros pterocarpanos trimetoxilados, 3,4,9-trimetoxipterocarpano (**32**) e 3,9,10-trimetoxipterocarpano (**31**) foram testados quanto a atividade antiproliferativa, e ambos os compostos não apresentaram citotoxicidade. O resultado enfatiza que não é o número de metoxilas, mas sim a presença desse grupo em C2 contribui para o aumento da atividade citotóxica.

A importância do grupo metoxila tem sido constantemente avaliada em drogas citotóxicas. Nas combrestatinas o anel trimetoxilado é essencial para a atividade citotóxica e a potência dessa atividade está associada à presença da metoxila na posição 4 do outro anel benzênico (Srivastava *et al.*, 2005).

Outro exemplo é a podofilotoxina, cujo anel trimetoxilado é indispensável para a atividade citotóxica. A modificação no mesmo anel causa inclusive alteração no mecanismo de ação, pois a podofilotoxina causa despolimerização dos microtúbulos enquanto seus derivados, etoposido e teniposido, que apresentam uma metoxila a menos no mesmo anel causam inibição da topoisomerase II (Srivastava *et al.*, 2005).

A avaliação da atividade antiproliferativa em células leucêmicas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) mostrou que a citotoxicidade desse pterocarpano, mesmo testado em alta concentração (10 µg/mL), requer pelo menos 24 h

de tratamento. Provavelmente a atividade desse composto não está ligada ao dano direto na membrana. Experimentos realizados em HL60 mostraram que o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) testado na concentração de 5 µg/mL por 24 h causa fragmentação do DNA e despolarização da mitocôndria sem alterar a integridade da membrana plasmática, características típicas de apoptose (Militão, 2005). Após 48 h de tratamento a  $CI_{50}$  foi menor do que 1 µg/mL para todas as linhagens testadas, caracterizando a ausência de seletividade nas células leucêmicas, apesar de existir uma pequena diferença nas  $CI_{50}$  (variação de 0,1 a 0,8 µg/mL). A K562 (leucemia mielóide crônica) foi a linhagem mais resistente, com  $CI_{50}$  de  $0,5 \pm 0,03$  µg/mL após 72 h de incubação. As células K562 apresentam o cromossomo Filadélfia, que de acordo com vários autores causa resistência a quimioterápicos como o etoposido e camptotecina (Liu *et al.*, 2002).

A citotoxicidade do composto 2,3,9 trimetoxipterocarano (**27**) não se estendeu para as células mononucleadas do sangue periférico pois após 24 e 48 h de incubação este não causou redução no número de células e após 72 h de incubação causou apenas 19 % de inibição na concentração testada (10 µg/mL), ao contrário da doxorubicina (10 µg/mL), um quimioterápico amplamente utilizado na terapêutica, que causou 28%, 31% e 43% de redução do número de células após 24, 48 e 72 h de incubação. Novamente esses resultados sugerem a seletividade do pterocarpano para células tumorais *in vitro*, mas não exclui totalmente a citotoxicidade para células normais.

Como mencionado anteriormente o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) e 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**) causaram parada do ciclo celular em  $G_2/M$  (Militão *et al.*, 2006). Fármacos que atuam na mitose como o paclitaxel e vincristina causam aumento do número de células com conteúdo de DNA tetraplóide (4N). Esses

compostos inibem a atividade dos microtúbulos e por isso impedem a célula de completar a mitose. Os microtúbulos são fibras do citoesqueleto altamente dinâmicas, compostas de dímeros de  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina que desempenham papel importante no transporte de vesículas, na manutenção da forma da célula e na mitose (Jordan & Wilson, 2004). Os fármacos que atuam nos microtúbulos, como o paclitaxel e alcalóides da Vinca podem em baixas concentrações bloquear a mitose ao inibir a dinâmica dos microtúbulos, ou seja, os microtúbulos podem perder a capacidade de variar a taxa de crescimento, de variar a taxa de encurtamento e de trocar sua porção final do estágio de crescimento para o estágio de encurtamento (Jordan & Wilson, 2004, Jordan *et al.*, 1992). Já os mesmos fármacos em altas concentrações podem alterar a massa dos microtúbulos ao estabilizar a polimerização ou inibir a polimerização e assim também bloquear a mitose (Jordan & Wilson, 2004).

A coloração ou marcação estruturas da célula após tratamento com fármacos seguida de observação e aquisição de imagens através de microscópios com alta resolução está conseguindo integrar a complexidade biológica e o surgimento de novos fármacos (Lang *et al.*, 2006). Nos últimos tempos a microscopia com fluorescência tem se tornado um dos métodos mais populares de obtenção de imagem, entre os vários tipos de microscópios com fluorescência, o microscópio confocal está sendo amplamente utilizado na indústria farmacêutica, pois utiliza métodos simples e permite a obtenção da imagem de células em secção ópticas com alta resolução (Lang *et al.*, 2006).

Dessa forma a imunofluorescência para citoesqueleto em células MCF-7 foi realizada e as imagens analisadas mostraram que o tratamento com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) (2,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**) (25  $\mu\text{g/mL}$ ) causavam um bloqueio na mitose com morfologia típica de prófase/prometáfase, ou

seja, os cromossomos estavam condensados e dispersos no citoplasma, ao contrário do controle que apresentava todas as fases da mitose. Em algumas células, principalmente aquelas que foram tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**), os cromossomos estavam em forma de anel com o áster de microtúbulos partindo do centro. Não foi observada nenhuma alteração na actina e nem nos microtúbulos da interfase. Drogas que atuam na tubulina, como os alcalóides da Vinca, também causam alteração nos microtúbulos da interfase, reduzindo a massa dos microtúbulos, efeito resultante da inibição da polimerização dos microtúbulos. A atuação da droga na interfase está correlacionada com a neurotoxicidade dessas drogas (Jordan & Wilson, 2004).

Em nosso trabalho algumas células tratadas com 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**13**) e 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**29**), ambos na concentração de 25 µg/mL, também apresentavam morfologia característica de prometáfase, porém também foi visualizado células com característica de metáfase, anáfase e telófase. Não foram observados células na mitose após tratamento com o composto 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**30**) (25 µg/mL). De fato estudos anteriores revelaram que após 24 h de tratamento com os compostos **27** e **28**, as células leucêmicas eram bloqueadas em G2/M, resultado não observado após tratamento com os compostos 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (**13**) e 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (**30**) (Militão *et al.*, 2006). O resultado indica que apesar da estrutura química ser semelhante, o mecanismo de ação difere entre as drogas que só possuem metoxilas ligadas ao esqueleto do pterocarpano e drogas que possuem também hidroxilas formando a molécula. Além disso, a morte celular resultante da atuação dos pterocarpanos também difere, pois os protótipos metoxilados causam

apoptose e os protótipos com maior número de hidroxilas causam necrose (Militão *et al.*, 2006).

O índice de fases confirmou de forma quantitativa o aumento do número de células em prófase/prometáfase após tratamento com os compostos 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27). Nenhuma célula em outra fase da mitose foi observada, mostrando que as células não conseguem progredir pela mitose. Além disso, o bloqueio causado por esse composto (27) foi maior do que o observado com todas as outras amostras testadas, mesmo estando em concentrações dez vezes menores. A ordem de potência para o bloqueio em prófase/prometáfase foi 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) > 3,9-dimetoxipterocarpano (28) > 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (29) > 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (13). No caso dos demais pterocarpanos, foram observadas algumas células em metáfase, anáfase e telófase, sugerindo que as células passam pela prófase e não são bloqueadas ou conseguem sair do bloqueio. Como visualizado anteriormente não ocorreu bloqueio em prófase nas células tratadas com o composto 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (30).

A ampliação do painel de linhagem mostrou que ocorria um bloqueio na mitose em todas as células tumorais tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) (2,5 µg/mL) e a morfologia característica era de célula em prófase/prometáfase. Na linhagem normal, BRL3A (fígado murino), as células também se encontravam bloqueadas, mostrando que o alvo do protótipo não é específico para as células tumorais. A análise do fuso mitótico mostrou que grande parte das células MCF-7, HS58T e BRL3A apresentavam um fuso monopolar, caracterizado pelo áster de microtúbulos partindo do centro com cromossomos em volta formando um anel ou dispersos no citoplasma, sem alinhamento no fuso equatorial. Já as células T47D apresentavam fusos multipolares, com vários ásteres de microtúbulos e cromossomos

soltos no citoplasma. O índice de fases mostrou que tanto as células MCF-7, que já haviam sido testadas anteriormente, quanto as células T47D e BRL3A estavam bloqueadas na transição prófase/prometáfase e nenhuma célula em outras fases da mitose foi encontrada. Os microtúbulos das células na interfase não pareciam estar alterados após tratamento com o composto 2,3,9-trimetoxipteorcarpano (2,5 µg/mL).

O paclitaxel em concentrações baixas induz uma parada do ciclo celular na transição metáfase/anáfase em células tumorais. O fuso mitótico dessas células é bipolar e a distância entre os pólos é menor do que nas células não tratadas, a placa de cromossomos permanece compacta na região equatorial de forma muito semelhante a normal, porém alguns cromossomos permanecem localizados próximos aos pólos do fuso. De acordo com Jordan *et al.* (1993), esse tipo de fuso mitótico é denominado Tipo I ou Tipo II. Os microtúbulos da interfase não são alterados nessa concentração de taxol. À medida que a concentração de paclitaxel aumenta, um maior número de cromossomos é mantido próximo aos pólos e a morfologia do fuso se torna mais anormal, ou seja, perde a característica de fuso bipolar. Mantendo o aumento na concentração do fármaco não se observa a presença do fuso bipolar, aparece um ou mais ásteres de microtúbulos no centro com os cromossomos espalhados na célula, esse fuso recebe a classificação de tipo III. Nessa mesma concentração de taxol agregados de microtúbulos são encontrados na intérfase (Jordan *et al.*, 1993).

Células HeLa tratadas com agentes desestabilizadores dos microtúbulos, como vimblastina, vinorelbina, vinfluvina, podofilotoxina e nocodazole em baixas concentrações apresentam grande número de células na mitose com fuso do tipo I e do tipo II e as células em interfase não são afetadas. Em baixas concentrações a dinâmica dos microtúbulos é afetada, mas não ocorre despolimerização dos mesmos (Jordan *et al.*, 1992). Já em concentrações mais altas o fuso era quase sempre monopolar com os

cromossomos espalhados no citoplasma, fuso tipo III (Jordan *et al.*, 1992). As concentrações dos fármacos que causavam fuso do tipo III, também alteravam o citoesqueleto das células da interfase, promovendo a despolimerização dos microtúbulos (Ngan *et al.*, 2001; Jordan *et al.*, 2002).

As figuras mitóticas encontradas no presente estudo após o tratamento da célula MCF-7 com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) assemelham-se àquelas encontradas em células tumorais tratadas com altas concentrações de paclitaxel e vimblastina, porém tanto o paclitaxel quanto a vimblastina causam alteração nos microtúbulos das células em interfase, enquanto que o composto 27 não causou alteração visível nos microtúbulos nessa fase do ciclo celular.

O fuso mitótico é um alvo farmacêutico validado para o tratamento do câncer, agentes como os taxanos e os alcalóides da vinca que interferem na dinâmica dos microtúbulos estão sendo amplamente utilizados na clínica para o tratamento dessa doença (Tao *et al.*, 2005). Porém, como os microtúbulos não são úteis somente na mitose, mas também participam de outras funções fisiológicas críticas para a célula, como o transporte intracelular ou o posicionamento das organelas, os fármacos inibidores dos microtúbulos podem atuar tanto em células proliferando quanto em células na interfase e por causa disso exibem efeitos colaterais microtúbulos-dependente, incluindo neuropatia periférica (Tao *et al.*, 2005). Sabendo de tais efeitos, agentes que atuam na mitose via um novo mecanismo de ação, com maior especificidade para células tumorais, são desejadas para o tratamento de neoplasias.

Inibidores da Aurora quinase (MK0457 e AZD1152), uma proteína responsável pela maturação e separação do centrôssomo na prófase, condensação dos cromossomos, alinhamento dos cromossomos na placa metafásica e ativação do ponto de checagem, estão em estudo clínico. Apesar de atuar na mitose, esses compostos não

causam bloqueio celular, eles induzem a célula a sair da mitose sem ocorrer citocinese, onde esta pode entrar novamente na fase S do ciclo celular e morrer por apoptose ou entrar em senescência (Jackson *et al.*, 2007). Um outro alvo farmacológico na mitose estudado são as Polo quinases, quando inibidas por drogas como BI2536, ocorre formação de fuso monopolar seguida de catástrofe mitótica, ou seja, a célula entra em apoptose diretamente da mitose (Jackson *et al.*, 2007). Mais recentemente as proteínas motoras que atuam na mitose têm emergido como alvos para o tratamento do câncer (Jackson *et al.*, 2007).

Num screening realizado com o objetivo de encontrar fármacos que causem bloqueio na mitose, 116.360 pequenas moléculas orgânicas foram testadas quantificando-se o aumento da fosforilação da nucleolina, uma proteína do núcleo que é fosforilada em células após entrada na mitose (Mayer *et al.*, 1999). Dentre essas moléculas apenas uma causava bloqueio na mitose em prometáfase com formação de fuso monopolar, sem alterar a massa dos microtúbulos. Esse composto foi denominado monastrol e constatou-se que essa foi a primeira molécula com atividade inibidora da proteína motora EG5 (Mayer *et al.*, 1999). Hoje já existem drogas inibidoras da EG5 em estudo clínico (ispinesib, SB-743921 e MK-0731) e espera-se que essas novas moléculas tragam avanços na terapêutica (Jackson *et al.*, 2007).

A Quinesina mitótica (KSP) ou EG5 é uma proteína motora pertencente ao subgrupo da kinesina-5 que participa da separação dos centrossomos e formação do fuso bipolar (Tao *et al.*, 2005). As proteínas motoras de modo geral se dividem em três classes: a miosina, que interage com os filamentos de actina, e as proteínas motoras associadas aos microtúbulos, dineínas e quinesinas, todas elas apresentam um domínio motor que possui um sítio de ligação para o ATP (Woehlke & Schliwa, 2000).



A superfamília das quinesinas contém mais de 100 proteínas com diversas funções como transporte de organelas e a organização da membrana. Um estudo utilizando anticorpos contra a kinesina EG5 em células humanas mostrou o surgimento de células em prometáfase, com fuso monopolar, semelhante àqueles obtidos após o tratamento com o monastrol, após a incubação das células com os anticorpos (Mayer *et al.*, 1999).

No presente trabalho algumas células MCF-7, HS58T e BRL3A tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) 2,5 µg/mL por 24 h apresentaram fuso mitótico monopolar, morfologia que se assemelha as células em mitose tratadas com monastrol. Já as células T47 D apresentavam fuso multipolar, ao contrário do fuso monopolar observado nas outras linhagens tumorais testadas.

As células bloqueadas na mitose após tratamento com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) encontravam-se em prometáfase, pois após marcação da lamina B por imunofluorescência não foi observada a presença do envelope nuclear.

A análise do ciclo celular mostrou que após 24 h de tratamento com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) (2,5 µg/mL) houve um aumento do número de células em G2/M, resultado que confirma os achados anteriores, os quais indicaram um aumento significativo do número de células em prometáfase após tratamento com o composto **27**. O aumento no número de células em G2/M após 48 h de tratamento ainda foi observado. Além disso, o número de células com o DNA fragmentado também aumentou, ou seja, a droga já estava induzindo morte celular.

Na tentativa de verificar se o bloqueio em G2/M após o tratamento das células por um curto período de tempo (24 h) era revertido, as células foram reincubadas em meio livre de droga por mais 24 h. A reincubação das células MCF-7 em meio livre de

droga, causou reversão do bloqueio, já que a porcentagem de células em G2/M retornou para valores iguais ao controle ( $p > 0,05$ ). A separação das células bloqueadas na mitose após tratamento com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) por agitação mecânica e reincubação em meio livre do fármaco mostrou que após 5h as células já haviam completado a divisão e após 24 h a morfologia era semelhante as células interfásicas não tratadas. O mesmo efeito foi observado com um inibidor da proteína KSP/EG5 denominado KSP-IA, esse composto também promove bloqueio na mitose reversível, caso o tratamento tenha sido efetuado por um curto período de tempo (Tao *et al.*, 2005).

De acordo com Weaver & Cleveland (2005), o bloqueio das células tumorais na mitose por fármaco como os taxanos, os alcalóides da vinca e o monastrol (inibidor da KSP/EG5) ativa o ponto de checagem da mitose, e os possíveis mecanismos resultantes dessa ativação incluem: saída da célula do bloqueio, divisão e entrada no ciclo celular, caso tenha sido efetuado um curto período de tratamento; adaptação por parte da célula, onde esta sai do bloqueio na mitose sem promover a citocinese, entrando novamente em G1 e continua progredindo no ciclo, ou entra em senescência ou desencadeia a morte celular programada, caso tenha ocorrido o tratamento por um longo período de tempo. Outra possibilidade seria a execução da morte celular diretamente da mitose.

As células MCF-7 tratadas com o pterocarpano 27 por 48 h e reincubadas por 24 h em meio livre de droga apresentaram um aumento do conteúdo de DNA (4N) com relação ao controle, além de possuir um maior número de células com o DNA fragmentado. Os achados indicam que o tratamento das células MCF-7 por um curto período de tempo induz um bloqueio reversível na mitose, já o tratamento dessas células por um período de tempo prolongado induz um bloqueio em G2/M irreversível e morte celular.

A análise morfológica confirmou os resultados obtidos pelo citômetro de fluxo, pois grande parte das células MCF-7 tratadas com 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) (2,5 µg/mL) após 24 h estavam bloqueadas na mitose e algumas encontravam-se multinucleadas, já a maioria das células reincubadas em meio livre do fármaco apresentavam morfologia característica de interfase. A presença de células multinucleadas com 24 h de tratamento também foi visualizada após marcação das células MCF-7 com Lamina B. Após 48 h de tratamento algumas células estavam bloqueadas na mitose e um grande número de células estavam multinucleadas sugerindo que as células permanecem bloqueadas na mitose por um curto período de tempo e em seguida elas saem da mitose sem dividir o conteúdo de DNA e adquirem uma morfologia de interfase atípica, ou seja, multinucleada. A reincubação em meio livre de droga após 48 h de tratamento fornece um indício de que as células tendem a ficar multinucleadas após tratamento prolongado com a droga, pois a análise morfológica mostrou a ausência de células bloqueadas na mitose e a presença de grande número de células multinucleadas, além de algumas células com característica de apoptose.

Como a citometria de fluxo indicou que uma maior porcentagem de células estava em G2/M após 48 h de tratamento e reinbução de 24 h, e a análise morfologia mostrou a ausência de células bloqueadas na mitose, bem como a presença de grande número de células multinucleadas conclui-se que essas células realmente saíram da mitose sem promover a citocinese. A ativação de caspase-3 com promoção de apoptose já foi previamente observadas em células tumorais (HL60) tratadas com o 2,3,9-trimetoxipterocarpano (Militão *et al.*, 2006). Possivelmente o passo final para a morte das células tumorais seja a promoção da apoptose.

Um estudo realizado com células MDA-MB-468 e MCF-7 (carcinomas de mama) mostrou que após o tratamento com paclitaxel, ocorre um acúmulo de células

tetraplóides, seguida de saída aberrante da mitose, sem ocorrer citocinese, produzindo células em G1, multinucleadas que em seqüência entram em apoptose (Blajeski *et al.*, 2001).

A exposição contínua ao composto KSP-IA (inibidor da KSP/EG5) leva a saída das células tumorais da mitose para uma fase pseudo-G1 (presença de Ciclina E e conteúdo de DNA 4N) e promoção de apoptose (Tao *et al.*, 2005). Os autores fornecem evidências de que as células tratadas com paclitaxel ou KSP-IA saem para G1 antes de promover a apoptose. As células que permanecem bloqueadas na mitose por um longo período de tempo são menos sensíveis a morte celular induzida por KSP-IA e paclitaxel do que as células que saem do bloqueio na mitose para G1 após tratamento com qualquer uma das drogas. Além disso, a morte celular é induzida nas células resistentes a KSP-IA que permanecem bloqueadas na mitose pelo tratamento com um inibidor da CdK1, purvalanol, que estimula a saída da célula da mitose. Esse achado reforça a hipótese de que é necessário as células saírem da mitose para a fase pseudo-G1 a fim de ativar a apoptose (Tao *et al.*, 2005). É válido salientar que para promover o bloqueio na mitose com subsequente morte celular as células devem possuir o ponto de checagem da mitose ativo (Tao *et al.*, 2005).

O ponto de checagem da mitose previne o avanço da célula para a anáfase através da inibição do complexo promotor da anáfase (APC). O APC ubiquitina substratos mitóticos cuja destruição, mediada pelo proteossoma, é necessária para a promoção da anáfase (Weaver & Cleveland, 2005). A inibição do APC é mediada pelo recrutamento de proteínas do ponto de checagem, como a BubR1, Bub3, Mad1 e Mad2, para os cinetócoros ainda não ligados aos microtúbulos. Essas moléculas são então convertidas a inibidores da Cdc20, o fator que se liga ao APC ativando-o. Após a ligação de todos os cinetócoros aos microtúbulos do fuso os níveis dos inibidores do

APC<sup>cdc20</sup> caem. A ativação do complexo promotor da anáfase resulta na degradação das coesinas que mantêm as cromátides irmãs unidas e iniciação da anáfase. O composto KSP-IA promove a fosforilação e ativação de BubR1, ativando o ponto de checagem e promovendo a parada do ciclo na mitose (Tao *et al.*, 2005).

Caso o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) estivesse atuando em proteínas motoras da família das quinesinas, incluindo as quinesinas convencionais, essa composto induziria alteração na localização celular de organelas citoplasmáticas como o complexo de Golgi em células da interfase, visto que essas proteínas regulam o transporte de organelas no citoplasma de células (Mayer *et al.*, 1999).

Não houve diferença entre a localização do complexo de Golgi nas células MCF-7 tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano por 24 h quando comparado com o controle. Portanto o protótipo não inibe as quinesinas convencionais, porém não é possível determinar por esse experimento se o composto inibe a quinesina mitótica EG5 de forma específica. Nesse ensaio também foi possível observar a presença de células multinucleadas na população tratada.

Estudos preliminares indicaram que o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) causa inibição de síntese de DNA em células tumorais (Militão *et al.*, 2006). Alguns fármacos como a campotecina e seus derivados topotecan e irinotecan, utilizados na terapêutica, também causam inibição da síntese de DNA por atuar de modo específico na enzima topoisomerase I. Dessa forma o presente trabalho avaliou a capacidade inibitória do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (27) sobre a Topoisomase I. O ensaio de relaxamento do DNA revelou que o mecanismo de ação antiproliferativo do composto 27 não é dependente de uma ação inibitória sobre a topoisomerase I, uma vez que não houve alterações no estado topológico do DNA quando comparado com o controle positivo (campotecina).

Os estudos de mecanismo de ação indicam que o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) causa parada do ciclo celular na mitose, sem diretamente alterar a organização dos microtúbulos da interfase. Possivelmente esse composto está atuando em alguma proteína específica da mitose. Pequenas moléculas orgânicas que atuam na mitose são de grande interesse, tanto para conhecer os mecanismos envolvidos na segregação dos cromossomos, quanto para servir como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos anticâncer (Haggarty et al., 2000).

O composto **27** mostrou-se promissor como molécula antiproliferativa, pois em todas as linhagens tumotais testadas a  $CI_{50}$  variou de 0,09 a 1,3  $\mu\text{g/mL}$  (tabela 2). Estudos que avaliem a atividade antiproliferativa *in vivo* são necessários para estabelecer o potencial antitumoral desse pterocarpano. Animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a compreensão da patogênese do câncer em seres humanos. De fato, a maioria dos conceitos de tumorigênese atualmente aceitos é fortemente influenciada por modelos de desenvolvimento do câncer em camundongos, uma vez que esses organismos são modelos acessíveis e possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos nossos (Kamb, 2005). O camundongo *mus musculus* é um dos melhores sistemas para o estudo do câncer, devido a características tais como a facilidade de procriação em cativeiro, a duração da vida de até 3 anos, a grande similaridade fisiológica e molecular com humanos e um genoma inteiramente seqüenciado (Frese & Tuveson, 2007).

O Sarcoma 180 é um tumor original de camundongo e uma das linhagens celulares mais freqüentemente usadas na pesquisa de atividade antitumoral *in vivo* (Lee et al., 2003; Magalhães et al., 2006). Nos ensaios realizados com os compostos 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**), nas concentrações de 10 mg/kg/dia (31  $\mu\text{mol/Kg/dia}$ ) e 25 mg/kg/dia (79  $\mu\text{mol/Kg/dia}$ ), e 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**), na concentração de 50

mg/kg (176  $\mu\text{mol/Kg/dia}$ ), apenas o pterocarpano **28** apresentou inibição significativa do crescimento tumoral (27,15%) enquanto que o controle positivo (5-FU, 25  $\mu\text{g/mL}$  ou 192  $\mu\text{mol/Kg/dia}$ ) causou 71,1 % de inibição da massa tumoral. A ausência de atividade antitumoral do pterocarpano **27** *in vivo* sugere que a chegada desses compostos no local de ação, ou seja, no tumor, pode ser insuficiente, visto que *in vitro*, essa molécula apresenta lipossolubilidade suficiente para atravessar a membrana e causar citotoxicidade.

Os animais desenvolvem complexos sistemas para a detoxificação de substâncias químicas estranhas, incluindo carcinógenos e toxinas presentes em plantas venenosas (Hang *et al.*, 2004). O metabolismo dos fármacos envolve dois tipos de reações bioquímicas, conhecidas como reações de fase I e reações de fase II. As reações de fase I incluem a oxidação, hidroxilação, dealquilação, desaminação e hidrólise. Essas reações também podem tornar um xenobiótico mais tóxico ou carcinogênico (Rodríguez-Antona & Ingelman-Sundberg, 2006). Já as reações de fase II envolvem a conjugação, isto é, à fixação de um grupo substituinte que habitualmente resulta em produtos inativos (Hang *et al.*, 2004).

As reações de metabolização ocorrem predominantemente no fígado e em grande parte são catalizadas pelas enzimas do citocromo P-450 (CYP) (Rodríguez-Antona & Ingelman-Sundberg, 2006, Mansuy, 2007). As enzimas P-450 podem catalisar reações com substâncias endógenas, como os ácidos graxos, as prostaglandinas e os esteróides, e xenobióticos como carcinógenos, odorantes, antibióticos, pesticidas e antioxidantes (Coon *et al.*, 2003). A metabolização catalisada pelas CYP pode resultar na redução da disponibilidade da droga e no surgimento de efeitos tóxicos agudos e crônicos, incluindo interação maléfica entre drogas, aumento da susceptibilidade ao câncer e surgimento de mal-formação congênita (Guengerich, 2000).

O metabolismo oxidativo de fármacos pelas enzimas do Citocromo P-450 e peroxidases tem sido amplamente estudado nas últimas décadas. Porém alguns problemas são associados ao uso de sistemas biológicos para o estudo do metabolismo. Dentre estes se destacam: dificuldade de isolamento de metabólitos na presença de proteínas, utilização de animais, os quais são sacrificados, e as preparações de tecido hepático variam quanto a potência, sendo complicado quantificar a estequiometria do oxidante (Santos, 2006). Dessa forma um método alternativo utiliza metaloporfirinas (MeP) que simula os modelos de enzima do citocromo P-450 e são capazes de mimetizar processos metabólicos *in vivo*, está sendo empregado. A indústria farmacêutica utiliza esse sistema de oxidação para preparar metabólitos de drogas (Mansuy, 2007). De acordo com Santos *et al.* (2005), a oxidação catalizada pela MeP serve como um modelo químico para o metabolismo de drogas.

Os compostos 3,9-dimetoxipterocarpano (**28**) e 2,3,9-trimetoxipterocarpano (**27**) foram submetidos a reação de oxidação com (Fe[TPP]Cl) e iodozilbenzeno (PhIO). Após a reação um produto oxidado foi obtido em ambos os compostos testados. A partir do composto (**28**) foi formado um metabólito hidroxilado na posição 6a, 3,9-dimetoxi-6a-dihidroxipterocarpano. O composto (**27**) também sofreu oxidação originando um metabólito que não possuía atividade citotóxica.

Os organismos vivos desenvolvem a metabolização de xenobióticos para se adaptar ao ambiente químico (Mansuy, 2007). Fungos da espécie *Nectria haematococca*, que é patogênico para a ervilha (*Pisum sativum* L.), têm a capacidade de detoxificar a fitoalexina pisatina (3-metoxi-6a-hidroxi-8,9-metilenodioxipterocarpano) através de desmetilação, catalisada por enzimas do citocromo P-450 do fungo, produzindo (3,6a-dihidroxi-8,9-metilenodioxipterocarpano) (Georgi & VanEtten, 2001).



Outro exemplo são os fungos da espécie *Colletotrichum trifoli* que conseguem metabolizar a medicarpina (13) e mackiaina (14) produzida pela alfafa (*Medicago sativa* L.) através da hidroxilação dos pterocarpanos na posição 6a, tornando-os menos tóxicos para o fungo (Soby et al., 1996). Outra espécie, *C. gloeosporioides*, hidroxila a mackiaina (14) na posição 6a e em seguida na posição 6, produzindo metabolitos não tóxicos quando testados contra o fungo *N. haematococca* (Soby et al., 1997).

É possível que os pterocarpanos testados nos ensaios de atividade antitumoral *in vivo* não tenham apresentado atividade devido à ocorrência de metabolização hepática. Contudo, deve-se ressaltar que o estudo da metabolização reflete apenas um dos componentes envolvidos na farmacocinética de um composto, sendo assim o conhecimento das propriedades de absorção, distribuição e eliminação faz-se ainda necessário para uma melhor compreensão das propriedades farmacológicas *in vivo* para esta substância. No presente trabalho, pode-se aventar também a possibilidade da ausência de efeito *in vivo* estar relacionada às baixas concentrações testadas.

Por outro lado, o produto natural não precisa ser necessariamente o melhor composto para o uso farmacêutico (Kingston, 1996). Esses compostos podem servir como protótipo para o desenho racional e desenvolvimento de uma segunda geração de agentes com características melhoradas, como o aumento da eficácia e da estabilidade, a melhora das propriedades farmacocinéticas e a diminuição dos efeitos colaterais (Ortholand *et al.*, 2004). De fato, vários quimioterápicos antineoplásicos utilizados na clínica foram obtidos a partir de modificações estruturas de protótipos naturais, como já exemplificado na introdução deste trabalho.

A abordagem de semi-síntese para o desenvolvimento de drogas pode gerar análogos através da modificação de grupos funcionais existentes no produto natural. Apesar dessa abordagem levar a uma menor diversidade em termos de variedade

estrutural certamente produz muitas moléculas com melhores propriedades do que o produto natural (Lam, 2007). A tigercilina, por exemplo, um análogo semi-sintético da tetraciclina, foi recentemente aprovado pela agência regulatória americana (*Food Drug Administration*- FDA) para o tratamento de infecção bacteriana que é capaz de atuar em microorganismos resistentes à antibióticos convencionais.

O produto natural também pode ser usado para identificar ou gerar um melhor entendimento dos alvos e rotas envolvidas nos processos das doenças. A elucidação do mecanismo antiinflamatório da Aspirina<sup>®</sup> levou ao conhecimento das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), que foi usado para o desenvolvimento de novas drogas antitumorais (Barreiro & Fraga, 2002).

No presente trabalho, ficou evidenciado que moléculas pertencentes à classe dos pterocarpanos comumente encontradas em espécies vegetais, especialmente, nas leguminosas (Veich, 2007), possuem potente atividade citotóxica. No que diz respeito à relação entre a estrutura e atividade citotóxica, o grupamento metoxila no carbono 2 desses pterocarpanos pode ser considerado uma importante unidade farmacofórica para essas moléculas, aumentando sua eficácia de bloqueio da proliferação celular na fase de mitose do ciclo celular. O bloqueio, que não envolve alteração da massa dos microtúbulos, pode ser resultado da interação do composto com uma proteína específica da mitose, ressaltando o potencial anticâncer desta molécula como um protótipo para o planejamento racional de novos fármacos terapeuticamente úteis.

## 6. Conclusão

Pterocarpanos naturais isolados de *Platymiscium floribundum* possuem potente atividade citotóxica preferencialmente em linhagens de células tumorais, causando bloqueio na progressão do ciclo celular na fase de mitose. Este bloqueio parece resultante da interação do composto com proteínas motoras do tipo quinesina envolvidas na separação dos centrossomos durante a mitose. As evidências experimentais apontam, ainda, para o grupamento metoxila no carbono 2 como requisito estrutural importante na atividade farmacológica estudada. O 2,3,9-trimetoxipterocarpano pode ser utilizado como protótipo para o desenho racional de fármacos com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas que possam aumentar sua eficácia antitumoral.

## 7. Referências Bibliográficas

- Barreiro, E. J., Fraga, C. A. M. Química Medicinal: **As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. São Paulo: ARTMED Editora Ltda, 2002.
- Blajeski, A. L., Kottke, T. J., Kaufmann, S. H. A Multistep Model for Paclitaxel-Induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cell Lines. **Experimental Cell Research**, 270: 277-288, 2001.
- Bohlin, L., Rosén, B. Podophyllotoxin derivatives: drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, 1: 343-351, 1996.
- Cajazeiras, M. J. F. Contribuição do Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste *Platymiscium floribundum* Vog (Leguminosae). Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.
- Chabner, B. A., Allegra, C. J., Curt, G. A., Calabressi, P. Agentes antineoplásicos. In: **Goodman & Gilman's: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Ed. By Goodman LS. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill, p. 909-952, 1996.
- Chan, T. A., Hermeking H., Lengauer C., Kinzler K. W., Vogelstein B. 14-3-3sis required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. **Nature**, 401: 616-620, 1999.
- Chaudhuri, S. K., Huang, L., Fulias, F., Brown, D. M., Wani, M. C., Wall, M. E. Isolation and structure identification of an active DNA Strant-Scission Agent, (+)-3,4-di-hidroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan. **Journal of Natural Products**, 58 (12): 1966-1969, 1995.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology** 100: 72-79, 2005.

- Cruchten, S. V., Broeck, W. V. Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. **Anatomia Histologia Embryologia**. 31: 214-223, 2002.
- Dagne, E., Gunatilaka, A. A. L., Kingston, D. G. I. Two Bioactive Pterocarpanes from Erythrina Burana. **Journal of Natural Products**, 56(10): 1831-1834, 1993
- DATASUS . <http://tabnet.datasus.gov.br/> . (30/07/2007)
- Dixon R. A., Steele, C. L. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. **Trends in Plant Science**, 4 (10): 394-400, 1999.
- Engler, T. A., Lynch, K. O., Reddy, J. P., Gregory, G. S. Synthetic pterocarpanes with anti-HIV activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 3: 1229-1232, 1993.
- Falcão, M. J. C., Pouliquem, Y. B. M., Lima, M. A. S., Gramosa, N. V., Costa-Lotufo, L. V., Militão, G. C.G., Pessoa, C., Moraes, M.O., Silveira, E. R. Cytotoxic Flavonoids from *Platymiscium floribundum*. **Journal of Natural Products** 68: 423-426, 2005.
- Foster, I. Cancer: a cell cycle defect. **Radiography**. In Press, 2007
- Frese, K. K., Tuveson, D. A. Maximizing mouse cancer models. **Nature Reviews Cancer**, 7: 645-658, 2007.
- Fukai, T., Marumo, A., Kaitou, K., Kanda, T., Terada, S., Nomura, T. Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract. **Life Sciences**, 71: 1449-1463, 2002.
- George, H. L., VanEtten, H. D. Characterization of Pisatin-Inducible Cytochrome P450s in Fungal Pathogens of Pea That Detoxify the Pea Phytoalexin Pisatin. **Fungal Genetics and Biology** 33: 37-48, 2001.
- Guengerich, F. P. Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, 14: 612-640, 2001.

- Haggarty S. J., Mayer, T. U., Miyamoto, D. T., Fathi, R., King, R. W., Mitchison, T. J., Schreiber, S. T. Dissecting cellular processes using small molecules: identification of colchicine-like, taxol-like and other small molecules that perturb mitosis. **Chemistry & Biology**, 7(4): 275-285, 2000.
- Hait, W. N., Rubina, E., Alli, E., Goodina, S. Tubulin Targeting Agents. **Update on cancer therapeutics**. In Press, 2006.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, 100: 57-70, 2000.
- Hartwell, L. H., Kastan, M. B. Cell cycle control and cancer. **Science**, 266: 1821-1828, 1994.
- Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, 407: 770-776, 2000.
- INCA. <http://www.inca.gov.br/> 13/01/2008.
- Ingham, L. J. Fungal modification of pterocarpan phytoalexins from *Melilotus alba* and *Trifolium pratense*. **Phytochemistry** 15: 1489-95, 1976.
- Jackson, J. R., Patrick, D. R., Dar, M. M., Huang, P. S. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? **Nature Reviews Cancer**, 7: 107-117, 2007.
- Jacobs, R. S., White, S., Wilson, L. Selective compounds derived from marine organisms: effects on cell division in fertilized sea urchin eggs. **Federation Proceedings**, 40: 26-29, 1981.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu J., Thun, M. J. Cancer Statistics, 2007. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**; 57: 43-66, 2007.
- Jordan, M. A., Thrower, D., Wilson, L. Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. **Journal of Cell Science**, 102: 401-416, 1992.
- Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D., Wilson, L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 90: 9552-9556, 1993.

- Jordan, M. A., Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**, 4: 253-265, 2004.
- Kamb, A. What's wrong with our cancer models? **Nature Review, Drug Discovery**, 4: 161-165, 2005.
- Kingston D. G. I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. **The Practice of Medicinal Chemistry**. Ed. by Wermuth CG. Academic Press Limited, 1996, p. 102-114.
- Kingston, D. G. I. Recent advances in chemistry of taxol. **Journal of Natural Products**, 63: 726-734, 2000.
- Kops, G. J. P. L., Weaver, B. A. A., Cleveland, D. W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. **Nature Reviews Cancer**, 5: 773-785, 2005.
- Korolkovas, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1998, cap. 12.
- Kruczynski, A; Hill, B. T. Vinflunine, the latest vinca alkaloids in clinical development. A review of its preclinical anticancer properties. **Clinical Review in Oncology/Hematology**, 40:159-173, 2001.
- Kurosawa, K., Ollis, W. D., Redman, B. T., Sutherland, I. O., Gottlieb, O. R. Vestitol and Vesticarpan, isoflavonoids from *Machaerium vestitum*. **Phytochemistry** 17: 1413-15, 1978.
- Lam, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, 15 (6): 279-289, 2007.
- Lang., P., Yeow, K., Nichols, A, Scheer, A. Cellular imaging in drug discovery. **Nature Review Drug Discovery**, 05: 343-356, 2006.
- Lee, Y. L., Kim, H. J., Lee, M. S., Kim, J. M., Han, J. S., Hong, E. K., Kwon, M. S., Lee, M. J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor

- growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Experimental Animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science**, 52: 371 - 375, 2003.
- Lenart, P., Petronczki, M., Steegmaier, M., Di Fiore, B., Lipp, J. J., Hoffmann, M., Rettig, W. J., Kraut, N., Peters, J. M. The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase. **Current Biology**, 17: 304–315, 2007.
- Letchier, M. R., Shirley, M. I. Phenolic compounds from the heartwood of *Dalbergia nitidula*. **Phytochemistry** 15: 354-355, 1976.
- Liu, W. M., Lawrence, A. J., Joel, S. P. The importance of drug scheduling and recovery phases in determining drug activity: improving etoposide efficacy in BCR-ABL-positive CML cells. **European Journal of Cancer**, 38: 842-850, 2002.
- Louro, I. D., Lerena, J. C., Melo, M.S.V., Ashton-Prolla, P., Conforti-Froes N. **Genética Molecular do Câncer**. Ed. MSG Produção Editorial, 2002 cap. 6, 63-79.
- Macias, F. A., Simonet, A. M., Galindo, J. C. G., Castellano, D. Bioactive phenolics and polar compounds from *Melilotus messanensis*. **Phytochemistry**, 50: 35-46, 1999.
- Magalhães, H. I. F., Veras, M. L., Torres, M. R., Alves, A. P. N. N., Pessoa, O. D. L., Silveira, E. R., Costa-Lotufo, L. V., Moraes, M. O., Pessoa, C. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 58: 235-241, 2006.
- Mann, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, 2: 143-148, 2002.
- Mansuy, D. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis. **Comptes Rendus Chimie**, 10: 392-413, 2007.
- Marx, J. How cells cycle toward cancer. **Science**, 263: 319-322, 1994.



- Maurich, T., Iorio, M., Chimenti, D., Turchi, G. Erybraedin C and bitucarpin A, two structurally related pterocarpan purified from *Bituminaria bituminosa*, induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines MMR- and p53-proficient and -deficient in a dose-, time-, and structure-dependent fashion. **Chemico-Biological Interactions**, 159: 104–116, 2006.
- Mayer, T. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., Schreiber, S. L., Mitchison, T. J. Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. **Science**, 286: 971–974, 1999.
- McMurry, T. B. H., Martin, E., Donnelly, D. M. X., Thompson, J. C. 3-hydroxy-9-methoxy and 3-methoxy-9-hydroxy-pterocarpan. **Phytochemistry** 11: 3283-6, 1972.
- Middleton, E. Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. **Pharmacological Reviews**, 52: 673-751, 2000.
- Militão, G. C. G. Potencial Antitumoral de flavonóides isolados de Plantas do Nordeste Brasileiro: estudos preliminares da relação estrutura-atividade citotóxica. Dissertação (Mestrado em farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.
- Militão, G. C. G., Dantas, I. N. F., Pessoa, C., Falcão, M. J. C., Silveira, E.R., Lima, M.A.S., Curi, R., Lima, T., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V. Induction of apoptosis by pterocarpan from *Platymiscium floribunbum* in HL60 human leukemia cells. **Life Sciences**, 78: 2409-2417, 2006.
- Militão, G. C. G., Jimenez, P. C., Wilke, D. V., Pessoa, C., Falcão, M. J. C., Lima, M. A. S., Silveira, E. R., Moraes, M. O., Costa-Lotufo, L.V. Antimitotic properties of

- Pterocarpan isolated from *Platymiscium floribundum* on Sea Urchin Eggs. **Planta Medica**, 71: 683-685, 2005.
- Militão, G. C. G., Pinheiro, S. M., Dantas, I. N. F., Pessoa, C., Moraes, M. O. M., Costa-Lotufo, L. V., Lima M. A. S., Silveira, E. R. Bioassay-guided fractionation of pterocarpan from roots of *Harpalyce brasiliensis* Benth. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 15(21): 6687-6691, 2007.
- Mitscher, L. A., Gollapudi, S., Gerlach, D. C., Drake, S. D., Veliz, E. A., Ward, J. A. Erycristin, A new antimicrobial pterocarpan from *Erythrina crista-galli*. **Phytochemistry**, 27(2): 381-385, 1988.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65: 55-63, 1983.
- Nakagawa, M., Nakanishi, K., Darko, L. L., Vick, J. A. Structure of cabenegrins A-I and A-II, potent antivenom snake venoms. **Tetrahedron Letters**, 23: 3855-3858, 1982.
- Nakayama, K. N., Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell cycle control and cancer. **Nature Reviews Cancer**, 6: 369-381, 2006.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. Natural products from marine invertebrates and microbes as modulators of antitumor targets. **Current Drug Targets**, 7(3):279-304, 2006.
- Ngan, V. K., Bellman, K., Hill, B. T, Wilson, L., Jordan, M. N. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by the semisynthetic vinca alkaloids vinorelbine and its newer derivative vinflunine. **Molecular Pharmacology**, 60: 225-232, 2001.
- O' Marcaigh, A. S., Betcher, D. L. The vinca alkaloids. **Journal of Pediatric Oncology Nursing**, 12(3): 140-142, 1995.

- Ortholand, J. Y., Ganesan, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Current Opinion in Chemical Biology**. 8: 271-280, 2004.
- Pueppke, S. G., VanEtten, H. D. Identification of three new pterocarpan (6a,11a-dihydro-6H-benzo-furo[3,2-c][1]benzopyrans) from *Pisum sativum* infected with *Fusarium solani* f. sp. *lisi*. **Journal of Chemical Society**. Perkin transactions I: 946-8, 1975.
- Hang, H. P., Dale M. M., Ritter, J. M., Moore P. K. Farmacologia 5<sup>a</sup> Edição. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 2004.
- Raphael A. M. Moraes,<sup>b</sup> Diogo A. Pinheiro,<sup>b</sup> Fabri'cio F. A. Fernandes,<sup>b</sup>
- Rocha, A. B., Lopes, R. M., Schwartzmann, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, 1: 364-369, 2001.
- Rodriguez-Antona, C. Ingelman-Sundberg, M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. **Oncogene**, 25: 1679-1691, 2006.
- Ryan, A. J., Squires, S., Strutt, H. L., Jonhson, R. T. Camptothecin cytotoxicity in mammalian cells is associated with the induction of persistent double strand break in replicating DNA. **Nucleic Acids Research**, 19: 3295-3300, 1991.
- Santos, M. D. *Lychnophora ericoides* Mart: avaliação farmacológica e considerações sobre o metabolismo oxidativo das substâncias bioativas. Tese (Doutorado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- Santos, M. D., Martins, P. M., Santos, P. A., Yamamoto, R. B. Y., Lopes, N. P. Oxidative metabolism of 5-o-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), a bioactive natural product, by metalloporphyrin and rat liver mitochondria. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 26: 62-70, 2005.

- Schabel, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacology & Therapeutics**, 1: 411 - 435, 1977.
- Schmidt, M., Bastians, H. Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. **Drug Resistance Updates**, 10: 162-81, 2007.
- Seo, E-K., Kim, N-C., Mi, Q., Chai, H., Wall, M. O., Wani, M. C., Navarro, H. A., Burgess, J. P., Graham, J. G., Cabieses, F., Tan, G. T., Farnsworth, N. R., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. Macharistol, a new cytotoxic cinnamylphenol from the Stems of *Machaerium aristulatum*. **Journal of Natural Products**, 64: 1483-1485, 2001.
- Silva, A. J. M., Coelho, A. L., Simas, A. B. C., Moraes, R. A. M., Pinheiro, D. A., Fernandes, F. F. A., Arruda, E. Z., Costa, P. R. R., Melo, P. A. Synthesis and pharmacological evaluation of prenylated and benzylated pterocarpanes against snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 14: 431-435, 2004.
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A. Petrovick, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5a ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS, 2003 cap. 23, p. 577-614, 2003.
- Soby, S., Caldera, S., Bates, R., Vanetten, H. Detoxification of the phytoalexins maackiain and medicarpin by fungal pathogens of alfalfa. **Phytochemistry**, 41(3): 759-765, 1996.
- Soby, S., Bates, R., Vanetten, H. Oxidation of the phytoalexin maackiain to 6,6a-dihidroxy-maackiain by *colletotrichum gloeosporioides*. **Phytochemistry**, 45: 925-929, 1997.
- Srivastava, V., Negi, A. S., Kumar, J. K., Gupta, M. M., Khanuja, S. P. S. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 13: 5892-5908, 2005.