

Maicon Roberto Kwiecinski

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE *BIDENS*
PILOSA LINNÉ RICOS EM POLIACETILENOS E DE
JUGLONA ASSOCIADA AO ASCORBATO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa

Florianópolis
2013

Este trabalho é dedicado aos meus colegas de pós-graduação e minha querida família, pais, irmãs e Luiz Guilherme Buchmann Figueiredo.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente, a Deus pela proteção infalível;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por providenciar auxílio para realização deste projeto sob a forma de bolsa de estudos;
- Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBQA) e à Universidade Federal de Santa Catarina;
- À minha orientadora, Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa, pelo apoio e parceria;
- Ao apoio do grupo *Toxicology and Cancer Biology Research Group* (GTOX) da *Université catholique de Louvain* (UCL) de Bruxelas, Bélgica. Sobretudo Prof. Dr. Pedro Buc Calderón, Dr. Julien Verrax, Dr. Brice Sid, pós-graduando Christophe Glorieux e demais queridos colegas pelo suporte técnico-teórico. Às técnicas Sra. Véronique Allaëys, Sra. Isabelle Blave; Sra. Patricia Debluts e Sr. Luc Gesché;
- À querida Dra. Maria Helena Rossi, pelo apoio com a parte de extração, identificação e depósito da exsicata de *B.pilosa*;
- À Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira e sua aluna orientada Patricia Benelli, pela parte de extração supercrítica;
- Ao Prof. Dr. Claus Tröger Pich, pelo apoio com o ensaio de indução de danos diretos sobre o DNA;
- Aos meus colegas do LABIOEX, Karina Bettega Felipe, João Francisco Gomes Correia, Tânia Mara Fischer Günther, Fabiana Ourique, Eduardo Antônio Ferreira, Eduardo Benedetti Parisotto, Valdelúcia Grinevicius, Nádia Falcão Buckner, Mirelle Sifroni Farias, Carla Cristine Baron, Bruna Ferraro, Marjorie Marin, Nádia Motta e aos que virão;
- À banca examinadora, Profa. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza, Prof. Dr. Jamil Assreuy, Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferreira, Prof. Dr. Pedro Buc Calderón, Dra. Maria Helena Rossi e Profa. Dra. Andreza Fabro de Bem.
- Aos meus amados, pais, irmãs Melina e Maisa Kwiecinski e família, Guilherme Buchmann Figueiredo, Neusa Maria Buchmann Figueiredo e família;
- Finalmente, a todos os meus amigos.

RESUMO

Introdução. *Bidens pilosa* L. é uma planta considerada medicinal que contém poliacetilenos presumivelmente responsáveis por ações antitumorais. As quinonas, como a juglona, também compreendem uma classe de substâncias de interesse por seu potencial antitumoral. Além disto, evidências indicam que a associação de ascorbato com algumas quinonas pode potencializar a atividade antitumoral. **Objetivos.** Avaliar o efeito antitumoral do extrato de *B.pilosa* obtido pela tecnologia supercrítica, a fim de obter um extrato rico em poliacetilenos (SFE) com atividade superior em comparação ao extrato obtido por maceração hidroetanólica (HCE). Testar a administração de juglona isoladamente ou em associação ao ascorbato em células T24 pela citotoxicidade; caracterizado o mecanismo de morte celular induzido, indução de estresse oxidativo, efeito antiproliferativo e preliminarmente, anti-invasivo *in vitro*. Por fim, avaliar a administração de juglona e ascorbato em associação a quimioterápicos convencionais, doxorrubicina e cisplatina. **Metodologia.** A composição fitoquímica dos extratos foi avaliada por cromatografia em camada delgada e espectrofotometria UV-Vis. A citotoxicidade para células MCF-7 e T24 foi avaliada pelo ensaio do MTT. O potencial lesivo sobre o DNA foi avaliado *in vitro* pela motilidade eletroforética de DNA plasmidial e imunoeletoforese para fosforilação da histona gama-H2Ax em células T24. Foram avaliados marcadores de danos oxidativos, geração celular de EROs e conteúdo de GSH, também a fosforilação do fator de iniciação eucariótico 2 eIF2 α . Foi avaliada a morfologia das células em processo de morte, sendo também verificada a ativação de caspases por espectrofluorimetria e clivagem da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) por imunoeletoforese. A atividade antiproliferativa foi medida pelo ensaio de formação de colônias. A inibição da motilidade celular foi investigada pelo ensaio de migração. A atividade antitumoral *in vivo* foi medida em camundongos Balb-c portadores de tumor ascítico de Ehrlich. **Resultados.** Os espectros sobre os constituintes majoritários de SFE apresentaram bandas típicas de poliacetilenos com picos de absorção na faixa do UV registrados em 208, 269 e 334 nm. A citotoxicidade *in vitro* foi dependente da concentração dos extratos. Às 24h, a CI₅₀ foi 811 e 437 μ g/mL, respectivamente para HCE e SFE, reduzindo para 291 μ g/mL às 48h, no caso de SFE. Às 24h, a CI₅₀ foi 28,5 μ M para juglona, reduzindo para 6,3 μ M, quando associada ao ascorbato 1 mM. A citotoxicidade da cisplatina chegou a dobrar devida sua associação com juglona e ascorbato. HCE causou danos no DNA em

160 µg/mL, ao passo que 40 µg/mL de SFE causaram danos equivalentes. Juglona iniciou danos sobre o DNA em 20 µM, ao passo que 5 µM associados ao ascorbato 1 mM causaram danos equivalentes. A juglona induziu à geração celular de EROs e consumo de GSH; iniciando fosforilação do eIF2 α que indica estresse de retículo endoplasmático. Estes efeitos foram potencializados em até 4 vezes pela associação ao ascorbato. A juglona sozinha ou associada ao ascorbato não causou ativação de caspases; corroborando a morfologia das células T24 em processo de morte, o processo induzido provavelmente está mais relacionado à necrose. Em tratamentos subletais, a juglona diminuiu a proliferação e a motilidade de células T24, ambos os processos potencializados pela associação ao ascorbato, que induziu à morte clonogênica. Finalmente, os ensaios *in vivo* indicaram que ambos os extratos de *B. pilosa* apresentaram atividade, mas SFE causou redução superior do volume de líquido ascítico e células compactadas (4 ± 1 e $1 \pm 0,4$ mL, respectivamente), ao mesmo tempo em que resultou em maior aumento no tempo de sobrevivência (~31%) em comparação aos animais do controle negativo. A inibição do crescimento tumoral determinada para HCE foi de cerca de 40%, ao passo que esta determinação ultrapassou 60% no caso de SFE. **Conclusão.** A extração com fluido de CO₂ supercrítico é uma alternativa para a obtenção de um extrato de *B. pilosa* rico em poliacetilenos citotóxicos com atividade antitumoral superior em comparação ao extrato obtido por maceração hidroetanólica. O ascorbato potencializa a citotoxicidade, o efeito antiproliferativo e inibidor da motilidade de células T24 *in vitro* da juglona. Os achados deste trabalho levam a sugerir que a dose do tratamento feito com juglona pode ser ajustada, em termos de redução da mesma, em até 4 vezes, se a juglona for administrada em associação ao ascorbato.

Palavras-chave: Antitumoral. *B. pilosa*. Poliacetilenos. Extração com fluido supercrítico. Juglona. Ascorbato. Citotoxicidade. Antiproliferativo. Anti-invasivo. Potencialização.

ABSTRACT

Introduction. *Bidens pilosa* L. is a plant considered medicinal containing polyacetylenes expected to be responsible for antitumor actions. Quinones, such as juglone, comprise a class of substances of interest also due to their antitumor potential. Furthermore, evidences indicate that the combination of ascorbate with some quinones can result in potentiated antitumor activity. **Objectives.** The supercritical technology was assessed to obtain an extract from *B.pilosa* rich in polyacetylenes (SFE) with superior antitumor activity compared to that of the extract obtained by hydroethanol maceration (HCE). Juglone was tested administered alone and/or combined with ascorbate on T24 cells for cytotoxicity, the mechanism of cell demise was characterized, oxidative stress induction; antiproliferative and, preliminarily, anti-invasive effects. Juglone and ascorbate were evaluated for the cytotoxicity in combination with the conventional chemotherapeutics doxorubicin and cisplatin. **Methodology.** The phytochemical composition of extracts was evaluated by thin layer chromatography with UV-Vis spectroscopy. Cytotoxicity on MCF-7 and T24 cells was checked by the MTT assay. The damaging potential on DNA was assessed *in vitro* by the electrophoretic motility of plasmid DNA and immunoelectrophoresis for phosphorylation of histone gamma-H2Ax in T24 cells. Markers of oxidative stress, ROS generation and GSH consumption, and the phosphorylation of the eukaryotic initiation factor eIF2 α were analyzed as well. The induced cell death process was monitored by caspase activation through spectrofluorimetry and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage by immunoelectrophoresis. The antiproliferative action was measured by the colony forming assay. Cell motility inhibition was investigated by a migration assay. *In vivo* antitumor activity was measured in Ehrlich carcinoma-bearing Balb-c mice. **Results.** Spectra about the major constituents in SFE presented typical bands of polyacetylenes recorded in UV at 208, 269 and 334 nm. Cytotoxicity *in vitro* was concentration-dependent. At 24 h, IC₅₀ was 811 and 437 $\mu\text{g/mL}$, respectively for HCE and SFE on MCF-7 cells, falling to 291 $\mu\text{g/mL}$ at 48 h, in the case of SFE. At 24h, IC₅₀ was 28.5 μM for juglone on T24 cells, falling to 6.3 μM when it was combined with ascorbate 1 mM. At 24 h, the cisplatin's cytotoxicity on T24 cells increased up to 2-fold due to its combination with juglone and ascorbate. HCE caused DNA damage at 160 $\mu\text{g/mL}$, whereas SFE at 40 $\mu\text{g/mL}$ caused equivalent damage. Juglone triggered DNA damage at 20 μM , whereas 5 μM in combination with ascorbate 1 mM caused equivalent

damage. Juglone caused reduction in terms of ROS generation and increased GSH consumption, triggering eIF2 α phosphorylation that indicates endoplasmic reticulum stress. These actions were potentiated up to 4-fold due to the combination of juglone with ascorbate. Juglone alone or combined with ascorbate did not cause caspase activation, corroborating T24 cell morphology under demise, the induced cell death process seems to be close related to necrosis. Under sublethal treatments, juglone reduced the proliferation and the motility of T24 cells, both actions were potentiated due to the combination with ascorbate, something that finally induced to clonogenic cell death. *In vivo* assays indicated that both extracts from *B. pilosa* had activity, but SFE caused superior reduction in terms of ascitic fluid volume and packed cells (4 ± 1 e 1 ± 0.4 mL, respectively). Furthermore, SFE increased more the animals life span (~31%) compared to animals from the negative control. The tumor growth inhibition by HCE was about 40%, whereas more than 60% was reached by SFE. **Conclusion.** Supercritical extraction with fluid CO₂ is a choice to obtain an extract from *B. pilosa* rich in cytotoxic polyacetylenes with superior antitumor activity in comparison to that of the extract obtained by hydroethanol maceration. Ascorbate potentiated the cytotoxicity, the antiproliferative action and the inhibition of T24 cells motility *in vitro* by juglone. These findings lead to suggest that the dose of the treatment done with juglone can be adjusted, in terms of reduction, up to 4-fold, if juglone is administered in combination with ascorbate.

Keywords: Antitumor. *B. pilosa*. Polyacetylenes. Supercritical fluid extraction. Juglone. Ascorbate. Cytotoxicity. Antiproliferative. Anti-invasive. Potentiation.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<i>Página</i>
Figura 1.	O ciclo celular e a atividade das cinases dependentes de ciclina.....	32
Figura 2.	Atividade do p53 (A). As vias de apoptose mediada pelo p53 mitocondrial e citosólica (B). A liberação do citocromo-c e ativação das caspases por via intrínseca mitocondrial (C). A ativação da apoptose por via extrínseca pelo receptor de morte FAS (D).....	36
Figura 3.	A via de sinalização celular das cinases ativadas por mitógeno (MAPKs).....	40
Figura 4.	A via de sinalização celular PI3K/Akt/mTOR.....	42
Figura 5.	<i>Bidens pilosa</i> Linné.....	52
Figura 6.	Fórmula estrutural dos poliacetilenos.....	54
Figura 7.	Diagrama esquemático do equipamento de extração com fluido supercrítico.....	56
Figura 8.	Parabenzoquinona, o núcleo quinóide (A); 1,4-Naftoquinona (B); Antraquinona (C); Daunorrubicina (D).....	58
Figura 9.	Biorredução de quinona e ciclo redox.....	60
Figura 10.	Ciclo redox: biorredução não enzimática da quinona menadiona pelo ascorbato.....	62
Figura 11.	Estrutura química da juglona.....	65
Figura 12.	Foto-oxigenação do 1,5 diidróxinaftaleno.....	73
Figura 13.	Esquema de clivagem do DNA plasmidial (A). Imagem do gel obtido pela eletroforese do DNA plasmidial intacto e clivado em uma ou duas fitas (B).....	74
Figura 14.	Avaliação do potencial para clivar o DNA plasmidial...75	
Figura 15.	Esquema do procedimento para o ensaio de migração...81	
Figura 16.	Citotoxicidade de SFE e HCE sobre células MCF-7 após incubação de 24h (A); Citotoxicidade de SFE às 48h de incubação (B).....	86
Figura 17.	SFE cromatografado em camada delgada, constituintes majoritários contidos na mancha A (A); Espectro de varredura UV-Vis obtido a partir da solução composta pelas substâncias da mancha A em metanol P.A. com bandas típicas de poliacetilenos.....	88
Figura 18.	Efeito dos tratamentos feitos com o extrato hidroetanólico HCE e extrato supercrítico SFE de <i>B. pilosa</i> (10 – 160	

µg/mL) sobre o DNA plasmidial. Primeiramente, o efeito dos controles, Fe-EDTA (20 µM), utilizado para o controle positivo, causa danos sobre o DNA plasmidial. Por outro lado, a conformação FI é predominante no DNA tratado para o controle negativo (NEG) (painel A). Os níveis de danos no DNA plasmidial causados pelo HCE e SFE, respectivamente (painéis B e C).....90

Figura 19.	Atividade antitumoral (%) dos tratamentos feitos com doxorubicina, SFE ou HCE em camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich, com base no volume de fluido ascítico.....94
Figura 20	Viabilidade celular de células T24 incubadas por 3, 6, 9, 12 ou 24h com juglona em diferentes concentrações (0 a 40 µM) (A) ou associada ao ascorbato 1 mM (B).....97
Figura 21	A viabilidade de células T24 incubadas por 24h com juglona 10 µM e ascorbato 1 mM, administrados separadamente ou em associação, e a viabilidade das células quando o meio de cultura com juglona e ascorbato foi suplementado com N-acetilcisteína (NAC) 3 mM ou catalase (CAT) 100 U/mL.....98
Figura 22	Imunoeletroforese para detecção da clivagem da proteína PARP em homogenato total de células T24 tratadas por 4 h com juglona (Jug) (1-10 µM) e/ou ascorbato 1 mM (Asc).....102
Figura 23	Morfologia das células T24 incubadas por 24h com ascorbato 1mM ou juglona 10µM separadamente ou associados. Aumento de 400x sob o microscópio óptico.....103
Figura 24	Conteúdo celular de EROs em células T24 determinado após 2h de incubação com juglona 10 µM, ascorbato 1 mM, N-acetilcisteína 3 mM e catalase 100 U.....104
Figura 25	Conteúdo de GSH em células T24 após 3h de incubação com juglona 10 µM, ascorbato 1 mM, N-acetilcisteína 3 mM e catalase 100 U.....105
Figura 26	Fosforilação da histona 2A (γ-H2Ax) em homogenato de células T24 total após tratamento (4h) com juglona 5-20 µM (Jug) ou ascorbato 1 mM (Asc), administrados separadamente ou em associação.....107
Figura 27	Fosforilação do fator de iniciação eucariótico eIF2 em sua

	subunidade α (p eIF2 α) em homogenato de células T24 total após tratamento (4h) com juglona 5-20 μ M (Jug) ou ascorbato 1 mM (Asc), administrados separadamente ou em associação.....	109
Figura 28	Efeito antiproliferativo em células T24 determinado aos 10 dias depois de um tratamento realizado por 2h à base de juglona (1-5 μ M) e de associação juglona mais ascorbato 1 mM. Também a recuperação da proliferação devido à adição de N-acetilcisteína 3 mM (NAC) ou catalase 100 U/mL (CAT).....	111
Figura 29	Inibição da motilidade de células T24 por ascorbato de sódio 1 mM, juglona 2,5 μ M e associação juglona 2,5 μ M + ascorbato de sódio 1 mM.....	113
Figura 30	Viabilidade de células T24 tratadas com juglona 5 μ M, ascorbato 1 mM ou cisplatina 20 μ M, administradas separadamente ou em associação por 24h.....	116

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela</i>		<i>Página</i>
Tabela 1.	Efeito dos tratamentos realizados com os extratos de <i>B.pilosa</i> (HCE ou SFE, 100 mg/kg) ou doxorubicina (DOX, 0,06mg/kg) em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich e controles.....	92
Tabela 2	Atividade das caspases (caspase 3, principalmente) em células T24 tratadas com juglona (0-10 µM) ou ascorbato 1 mM,, administrados separadamente ou associados por 6 e 24h.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Álcool etílico
AFC	7-amino-4 trifluorometil cumarina
ANOVA	Análise de variância
Asc	Ascorbato de sódio
ATG	Gene relacionado à autofagia
ADP / ATP	Nucleotídeo de adenina difosfato ou trifosfato, respectivamente.
bFGF	Fator básico tipo 2 de crescimento dos fibroblastos
CAT	Catalase
CDKs	Cinases dependentes de ciclinas
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CI₅₀	Concentração inibitória 50%
CINCAN	Centro de Compreensão do Câncer
CRC	<i>The British Cancer Research Campaign</i>
CO₂	Dióxido de carbon
DCFH-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
DED	<i>Death effector domain</i> ou domínio efetor de morte
DEVD	Sequencia aspartate-glutamato-valina-aspartato
DL50	Dose letal 50%
DMEM	Meio Dulbecco modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOI	<i>Digital object identifier</i>
DTNB	Ácido 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitól
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> ou fator de crescimento epidermal
eIF2α	Subunidade α do fator eucariótico de iniciação 2
EORTC	<i>The European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FasR	Receptor FAS

Fe	Ferro
GDP	Difosfato de guanosina
GLUT	Transportador de glucose
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GTOX	<i>Toxicology and Cancer Biology Research Group</i>
GTP	Trifosfato de guanosina
GTPase	Hidrolase de trifosfato de guanosina
Gama-H2Ax	Histona 2Ax gama ou fosforilada
HBSS	Solução salina tampão de Hank
H₂CO₂	Ácido fórmico
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCE	Extrato de <i>B.pilosa</i> obtido por maceração hidroetanólica
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano
IARC	<i>International agency for research on cancer</i>
IC50	<i>Inhibitory concentration 50</i> ou equivalente à CI50 em português
INCA	Instituto nacional do câncer
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
ISREC	Institute for experimental research on cancer
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JUG	Juglona
LABIOEX	Laboratório de bioquímica experimental
LATESC	Laboratório de termodinâmica e extração supercrítica
LICR	Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer
MAPK	Proteína-quinase ativada por mitógeno
MCF-7	Linhagem de células de carcinoma humano de mama
MDR	Multidrug resistance ou resistência multifármacos
MS	Ministério da Saúde
MTT	Sal de 3-(4,5-dimetil -2-tiazol)2,5-difenil-brometo de tetrazólio
NAC	N- acetilcisteína
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato reduzido
NCI	National Cancer Institute
NQO	NAD(P)H:quinona oxidoreductase
O₂^{•-}	Ânion superóxido
OH[•]	Radical hidroxila
OMS	Organização mundial da saúde
P.A.	Para análise
PAL	Percentual de aumento da longevidade

PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PBS	Salina tamponada de fosfato
PGCC	The Presidential Green Chemistry Challenge
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinase
PICT	Percentual de inibição do crescimento do tumor
Pin 1	Peptidil-prolil cis/trans isomerase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato
PIC	Complexo de pré-iniciação
PK	Fosfocinase
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA_t	Ácido ribonucleico transportador
RPM	rotações por minuto
SFE	Extrato supercrítico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poli(acrilamida) dodecil sulfato de sódio
SH2	Homologia 2 da sequencia Src
SOAD	Gabiente Sul Americano de Desenvolvimento de Fármacos Antitumorais
t ½	Tempo de meia vida
T24	Células de carcinoma humano de células transicionais de bexiga
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
TC	Complexo ternário
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TMS	Tempo médio de sobrevivida
UFCs	Unidades formadoras de colônia
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UICC	<i>Union for international cancer control</i>
UV-Vis	Ultravioleta - visível
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

Conteúdo:

Página:

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1 Epidemiologia do câncer.....	27
1.2 Câncer: histórico e terminologia.....	28
1.3 A carcinogênese e suas bases moleculares.....	29
1.4 Falhas nos mecanismos reguladores do ciclo celular.....	31
1.5 Falhas nos mecanismos de morte celular.....	33
1.6 Vias de sinalização celular operam de forma autossuficiente no câncer.....	39
1.7 Estresse oxidativo: carcinogênese e tratamento do câncer.....	42
1.8 Estresse oxidativo pode causar estresse de retículo endoplasmático	43
1.9 Invasão e metástase.....	44
1.10 Tratamento do câncer.....	46
1.11 Pesquisas de novos fármacos antitumorais.....	48
1.12 <i>Bidens pilosa</i> Linné.....	51
1.13 Poliacetilenos antitumorais de <i>B.pilosa</i>	53
1.14 Extração com fluido supercrítico.....	55
1.15 Quinonas antitumorais.....	57
1.16 Efeito da associação quinona e ascorbato.....	61
1.17 Juglona.....	64
1.18 Desenvolvimento sustentável de fármacos.....	66
2. OBJETIVOS.....	69
2.1 Objetivo geral.....	69
2.2 Objetivos específicos.....	69
3. MATERIAIS e MÉTODOS.....	71
3.1 Reagentes químicos e anticorpos.....	71
3.2 Material vegetal.....	71
3.3 Extração a partir de <i>B.pilosa</i>	72
3.4 Presença de poliacetilenos em SFE.....	72
3.5 Obtenção de Juglona.....	73
3.6 Avaliação do potencial indutor de danos diretos sobre DNA plasmidial.....	73
3.7 Cultura de célula.....	75
3.8 Avaliação da viabilidade celular.....	75
3.9 Morfologia das células em processo de morte.....	77

3.10 Medida do conteúdo celular de EROs.....	77
3.11 Conteúdo celular de glutatona reduzida.....	78
3.12 Ensaio de imunoeletoforese.....	78
3.13 Atividade das caspases.....	79
3.14 Ensaio de formação de colônias ou ensaio clonogênico.....	80
3.15 Ensaio <i>in vitro</i> de migração.....	81
3.16 Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	82
3.17 Análise estatística.....	83
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	85
4.1 Atividade antitumoral de extratos de <i>B. pilosa</i>	85
4.1.1 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	85
4.1.2 Presença majoritária de poliacetilenos em SFE.....	87
4.1.3 Indução de danos sobre o DNA plasmidial.....	89
4.1.4 Atividade antitumoral <i>in vivo</i> dos extratos de <i>B. pilosa</i>	91
4.2 Atividade antitumoral da juglona e sua associação com ascorbato de sódio.....	95
4.2.1 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	97
4.2.2 Tipo de morte celular induzida.....	100
4.2.2.1 Atividade das caspases.....	101
4.2.2.2 Clivagem da PARP.....	102
4.2.2.3 Morfologia das células em processo de morte.....	103
4.2.3 Participação do estresse oxidativo na citotoxicidade da juglona e sua associação com ascorbato.....	104
4.2.3.1 Geração de EROs aumentada.....	104
4.2.3.2 Indução ao consumo de GSH.....	105
4.2.4 Danos ao DNA causados pela juglona e sua associação com ascorbato.....	106
4.2.5 Fosforilação do fator iniciador eucariótico eIF2 e estresse de retículo endoplasmático.....	108
4.2.6 Inibição da proliferação.....	110
4.2.7 Inibição da motilidade celular.....	112
4.2.8 Associação da juglona e ascorbato com doxorubicina e cisplatina.....	115
4.3 Considerações finais.....	117
5. CONCLUSÃO.....	117
6. PERSPECTIVAS.....	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
ANEXO - A.....	145
ANEXO - B.....	146

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer

De acordo com os dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos, sendo considerada a segunda causa principal de óbitos nos países em desenvolvimento (JEMAL et al., 2011).

A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC/OMS) estimou em 2011 que ocorressem 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Destes, os mais incidentes foram o câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), mama (1,29 milhões) e cólon e reto (1,15 milhões). Devido ao mau prognóstico, o câncer de pulmão foi considerado a principal causa de morte (1,31 milhões), seguido pelo câncer de estômago (780 mil óbitos) e pelo câncer de fígado (699 mil óbitos). Para América do Sul, Central e Caribe, estimou-se cerca de um milhão de casos novos de câncer e 589 mil óbitos. Em homens, o mais comum foi o câncer de próstata, seguido por pulmão, estômago, cólon e reto. Nas mulheres, o mais frequente foi o câncer de mama, seguido do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão (IARC/OMS, 2011).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2011 apontaram para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, foram os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (INCA, 2011).

Estima-se que, se medidas não forem tomadas, nos próximos 10 anos, outros 84 milhões de indivíduos poderão vir a óbito devido ao câncer. O governo brasileiro, ao considerar estes dados, afirma que o foco de incentivo à pesquisa oncológica é relevante face às estimativas da *Union for International Cancer Control* (UICC), para um aumento de 50% até 2020 no número de novos casos de câncer e o dobro do número de mortes. No Brasil, esse desafio é maior porque temos uma sobrevida em câncer em torno de 2 a 4 anos, enquanto nos países desenvolvidos esse índice sobe para 12 a 16 anos. Os motivos para esta diferença são complicados para serem precisados, mas existem alguns aspectos que merecem observação. Um deles tem a ver com os incentivos às pesquisas em saúde no Brasil. Durante muito tempo, os incentivos pelo

Ministério da Saúde não foram efetivos, o que se pode dizer que só começou a acontecer a partir de 2003. Mesmo assim, os investimentos para a pesquisa em saúde ainda não são direcionados às doenças mais prevalentes; apenas 10% dos investimentos são voltados a doenças que afetam 90% da população. A pesquisa em saúde no Brasil ainda carece de tecnologia e inovação, o que pode ser expresso pelo baixo número de patentes comparado a nossa publicação científica. Nem sempre o conhecimento gerado em outros países, com diferenças étnicas e genéticas, amolda-se ao perfil da população brasileira, havendo, portanto, necessidade de incentivo à avaliação de incorporação tecnológica com vistas à sua incorporação ao sistema único de saúde (SUS) (INCA, 2011).

1.2 Câncer: histórico e terminologia

Historicamente, o estudo das neoplasias interessava principalmente aos médicos do passado que eram procurados pela cura de pacientes com “tumores” (etimologicamente, “calo ou caroço” do grego “*onkos*”). Os clínicos da época classificaram os tumores primeiramente em duas categorias, benignos ou malignos, de acordo com seu prognóstico. Em geral, os tumores benignos eram, e são ainda assim considerados, aqueles circunscritos, frequentemente separados dos tecidos normais adjacentes por uma cápsula, crescem lentamente, e em geral, não ameaçam a vida do indivíduo. Por outro lado, as condições com desenvolvimento invasivo, com geração de tumores secundários que ocorrem inclusive em órgãos distantes, foram consideradas os tumores malignos, hoje denominados “câncer”. A própria palavra câncer, que tem origem no grego (“*karkinos*”), significa caranguejo. A medicina moderna escolheu este nome para denominar a doença, pois as células cancerosas atacam e infiltram-se nos tecidos sadios como se fossem os tentáculos de um caranguejo (REDDY et al., 2003; SOTO; SONNENSCHNEIN, 2004; PAPAVERAMIDOU et al., 2010). Em geral, a progressão dos tumores malignos segue uma sequência evolutiva: crescimento local, metástase a partir de vasos sanguíneos ou linfonodos regionais migrando para outros órgãos e óbito (COZZI, 2003). Depois do tratamento, os tumores malignos frequentemente podem reincidir, tanto localmente, como à distância da situação primária. Muitos pacientes morrem em consequência destes eventos (SOTO; SONNENSCHNEIN, 2004).

No entanto, atualmente se sabe que estas generalizações incluem um bom número de exceções. Nas últimas décadas, a denominação “câncer” tem ganhado sentido mais amplo, enquanto o termo “tumor” passou a servir para representar um aumento regional de volume ou tumefação tecidual, podendo ser ou não de caráter neoplásico (NAKAGAWA; LOPES, 2000). Já o termo câncer indica uma neoplasia maligna. Neoplasia, por sua vez, significa “crescimento novo” e define as condições de proliferação celular anormal, encontradas nos tumores benignos ou malignos (NAKAGAWA; LOPES, 2000).

Do ponto de vista clínico, a definição câncer tem sido utilizada para se referir a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento e proliferação desordenados de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se, através de um processo conhecido como metástase, para diferentes regiões do corpo (COZZI, 2003). Adicionalmente, sob o ponto de vista bioquímico, considera-se que, independentemente de sua causa, o câncer seja uma doença basicamente celular caracterizada por desvios nos mecanismos que dirigem o ciclo celular e a morte celular programada, tudo isto em decorrência de certa mudança no repertório da expressão gênica, devido a alguma mutação ocorrida em nível de DNA, que determina o aparecimento e/ou o comportamento da neoplasia (MOFFAT et al., 2000; DUESBERG; RASNICK, 2000).

1.3 A carcinogênese e suas bases moleculares

Tem sido proposto que uma célula tumoral resulta de uma célula normal que sofreu mutação, sendo esta uma mudança na estrutura primária do DNA (KINZLER; VOGELSTEIN, 2002; SOTO; SONNENSCHNEIN, 2004; MERLO et al., 2006). Acredita-se que a transformação de uma célula normal em célula tumoral é um processo que pode atravessar vários estágios ao longo de vários anos ou décadas. Os estágios da carcinogênese incluem iniciação, promoção e progressão. O primeiro envolve uma reação entre a substância promotora do câncer (carcinógeno) e o DNA das células do tecido podendo haver suscetibilidade genética. Este estágio pode permanecer latente, sendo um risco para o desenvolvimento de câncer em uma fase tardia. O segundo estágio ocorre muito lentamente por um período que compreende muitos meses ou anos. Durante este estágio, a alteração na dieta e o estilo de vida podem ter um efeito benéfico podendo prevenir a sequência da carcinogênese (REDDY et al., 2003 *apud* SIQUEIRA

JÚNIOR, 2007). Nestes estágios iniciais, as mutações carcinogênicas podem perpetuar-se.

É importante observar que o dano ao DNA *per se* não é um evento mutagênico. A replicação do DNA e subsequente divisão celular são necessárias para converter o dano em alteração que pode ser transmitida. Assim, a proliferação é um fator determinante na geração de mutações e na expansão de clones de células portadoras de alterações genômicas. Devido aos múltiplos pontos de controle que existem para limitar a proliferação inapropriada as células malignas humanas precisam acumular múltiplas mutações (em cerca de 4 – 5 genes) que permitam sua replicação autônoma e invasão (BERTRAM, 2001 *apud* SIQUEIRA JÚNIOR, 2007).

As mutações carcinogênicas podem ser geneticamente pré-determinadas ou adquiridas ao longo da vida. As mutações geneticamente pré-determinadas influenciam na capacidade de uma célula para responder aos estímulos de seu meio. Já as causas das mutações adquiridas, ditas causas externas, são várias e podem estar relacionadas ao meio ambiente (poluição, radiações ionizantes, entre outras), a agentes infecciosos, por exemplo, a virose causada por Papiloma Vírus Humano, ou outras infecções, como a infecção pelo *Helicobacter pylori*, entre outras; ao uso de medicamentos, fatores que determinam toxicidade oxidativas, os hábitos sociais ou culturais do indivíduo, por exemplo, o tabagismo, alcoolismo, a desnutrição, a excessiva exposição ao sol, etc (WOLF; RAMIREZ, 2001; AUDIC; HARTLEY, 2004; INCA, 2011).

As mutações carcinogênicas ocorrem em genes que controlam o crescimento, a divisão e a diferenciação celular; podendo ainda ocorrer sobre genes que controlam os mecanismos que dirigem uma célula para sua morte programada. Os genes potencialmente acometidos podem ser divididos em pelo menos três grupos: proto-oncogenes, oncogenes e genes supressores tumorais. Os proto-oncogenes representam uma família de genes normais que codificam as proteínas envolvidas no controle do ciclo celular normal. A mutação em proto-oncogenes pode determinar a presença e/ou ativação de oncogenes cuja expressão, ou hiperexpressão, pode predispor ao desenvolvimento de um câncer. Por fim, os genes supressores tumorais são aqueles que inibem a transformação de uma célula normal em cancerígena; sua expressão tem a ver com o controle da expressão e função de proto-oncogenes e oncogenes (DE VITA, HELMAN, ROSENBERG, 1998; WOLF; RAMIREZ, 2001).

A ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores tumorais, pode levar à superexpressão de diversas proteínas e receptores. Por exemplo, a expressão de receptores de fatores de crescimento que estimulam a atividade de tirosina-cinases em seus domínios citoplasmáticos, com frequência está aumentada em muitos tipos de câncer (RAK et al., 1995; BERTRAM, 2001; RANG et al., 2004). Outro exemplo particularmente interessante refere-se à proteína Ras, constituinte da cascata mitogênica SOS – Ras – Raf - MAPK, ilustrada mais adiante, que se encontra mutada em cerca de 30% dos tumores humanos, sendo capaz de iniciar um fluxo de sinais mitogênicos no interior das células, sem necessitar da ativação prévia de receptores sensíveis aos fatores de crescimento (MEDEMA; BOS, 1993 *apud* SIQUEIRA JUNIOR, 2007). A inativação de genes supressores tumorais, particularmente o gene p53, leva à perda do controle da parada do ciclo celular em decorrência de um dano extenso ao DNA, ocorrendo simultaneamente, a perda do estímulo para apoptose (GHOBRIAL, WITZIG, ADJEL, 2005). Muitos tipos de câncer como o de mama, pulmão, cólon retal, ovário e próstata, têm sido associados com a inibição de apoptose, especialmente relacionada com a mutação do gene p53 (EISINGER et al., 1998; GRETARSDOTTIR et al., 1998).

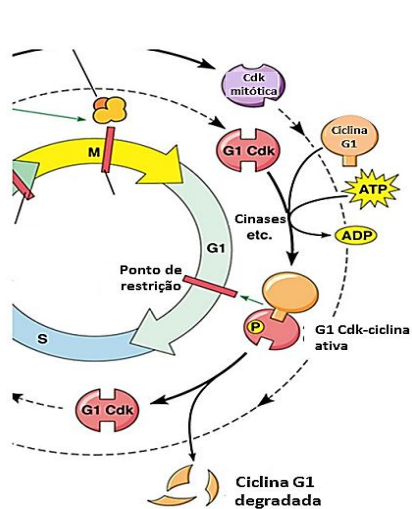
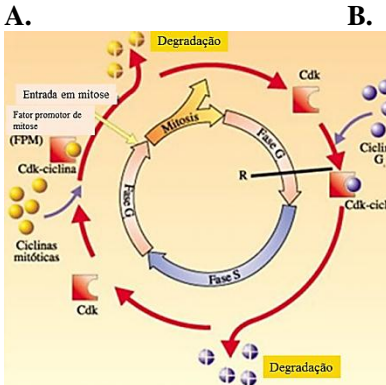
Autores como Hanahan e Weinberg (2000) sugerem que a grande diversidade de genótipos das células tumorais seja resultante da manifestação de pelo menos seis alterações essenciais na fisiologia celular que, coletivamente, orientam seu desenvolvimento maligno: 1) auto-suficiência em sinais de crescimento; 2) sensibilidade reduzida aos fatores que inibem o crescimento celular; 3) evasão de morte celular programada; 4) potencial replicativo ilimitado; 5) angiogênese sustentada; 6) invasão tecidual e metástase.

1.4 Falhas nos mecanismos reguladores do ciclo celular

O ciclo normal de divisão celular é governado majoritariamente por enzimas da família serina/treonina cinases dependentes de ciclina, as chamadas CDKs. Normalmente, a progressão do ciclo é determinada por eventos de fosforilação sequenciais através de uma cascata de holoenzimas, específicas para cada fase do ciclo, envolvendo as ciclinas e suas parceiras catalíticas, as cinases CDKs (COLLINS; GARRET, 2005) (Figura 1). As CDKs complexam-se com ciclinas distintas nas diferentes etapas do ciclo celular, formando o complexo CDK-ciclina. A ativação deste complexo dispara processos que conduzem a célula

através das distintas fases do ciclo. A degradação das ciclinas inativa o complexo (Figura 1A). Uma vez ativada, as CDKs fosforilam seus substratos. Na maioria dos casos, a fosforilação que ocorre em sítios de serina/treonina sinaliza para a progressão do ciclo celular (Figura 1B) (COLLINS; GARRET, 2005).

Figura 1 - O ciclo celular e a atividade das cinases dependentes de ciclina.



Fonte: Fisicanet®

Disponível em:

http://www.fisicanet.com.ar/biologia/informacion_genetica/ap02_ciclo_celular.php#.UNDOh-TBhrw. Acesso em: dezembro de 201

Fonte: Adaptado de Pearson Education Inc.

De acordo com vários autores, o câncer desenvolve-se em parte porque as mutações cancerígenas podem determinar a deleção dos mecanismos normais de regulação do ciclo celular (CATZAVELOS, 1997; KAMB, 2000; MOFFAT et al., 2000; SCHNERCH et al., 2012), como a atividade atípica das CDKs que pode ser acompanhada por amplificação da ciclina, mutação das CDKs ou de seus substratos, assim como a inativação de inibidores de CDKs. O resultado disso seria um estado hiperproliferativo das células cancerosas que também pode ser originado da amplificação de sinais positivos de crescimento, mutação dos mecanismos de controle e dos genes envolvidos com o reparo, assim como a falha nos mecanismos de morte celular programada (MCDONALD; EL-DEIRY, 2000). Acredita-se que o potencial pleno das terapias antitumorais, incluindo a terapia gênica, depende do conhecimento adequado desses inibidores e estimuladores moleculares (MCDONALD; EL-DEIRY, 2000).

A maquinaria molecular do ciclo celular estará comprometida na carcinogênese. Neste caso, vários reguladores do ciclo podem ser alterados e irão operar como fatores determinantes de câncer. Entre eles, estão os inibidores das CDKs, tal como a proteína P16 (SERRANO et al. 1993; KAMB, 2000). Estas proteínas supressoras de tumor são posicionadas estrategicamente para regular algumas decisões críticas do desenvolvimento celular. O gene p16 parece ser um alvo particular de mutações carcinogênicas. Os mecanismos que regulam o ciclo celular envolvem vários elementos que podem ser vistos como intermediários de vias genéticas distintas. Nesse caso, o propósito final da via não é a produção de um metabólito essencial, mas sim o controle preciso da divisão de celular (KAMB, 2000).

Vias múltiplas provavelmente estão envolvidas na prevenção da perda do controle do ciclo celular. Algumas dessas vias podem ser gerais, funcionando em muitos tecidos, enquanto outras podem ser muito mais específicas, operando em só alguns tipos de células. Várias são as vias genéticas que podem estar relacionadas com a carcinogênese, uma das vias mais importantes envolve a rede sinalizadora RAS (GTPase, p.ex.) (BOGUSKI; MCCORMICK, 1993; KAMB, 2000). Outra via importante envolve o gene supressor de tumor p53, o p21 inibidor de CDK e um de seus alvos, o complexo CDK2 - ciclina E (MCDONALD EL-DEIRY et al., 1993; DULIC et al., 1994). Uma terceira via envolve os complexos de ciclina D1 e CDK4 gerados no processo de regulação do ciclo celular (SERRANO et al., 1993). Todos os genes supressores de tumor conhecidos e também os proto-oncogenes, estão relacionados em pelo menos uma dessas vias reguladoras. Em analogia com as vias bioquímicas, a alteração de um único elemento numa via de controle do ciclo celular (como a inativação de um gene supressor de tumor ou a ativação de um oncogene) pode ser suficiente para romper a função dessa via e para torná-la um obstáculo para os processos reguladores (KAMB, 2000).

1.5 Falhas em mecanismos de morte celular

Tratando mais especificamente da questão das mutações que decorrem em potenciais falhas nos mecanismos de morte celular programada e que podem determinar o aparecimento de um câncer, segundo alguns autores, faz-se necessário entender que fisiologicamente o equilíbrio entre a sobrevivência e a morte das células está sob o estrito controle genético. Quando uma célula normal é exposta à lesão

bioquímica, biológica ou física; ou estiver privada de substâncias necessárias à sua sobrevivência, ela ativa uma série de genes de resposta ao estresse. A partir daí, em alguns casos, esta célula pode eventualmente se recuperar, mas geralmente o que ocorre é a sua morte através de um mecanismo programado. A célula morre e a vizinhança é reciclada. Neste mecanismo de controle, tem sido considerado que a apoptose deva desempenhar um papel de protagonista. No entanto, sabe-se que se o evento acomete um grande número de células, então isto sugere necrose, que é geralmente acompanhada de resposta inflamatória. A necrose é um tipo de morte celular que ocorre quando a célula é exposta a um estado de estresse extremo. Neste caso, a membrana plasmática é destruída, o conteúdo citoplasmático extravasa para o meio intercelular e em princípio, o núcleo permanece íntegro (KAM; FERCH, 2000). Apesar da necrose ser tradicionalmente tratada como um destino accidental de morte para as células, alguns estudos recentes têm demonstrado que este mecanismo pode representar um destino autodeterminado da célula, que pode ser induzido via vários estímulos, tais como estresse, ativação de canais iônicos ou lesão no DNA. Além disso, nos casos onde as vias de apoptose estão deficientes ou ausentes, como observado em alguns casos na carcinogênese, a necrose parece por vezes possibilitar uma forma alternativa de morte celular (SUN et al., 2006).

Se por um lado, as falhas nos mecanismos de morte celular podem ser a causa para um câncer, por outro, a ativação destes mecanismos é a explicação para o efeito antitumoral de muitos dos agentes utilizados para o tratamento desta doença. A apoptose tem papel central na patogênese de várias doenças humanas quando os mecanismos de controle apoptótico estão suprimidos, super ou sub expressos ou alterados por mutação (THATTE; DAHANUKAR, 1997). Em princípio, a apoptose é considerada um processo fisiológico de morte celular pelo qual uma única célula pode ser eliminada do tecido vivo. Uma vez que o processo é mediado por proteínas específicas codificadas no genoma do hospedeiro, a apoptose é considerada um processo de morte celular programada.

Fisiologicamente, a apoptose é responsável pela remodelação do tecido, durante o desenvolvimento e renovação de tecidos normais (por exemplo, células hematopoiéticas) durante todo o ciclo de vida de organismos multicelulares. Tem papel no desenvolvimento embrionário. Chega a ser considerada por alguns autores como um processo do sistema imune. As alterações morfológicas que acompanham a apoptose são caracterizadas pela condensação da cromatina e do citoplasma e

subsequente fragmentação da célula em pequenos segmentos circunscritos pela membrana chamados corpos apoptóticos. A manutenção da integridade da membrana na apoptose impede a liberação de substâncias deletérias citoplasmáticas e a ativação da resposta inflamatória. A apoptose pode ser iniciada por uma variedade de eventos resultantes quer seja do interior da célula (p53) (Figura 2 B/C), ou externamente, via ligantes de receptores de morte envolvendo receptores celulares específicos da superfície da célula-alvo (Figura 2 D). Após o reconhecimento dos estímulos e agrupamento de proteínas da membrana para um domínio de morte, algumas pró-enzimas citoplasmáticas são convertidas para a sua forma ativa (caspases) (SERPI, 2003; PAI et al., 2006; AMARAL, 2010).

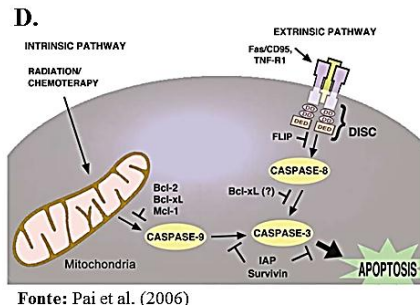
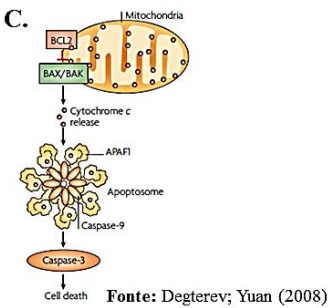
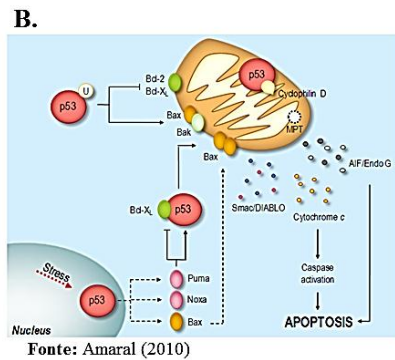
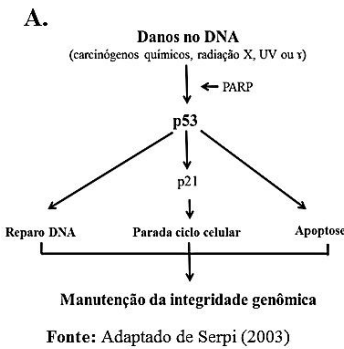
As caspases compõem o mecanismo de morte efetor da apoptose e, depois de ativado, conduz a célula em uma fase de degradação irreversível comum de desorganização do citoesqueleto. Existem diferentes tipos de caspases como, por exemplo, as caspases iniciadoras e caspases efetoras. Caspases iniciadoras (caspase-8 e caspase-9) clivam pró-formas inativas de caspases efetoras, ativando-as; caspases efetoras (caspase-3 e caspase-7), por sua vez, clivam outros substratos proteicos da célula resultando no processo apoptótico. A iniciação da reação em cascata é regulada por inibidores de caspases (DEGTEREV; YUAN, 2008).

O segundo estágio da morte por apoptose (fase de execução) é quando ocorrem as mudanças morfológicas celulares características. Os principais processos ocorridos nesta fase são proteólise e inativação mitocondrial. A desestruturação celular resulta da ativação da família de cisteína-proteases, as caspases. As caspases são, em princípio, zimógenos que têm sido conservados dos nematoides aos homens. Cerca de quatorze caspases humanas já foram descritas (WYLLIE, 1997; SAVITZ et al., 1998). Proteínas de sobrevivência (da família Bcl-2) controlam o mecanismo de destruição dirigido pelas caspases (MAŚLIŃSKA, 2003).

O processo de apoptose deficiente participa na patogênese de várias doenças, como neoplasias, inflamações crônicas ou doenças autoimunes e outras condições (ELMORE, 2007). Os agentes antitumorais ideais deveriam induzir os tumores à apoptose (KERR et al., 1994). Kam e Ferch (2000) explicam que tais agentes podem gerar um estímulo determinado a partir do qual uma célula pode entrar em processo de apoptose. Admite-se que este mecanismo de morte ocorra em dois estágios basicamente. O primeiro estágio (de decisão) é controlado geneticamente por dois importantes genes, Bcl-2 e p53. O

Bcl-2 é uma família de genes que regula negativamente a apoptose na membrana mitocondrial e no retículo endoplasmático (Figura 2 B), podendo atuar pelo controle sobre canais de cálcio (TSUJIMOTO ET al., 1985; CLEARY et al., 1986; VAUX et al., 1992; BROWN, 1996; VAUX, 2011). Atualmente, é reconhecida a existência de uma família de proteínas nos mamíferos semelhante à Bcl-2 que promove ou inibe a apoptose (HOCKENBERY et al., 1993; YANG et al., 1997; AL-HARBI et al., 2011). As proteínas, tais como Bcl-2 e Bcl-xL, previnem a apoptose, ao passo que proteínas Bcl-2 associadas a proteínas x, tais como Bax, Bak e Bcl-xS, PUMA e NOXA promovem a apoptose (HAUNSTETTER; IZUMO, 1998; SAVITZ et al., 1998).

Figura 2 - Atividade do p53 (A). As vias de apoptose mediadas pelo p53 mitocondrial e citosólica (B). A liberação do citocromo-c e ativação das caspases por via intrínseca mitocondrial (C). A ativação da apoptose por via extrínseca pelo receptor de morte FAS (D).



A P53 é uma fosfoproteína nuclear de 53 kDa, que se liga ao DNA para atuar como um fator de transcrição e está implicada no controle da proliferação celular e no reparo do DNA (Figura 2 A). Esta

proteína é considerada guardião do genoma (MIYASHITA; REED, 1995). Mutações do gene p53 foram encontradas em pelo menos 50% dos carcinomas humanos e também são associadas com a resistência à quimioterapia (DONEHOWER et al., 1992).

A figura 2 (A) ilustra resumidamente o papel antitumoral de p53. Frente ao estresse e ao dano no DNA, o p53 pode: a) ativar proteínas de reparo do DNA; b) induzir a parada do crescimento bloqueando o ciclo celular no ponto de regulação G1/S pelo reconhecimento de dano sobre o DNA (se o bloqueio for mantido por tempo suficiente, as proteínas de reparo do DNA terão tempo para consertar o dano e a célula será capaz de continuar seu ciclo; c) iniciar apoptose, se o dano no DNA provar ser irreparável (AMARAL, 2010).

A proteína P53 ativada liga-se ao DNA e ativa a expressão de vários genes, inclusive o gene que codifica para a proteína P21, além de uma centena de outros genes. A proteína P21 liga-se aos complexos G1-S/CDK (CDK2) e S/CDK, que são moléculas importantes para a transição G1/S no ciclo celular, inibindo a atividade delas (NCBI, 2008; MRAZ et al., 2009). Quando P21 está complexada com CDK2, a célula não pode continuar o próximo estágio da divisão celular. No caso de alguns tipos de câncer, uma P53 mutante não pode ligar-se ao DNA de forma efetiva e, como consequência, a proteína P21 não estará disponível para agir como sinal de parada para a divisão celular (NCBI, 2008).

Ainda na figura 2 (B), estão ilustradas as vias de apoptose mediadas por p53. Na via de apoptose citosólica, p53 nuclear induz a expressão de PUMA, que por sua vez libera P53 citosólico inativado através de uma ligação a Bcl-XL. Então, P53 induz a oligomerização de Bax no citosol e sua translocação mitocondrial. O acúmulo de P53 no citoplasma, como uma consequência do transporte intracelular normal ou monoubiquitinação estável é a principal fonte de P53 mitocondrial. Já na via mitocondrial, P53 induz a oligomerização de Bax e Bak, antagoniza o efeito de Bcl-2 e Bcl-XL antiapoptóticas, além de formar um complexo com a ciclofilina D na membrana mitocondrial interna. Estas alterações resultam na ruptura das membranas mitocondriais e posterior liberação de ambos os fatores solúveis e insolúveis apoptogênicos. Como ilustrado na figura 2 (C), o citocromo c que fisiologicamente atua na transferência de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, uma vez liberado no citoplasma de células em apoptose fica disponível para se ligar a Apaf-1 que se liga a caspase 9, assim formando um complexo chamado apoptossoma. Por esta

ligação, a presença de citocromo c no citosol é suficiente para causar a morte celular dependente de caspase (VAUX, 2011).

Na figura 2 (D), está ilustrada a via de ativação extrínseca da apoptose, outra além da mitocondrial. Nesta, o receptor FAS que é um receptor de morte na superfície das células dispara a apoptose (WAJANT, 2002). O receptor FAS (FasR) é uma proteína que, em humanos é codificada pelo gene TNFRSF6. FAS forma o complexo sinalizador de indução de morte (DISC) a partir de um sinal de um ligante. A partir do ligante, FAS trimeriza e seu domínio de morte DD é ativado. Na sequência, o complexo receptor é internalizado através da maquinaria celular endossomal. Isto permite que FADD, uma molécula adaptadora ligue-se ao domínio de morte de FAS através do seu domínio de morte (HUANG et al. 1996). FADD também contém um domínio de morte efetor (DED) próximo do seu terminal amino, que facilita a ligação de DED à caspase-8 (EBERSTADT et al. 1998). A caspase 8 pode então ativar-se automaticamente através de clivagem proteolítica nas subunidades p10 e p18, cada uma das duas formam a enzima heterotetrâmera ativa. A caspase-8 ativa é liberada a partir do disco para o citosol, onde cliva outras caspases efetoras, levando à degradação do DNA, *blebbing* de membrana, e outras marcas da apoptose.

Ainda referente à figura 2 (A), está demonstrado que a enzima poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) possui alguma relação na morte celular mediada por p53. Fisiologicamente, a PARP desempenha um papel no reconhecimento do dano e reparo do DNA. Um dos primeiros eventos que ocorre após a ruptura da fita de DNA é o aumento da síntese de poli (ADP - ribose) feito pela PARP. Este evento é seguido por poli (ADP) ribosilação de proteínas localizadas na vizinhança das fitas do DNA. A PARP detecta a ruptura no DNA e catalisa a ligação de unidades de ADP-ribose a partir de NAD^+ , causando inclusive consumo de ATP. Sabe-se que danos sustentados em nível de DNA e consequente hiperatividade da PARP estão relacionados ao início da necrose. Por outro lado a PARP possui uma sequência DEVD que pode ser reconhecida e clivada pelas caspases, rendendo apoptose. A clivagem da PARP pelas caspases é uma marca da apoptose (HERCEG; WANG, 1999). A PARP é conhecida por estar envolvida na regulação do p53, no entanto como ocorre este relacionamento ainda não está claro. Existem estudos que mostram que a PARP regula positivamente o p53 (TONG et al., 2001).

Além da necrose e apoptose, outro mecanismo tem sido reconhecido como um processo celular relacionado à patogénia do câncer. Este processo inclusive, tem se tornado uma importante área de

pesquisa, a autofagia ou “autodigestão”. Trata-se de um processo complexo geneticamente programado e evolutivamente conservado através do qual, proteínas e organelas envelhecidas ou disfuncionais são degradadas (SHINTANI; KLIONSKY, 2004). O processo de macroautofagia, por exemplo, envolve a formação de uma vesícula de membrana dupla, que encapsula citoplasma e organelas e então se funde com lisossomos, degradando assim o conteúdo vesicular (YORIMITSU; KLIONSKY, 2005). A autofagia parece ter duplo papel no que diz respeito ao câncer, ambos ocorrendo em estágios diferentes da doença, o que é motivo de intenso debate entre os pesquisadores. Autores como Tan et al. (2009) concluíram que: 1) a supressão da autofagia pode contribuir para o rápido crescimento inicial dos tumores; 2) contudo, nos estágios mais avançados, a autofagia pode ter papel pró-tumoral, servindo para providenciar nutrientes essenciais para as células mais internas dos tumores sólidos que não tem acesso direto a circulação sanguínea; por último, os autores destacam que possivelmente a indução da autofagia nos estágios iniciais e/ou a sua inibição nas fases mais avançadas do desenvolvimento do câncer pode sensibilizar as células aos agentes antitumorais.

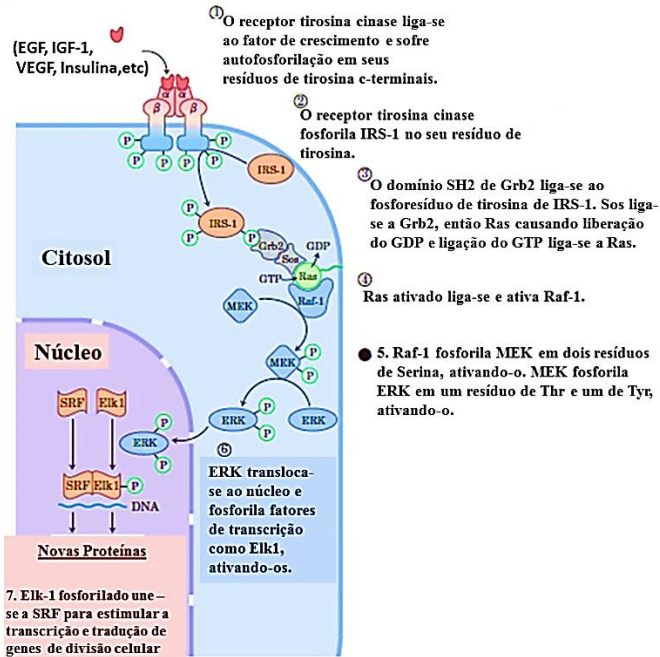
1.6 Vias de sinalização celular operam de forma autossuficiente no câncer

Como já explicado, os tumores são o resultado de divisão celular descontrolada. Normalmente, a divisão celular é regulada por uma família de fatores de crescimento extracelular que, geralmente, são proteínas que fazem células em quiescência entrar no processo de divisão celular. As mutações carcinogênicas podem ocorrer em genes que codificam proteínas mediadoras de síntese, regulação ou reconhecimento dos fatores de crescimento, o que pode levar ao câncer (MOFFAT et al., 2000; DUESBERG; RASNICK, 2000; LEHNINGER; NELSON; COX, 2008). Pelo menos duas dessas vias de sinalização, que podem estar hiperativas devido a mutações em alguns casos de câncer, valem a pena ser mencionadas:

a) A via ou cascata das cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Mitógenos são sinais para divisão e proliferação celular. Exemplos: o fator de crescimento epidermal (EGF), fatores de crescimento semelhantes à insulina (p.ex. IGF-1) ou o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), entre outros. A dinâmica normal de ativação desta

via e seu resultado (crescimento e proliferação) estão ilustrados esquematicamente na figura 3.

Figura 3 - A via de sinalização celular das cinases ativadas por mitógeno (MAPKs).



Fonte: Adaptado de Lehninger; Nelson; Cox (2008).

Inicialmente, sua ativação depende de uma interação entre um ligante (fator de crescimento) com um receptor do tipo tirosina-cinase. Esta interação leva o receptor a uma autofosforilação que abre o sítio ativo, de modo que a enzima pode fosforilar resíduos de Tyr de outras proteínas-alvo. Como ilustrado na figura 3, uma dessas proteínas-alvo é o substrato do receptor de insulina IRS-1. Uma vez, fosforilado, IRS-1 torna-se um ponto de nucleação para um complexo de proteínas (passo3, Figura 3) que carrega a mensagem oriunda do receptor até alvos finais, no citosol e núcleo, através de uma longa série de proteínas intermediárias. Primeiro o resíduo de fosfotirosina em IRS-1 liga-se ao domínio SH2 da proteína Grb2 (SH2 é uma abreviatura para homologia 2 Src; a sequência do domínio SH2 é semelhante em outras proteínas tirosina-cinase). Uma gama de proteínas sinalizadoras contém domínios

SH2, todas podem ligar-se em resíduos de fosfotirosina em proteínas associadas. Grb2 também contém um segundo domínio ligante para proteínas, SH3, que se liga a regiões ricas em resíduos de Pro. Grb2 liga-se ao resíduo rico em Pro de Sos, recrutando Sos em um crescente complexo (veja passo 3, Figura 3).

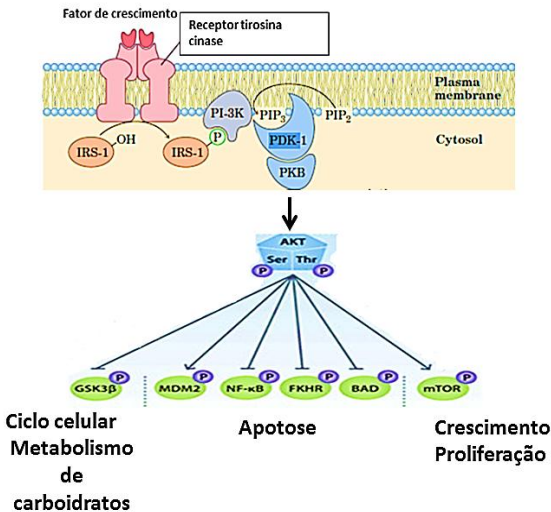
Quando ligado ao Grb2, Sos catalisa a substituição da ligação de GDP por GTP em Ras, que é uma proteína da família de proteínas ligantes de nucleotídeos de guanosina (proteína G) que intermedeia uma gama de sinais de transdução. Quando o GTP é ligado, Ras pode ativar uma proteína cinase Raf-1 (passo 4). Raf-1 é a primeira de uma série de três proteínas cinases da família das MPKs – Raf-1, MEK e ERK. Estas formam uma cascata, na qual cada cinase ativa a próxima por fosforilação (passo 5). A proteína cinase ERK é ativada por fosforilação em dois resíduos, um de Thr e outro de Tyr. Quando ativada, ela intermedeia alguns dos efeitos biológicos de fatores de crescimento semelhantes à insulina, pois ela entra no núcleo e fosforila proteínas como Elk-1, que ativada modula a transcrição de cerca de 100 genes regulados por este fator (passo 6) (MEDEMA; BOS, 1993; LEHNINGER; NELSON; COX, 2008). O que é realmente interessante, no contexto desta tese, é que como já explicado anteriormente, esta via encontra-se mutada em cerca de 25% dos tumores humanos, neste caso sendo capaz de iniciar um fluxo de sinais mitogênicos no interior das células, sem necessitar da ativação prévia de receptores sensíveis aos fatores de crescimento (MEDEMA; BOS, 1993; LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

b) A via de sinalização da fosfoinositol 3 cinase (PI3K)/ Akt/ mTOR ou simplesmente via da Akt (Figura 4).

Da mesma maneira que ocorre na ativação da via das MAPKs, a via da Akt também é ativada a partir da interação de algum fator de crescimento com um receptor do tipo tirosina-cinase. O que ocorre é que na sequência desta via, o IRS-1, alternativamente liga-se a fosfatidilinositol 3 cinase (PI-3K) (Figura 4) que converte fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato (PIP2) na membrana em fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3). A partir daí, a proteína cinase PDK-1, que é ativada quando se liga ao PIP3, ativa uma segunda proteína, a proteína cinase efetora PK, também conhecida como Akt. Os alvos da Akt são demonstrados na figura 4. A Akt tem papel central na regulação geral da função celular. Ela pode fosforilar e inibir a cinase 3 beta da glicogênio sintase (GSK-3 β) e assim interferir no ciclo celular e metabolismo dos carboidratos. Pode ainda fosforilar e inibir mediadores de apoptose

como Bad e NF- κ B (LEHNINGER, NELSON; COX, 2008). Assim, como pode fosforilar e ativar a proteína mTOR que intermedeia sinais de crescimento e proliferação (Figura 4). Da mesma maneira que a autossuficiência da via das MAPKs tem relação com o câncer, a da via da Akt também. Para se ter uma ideia, alguns agentes antitumorais de sucesso, como a Rapamicina, tem seu efeito explicado por um mecanismo de inibição da ativação de intermediários desta via. A Rapamicina inibe a fosforilação de mTOR. Assim, muitos pesquisadores têm investido esforços na identificação de inibidores da via da Akt. Pesquisadores da indústria farmacêutica Abbot já relataram o desenvolvimento de uma série inovadora de análogos de piridina que podem ligar-se ao sítio ligante de ATP da Akt e inativá-la. Eles pretendem testar estes compostos no tratamento de alguns casos de câncer (LINDSLEY et al., 2008).

Figura 4 - A via de sinalização celular PI3K/Akt/mTOR.



Fonte: Adaptado de Lehninger; Nelson; Cox (2008).

1.7 Estresse oxidativo: carcinogênese e tratamento do câncer

A participação do oxigênio no metabolismo dos organismos aeróbios determina a geração normal de espécies reativas de oxigênio. EROs é a sigla utilizada para se referir às espécies reativas de oxigênio. Sabe-se que em concentrações fisiológicas, as EROs desempenham

vários papéis importantes, entre eles, a participação na sinalização celular, na atividade do sistema imunológico, etc (SIES, 1993). Contudo, quando há uma produção excessiva dessas espécies e/ou uma diminuição das defesas antioxidantes, o organismo pode estar submetido a um processo denominado de estresse oxidativo. Acredita-se que a origem de muitas situações patológicas está relacionada a um estresse oxidativo, sendo que as espécies oxidativas podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento do dano tecidual pelo ataque a biomoléculas como carboidratos, lipídios, proteínas e os ácidos nucléicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Estes são alguns dos motivos para o crescente interesse sobre EROs, desde o início da década de oitenta. Os níveis elevados de EROs no organismo parecem ser um dos maiores responsáveis pelo processo de envelhecimento (HARMAN, 1992). O ataque oxidativo sobre o DNA pode estar intimamente relacionado às mutações carcinogênicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Por outro lado, no caso das células cancerosas, alguns estudos têm demonstrado que elas apresentam defesas antioxidantes alteradas e altos níveis basais de EROs. Mais recentemente, este fato tem sido considerado uma vulnerabilidade a ser explorada no tratamento do câncer pelo uso de agentes moduladores do estado redox das células. Estes agentes tiram vantagem desta particularidade bioquímica e assim atacam mais seletivamente as células tumorais. As células normais mantêm sua homeostase redox com baixos níveis basais de EROs porque elas têm controle estrito do balanço entre geração e eliminação de EROs. Como consequência, as células normais podem tolerar certo nível de EROs exógenos, algo que as células cancerosas fazem com muito menos eficiência (TRACHOOTHAM et al, 2006; VERRAX et al., 2011). Neste sentido, pelo menos duas abordagens vêm sido testadas: a) o uso de agentes exógenos geradores de EROs e b) o uso de compostos que inibem o sistema antioxidante (VERRAX et al., 2011).

1.8 Estresse oxidativo pode causar estresse de retículo endoplasmático

A toxicidade oxidativa também está envolvida no ataque a células vulneráveis que são induzidas à morte por um complexo mecanismo que envolve estresse do retículo endoplasmático. O estresse de retículo endoplasmático, em princípio, é uma resposta adaptativa essencial ao acúmulo de proteínas celulares mal conformadas. Ele é

induzido por um sistema celular de “controle de qualidade” que garante o trânsito correto de proteínas ao complexo de Golgi (ZHANG; KAUFMAN, 2006). O papel principal do estresse de retículo endoplasmático é favorecer a sobrevivência das células por meio do aumento da capacidade para dobrar proteínas ou, facilitando a exportação de proteínas mal dobradas para o citosol onde deve ocorrer sua degradação (degradação associada ao estresse de retículo) (ZHANG; KAUFMAN, 2006). Mas, este fenômeno requer um complexo processo regulatório, conhecido por resposta a proteínas mal dobradas que regula a transcrição e a tradução de um grande número de genes (SHRODER, KAUFMAN, 2005). A depender do contexto, este processo pode finalmente induzir à morte celular, provavelmente quando a resposta inicial de sobrevivência não pode compensar as modificações sobre as proteínas sujeitas a um estímulo lesivo (ZHANG; KAUFMAN, 2006).

1.9 Invasão e metástase

O tumor primário é uma massa tecidual que aparece no local onde ocorre a transformação da célula normal em célula tumoral. Se as células tumorais permanecessem localizadas, o câncer não teria grande relevância clínica. Entretanto, as células tumorais nem sempre permanecem na massa tumoral primária, podendo ser deslocadas por: 1) invasão, ou o movimento de células para o interior do espaço ocupado por tecidos vizinhos; 2) por metástase, onde há a formação de tumores secundários em outros órgãos localizados em pontos distantes do tumor primário (OPPENHEIMER, 2006 *apud* SIQUEIRA JUNIOR, 2007).

Invasão, em seu conceito mais simples, é a expansão de células tumorais para o interior do tecido circundante, como resultado de divisão celular contínua, podendo ocorrer ainda um movimento celular ativo. As células nos tumores possuem fraca adesão entre si, o que facilita seu deslocamento e locomoção. Este tipo de movimento não ocorre no tecido normal (MAZZOCCA et al., 2005; WILSON et al., 2005). As células normais, de fato, movimentam-se quando em cultura e no curso do desenvolvimento embriológico, normalmente quando tocam umas às outras, usualmente interrompem seu crescimento e movimento. Entretanto, as células tumorais, pelo menos em cultura, não são controladas pelo contato e, no corpo continuam a crescer e se mover para o interior dos tecidos circundantes. Além disso, muitas células tumorais liberam proteases, que as auxiliam rompendo tecidos

circundantes e assim, facilitando a invasão (MAZZOCCA et al., 2005; WILSON et al., 2005).

A metástase é a propagação de células tumorais para áreas não adjacentes ao câncer primário. A disseminação pode ocorrer por invasão de vasos sanguíneos ou linfáticos, por penetração das células tumorais no interior da cavidade corpórea ou espaços que circundam os órgãos. A célula tumoral perde sua aderência junto ao tumor primário e pode invadir inicialmente os vasos sanguíneos e/ou linfáticos. Para tanto, a célula tumoral infiltra-se na membrana basal que circunda os vasos. A membrana basal e o tecido conectivo extracelular contêm estruturas que podem ser desestabilizadas por enzimas degradativas essenciais para a invasão e posterior metastização, cujos alvos principais são as moléculas de colágeno. A célula cancerosa pode invadir os vasos linfáticos diretamente, ou os vasos sanguíneos. Podem ainda passar dos canais venosos para os linfáticos, e vice-versa, indicando a existência de uma rede venolinfática. Os linfonodos regionais podem servir inicialmente de barreiras à disseminação da doença metastática, mas em alguns casos também podem disseminá-la (FIDLER, 2002 *apud* SIQUEIRA JUNIOR, 2007).

A maioria das células tumorais que entra na circulação é rapidamente eliminada, portanto, quanto maior for o agregado celular, maior a chance de sobreviver na corrente sanguínea. A disseminação hematogênica ocorre quando o tumor penetra na circulação sanguínea, podendo haver aprisionamento e adesão dos êmbolos tumorais em órgãos distantes. Então, o tumor invade a parede do vaso com extravasamento para o tecido adjacente e inicia sua multiplicação (FIDLER, 2002; OPPENHEIMER, 2006). Alterações nos componentes moleculares, tais como: depósito de fibrina, agregação plaquetária e adesão ao redor do tumor, podem proteger as células em uma trama mecânica, auxiliando a sua captura nos leitos vasculares, protegendo o tumor da resposta imunológica do hospedeiro. A alteração da coagulação também é relatada em pacientes com câncer, tais como o aumento dos níveis de tromboplastina, o pró-coagulante A, responsável pelo fator X da coagulação, e a presença de fosfatidilserina na membrana celular (FIDLER, 2002; OPPENHEIMER, 2006). Os fatores que, dentro do vaso sanguíneo, contribuem para a morte das células tumorais que entram na circulação são: o fluxo sanguíneo turbulento, os macrófagos, as células *natural killers*, plaquetas e óxido nítrico (FIDLER, 2002; OPPENHEIMER, 2006). Após a agregação da célula tumoral no leito capilar, há a retração do endotélio, permitindo sua passagem para o tecido extracelular. O passo seguinte é o crescimento

da célula tumoral. A sua inibição ou crescimento dentro do hospedeiro irão depender de fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos, além do sítio específico das metástases (FIDLER, 2002; OPPENHEIMER, 2006 *apud* SIQUEIRA JUNIOR, 2007).

1.10 Tratamento do câncer

Em princípio, as três abordagens principais possíveis para o tratamento de câncer são: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Elas podem ser aplicadas isoladamente e/ou em associação. Estima-se que cerca de 1/3 dos casos possam ser resolvidos por medidas localizadas, feitas por cirurgia e/ou radioterapia. Contudo, a maioria dos casos caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, o que evidencia a necessidade de uma abordagem terapêutica sistêmica, que é realizada pela quimioterapia (ENGERS; GABBERT, 2000).

A quimioterapia convencional do câncer, no geral, tem efeito citotóxico, ou seja, pode matar células. O sucesso no tratamento dos tumores por meio destes fármacos depende de uma maior sensibilidade das células cancerosas, comparativamente às células normais. As células cancerosas em proliferação descontrolada são, em geral, menos diferenciadas e mais susceptíveis à citotoxicidade dos quimioterápicos do que as células quiescentes. Entretanto, as diferenças de sensibilidade entre células neoplásicas em comparação às normais são, às vezes, pequenas, e a toxicidade é um problema comum da quimioterapia (RUSTIGI; PODOLSKY, 1996; AJITH; JANARDHANAN, 2002). Outros fármacos também vêm sendo desenvolvidos, os quais podem, por exemplo, bloquear a invasão, angiogênese, ou intermediários de vias de sinalização celular. Muitos destes fármacos possuem um efeito muito mais citostático do que citotóxico. Tem se considerado que o desenvolvimento e a aplicação de terapias citostáticas para o câncer podem constituir um paradigma de tradução clínica que deverá complementar as terapias citotóxicas convencionais (KOHN; LIOTTA, 1995).

Os progressos da bioquímica e da biologia molecular trouxeram esclarecimentos sobre a patogenia do câncer em nível molecular, o que acabou rendendo novas perspectivas de sucesso para abordagens terapêuticas alternativas. Entretanto, como o câncer é uma família de doenças, cada tipo de câncer tem sua evolução clínica característica, e, conseqüentemente, terapia diferenciada (GORCZYCA et al., 1999).

Novos desenvolvimentos no tratamento do câncer estão sendo baseados no perfil genético dos tumores e imunoterapia, por exemplo. A abordagem baseada no perfil genético de um tumor tem sido utilizada tanto para prever o prognóstico do paciente, como também para a definição de um tratamento mais apropriado, tendo em vista, por exemplo, o emprego de anticorpos ou imunotoxinas no tratamento. A imunoterapia do câncer baseia-se no uso do sistema imune (anticorpos) para rejeitar ou destruir o tumor. Isto pode ser alcançado através de imunização do paciente, por exemplo, através da administração de uma vacina contra o câncer, neste caso o próprio sistema imunológico do paciente é treinado para reconhecer células tumorais como alvos para serem destruídos. A imunoterapia envolve células imunológicas, tais como as células *natural killers*, os linfócitos T citotóxicos, as células dendríticas, entre outras, que são ativadas *in vivo* quer através da administração de certas citocinas, tais como interleucinas ou são isoladas, enriquecidas e transfundidas para o paciente que luta contra um câncer. O sipuleucel-T é a primeira imunoterapia terapêutica celular a demonstrar eficácia em ensaios clínicos de Fase III por prolongar a vida de pacientes com câncer de próstata hormônio refratário (PEPPERCORN et al., 2012).

A imunoterapia do câncer pode ainda ser feita através da administração terapêutica de anticorpos ou imunotoxinas como medicamentos para destruir células tumorais. Um exemplo que pode ser citado é o caso dos anticorpos Trastuzumab, Pertuzumab e T-DM1 e da imunotoxina HER2-afitoxina, atualmente aprovados para o tratamento de câncer de mama HER2+. Estes agentes atacam o receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2) em tumores de mama HER2 positivos (NAHTA, 2012).

Ainda, outro caso a ser mencionado está relacionado à importância do perfil genético dos tumores. Para exemplificar, recentemente foi relatado por pesquisadores, como Patel et al. (2012), no *The New England Journal of Medicine*, que já foram identificadas anormalidades genéticas detectadas como marcadores em pacientes com leucemia aguda mielogênica que podem ser utilizadas para prever mais precisamente o prognóstico de pacientes e selecionar o melhor tratamento disponível para eles. Os autores afirmam que o perfil genético torna possível categorizar melhor os pacientes e identificar quais são mais propensos à recidiva. Também afirmam que é possível selecionar o tratamento de forma mais inteligente. O perfil genético ajuda muito a saber qual subgrupo de pacientes vão realmente se

beneficiar de terapias intensivas, tais como uma maior dose de quimioterapia ou transplante de medula óssea (PATEL et al., 2012).

Infelizmente, mesmo nos dias de hoje, o câncer ainda representa um problema de saúde bastante grave visto, sobretudo sua incidência, mortalidade e limitações no seu tratamento. O fato é que embora já existam fármacos consagrados para o tratamento do câncer, para todos os grupos de agentes antitumorais, há uma alta incidência de efeitos adversos associados à elevada toxicidade e, os fármacos disponíveis muitas vezes não são capazes de fazer regredir completamente os sintomas da doença, falhando em eficácia. Além disto, o desenvolvimento de resistência à quimioterapia (MDR = *multidrug resistance* ou resistência multifármaco) é muito frequente, obrigando o clínico a optar por terapias de associação de dois ou mais fármacos (JENDIROBA, 2002).

Assim devido a estes motivos, quando se considera o câncer, as pesquisas por novas substâncias ativas que possam substituir as disponíveis com vantagens relacionadas à eficácia e à segurança são ainda consideradas fundamentais. Portanto, as informações apresentadas até aqui são suficientes para justificar o desenvolvimento contínuo dos estudos que visam à descoberta de novos fármacos antitumorais.

1.11 Pesquisas de novos fármacos antitumorais

Por conta dos altos custos e da necessidade contínua de ensaios mais volumosos sob a forma de *screenings* para a descoberta de novos fármacos para o combate do câncer, as pesquisas realizadas nos centros mais modernos de estudos da doença evoluíram para uma configuração que conta com basicamente dois estágios. A abordagem tomada, como por exemplo, pelo Instituto Nacional do Câncer Americano ou *National Cancer Institute* (NCI), evoluiu de um *screening* altamente empírico composto-orientado baseado em dados coletados em animais para um *screening* realizado sobre um painel de linhagens celulares humanas cultivadas *in vitro*. A vantagem desta nova abordagem, além de ser orientada pela doença e de sua adaptabilidade aos *screenings* mais volumosos, é sua flexibilidade, o que diz respeito principalmente aos extratos de produtos naturais. Enquanto os modelos animais requerem uma quantidade relativamente grande de compostos relativamente puros para o *screening*, o painel *in vitro* pode, na verdade, ser usado para dirigir a purificação dos compostos ativos a partir de pequenas quantidades de compostos ou extratos de produtos naturais (KHLEIF;

CURT, 2000). No primeiro estágio, os agentes chegam a ser testados contra um painel de aproximadamente 60 linhagens celulares, representando os tumores mais comuns dos humanos adultos, incluindo câncer de pulmão, mama, cólon, rins, ovários, entre outros (BOYD et al., 1989). Os tumores resistentes aos fármacos quimioterápicos convencionais são estrategicamente incluídos neste *screening*. No segundo estágio, normalmente os tumores considerados mais sensíveis são testados contra o mesmo fármaco em camundongos nus com deficiências imunológicas. A atividade detectada nestes sistemas xenográficos humano-camundongos, em si, normalmente é suficiente para gerar definições importantes acerca do desenvolvimento pré-clínico mais avançado, incluindo os ensaios de toxicologia e formulação, estas que são as etapas normalmente mais onerosas do desenvolvimento de um fármaco antitumoral (KHLEIF; CURT, 2000).

Os modelos animais, no entanto, continuam a desempenhar um papel crítico no desenvolvimento dos fármacos antitumorais. A atividade pré-clínica de um agente antitumoral, sendo detectada em um sistema *in vivo* relevante, é condição fundamental para justificar os ensaios clínicos. Como o desenvolvimento de agentes antitumorais torna-se progressivamente voltado aos agentes que modificam respostas biológicas, diferenciam tumores, e inibem a metástase e invasão, os modelos animais irão ainda tornar-se mais importantes futuramente. Imunoestimulantes e inibidores de metástase podem ser estudados numa fase pré-clínica somente a partir de modelos de sistemas animais apropriados (KHLEIF; CURT, 2000).

Os fármacos utilizados na medicina moderna são obtidos de muitas fontes, podendo ter origem sintética ou natural; sendo que a fonte natural pressupõe origem a partir das plantas, fungos, microrganismos, animais ou minerais (VIEGAS Jr.; BOLZANI, 2006). Entretanto, a maioria dos medicamentos utilizados hoje em dia tem origem sintética (cerca de 80%), mesmo que em princípio possam ter sido identificados e/ou derivados de produtos naturais. Os demais fármacos correspondem àqueles de origem natural ou semissintética. A síntese de fármacos é um importante capítulo da química orgânica, uma vez que permite a construção de moléculas, em seus diversos níveis de complexidade. Esse desdobramento da síntese orgânica pode apresentar vantagens particulares, pois além de racionalizar uma vasta sequência de etapas sintéticas visando obter os melhores rendimentos, é possível também dispensar atenção ao grau de pureza e à escala da reação (MENEGATTI et al., 2001).

Por outro lado, a terapêutica moderna composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais, notadamente das plantas superiores. Segundo vários autores, é possível estimar que até um terço do total dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir dos produtos naturais. No caso dos antitumorais e dos antibióticos, por exemplo, esse percentual atinge cerca de 70% (CRAGG; NEWMAN, 1999; YUNES; CALIXTO, 2001). A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas e o reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura científica. A variedade e a complexidade das macromoléculas que constituem os metabólitos secundários das plantas e organismos marinhos ainda são inalcançáveis por métodos laboratoriais. Isto seria a consequência direta de milhões de anos de evolução, atingindo um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Apesar das plantas serem consideradas uma das principais fontes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOEJARTO, 1996). É importante notar que o Brasil possui a maior biodiversidade vegetal do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta (CRAGG; NEWMAN, 1999 apud CALIXTO, 2003). Muitas estratégias podem ser consideradas para a investigação das atividades biológicas das plantas medicinais. Entre elas, a abordagem etnofarmacológica que consiste em combinar informações adquiridas junto a comunidades locais, ou pessoas experientes, que fazem uso da flora medicinal com estudos químico-farmacológicos realizados em laboratórios especializados. São procedimentos que vão desde a coleta e análise de dados etnofarmacológicos à elucidação das estruturas das substâncias ativas isoladas e/ou obtenção de derivados (ELISABETSKY, 1987).

Foi primeiramente através da identificação de relatos populares que indicavam para a utilidade antitumoral de *Bidens pilosa* que selecionamos esta espécie para avaliação em nível laboratorial. Em 2008, nosso grupo de pesquisa publicou o primeiro artigo sobre o efeito antitumoral *in vivo* desta espécie vegetal, principalmente da fração clorofórmica obtida do extrato bruto hidroetanólico.

1.12 *Bidens pilosa* Linné

Bidens pilosa L. é uma espécie de planta de pequeno porte, de vasta ocorrência natural, sendo nativa das áreas tropicais na América do Sul, África, Caribe e Filipinas (CORRÊA, 1984). É uma espécie da família das Asteráceas com variada denominação popular dependendo da localidade onde é encontrada. No Brasil, é mais conhecida como Picão-preto ou Erva-picão (CORRÊA, 1984). No exterior, é conhecida como *Aceitilla*, *Seta* e *Té de Milpa*, no México; *Amores Secos*, *Cadillo Rocero* e *Puinca*, na Venezuela; *Arponcito*, *Cadillo* e *Sirvulaca*, no Panamá; *Margarita* e *Romerillo*, em Porto Rico; *Marumaruke*, na Índia holandesa, *Motsiji*, no Transwaal; *Mozote*, em Costa Rica; *Mozotillo*, em outros países da América Central; *Purikel*, nas Filipinas, *Saetilla*, na Argentina; *Stepherd's needle*, dos norte-americanos; *Spanish needle*, nas Antilhas Inglesas; *Tangamagnia*, no Congo (CORRÊA, 1984).

É uma planta anual, de caule ereto e quadrangular, que pode atingir até 150 cm de altura (Figura 5). É ramosa com ramos opostos, glabra, com folhas opostas, verdes brilhantes e às vezes alternadas, na porção superior são pecioladas, até 10 cm de comprimento, membranosas, simples ou decompostas, com segmentos ovalados até lanceolados, agudos ou acuminados, serrados. Os capítulos são poucos, pedunculados, reunidos em corimbos de 30-40 flores amareladas ou brancacentas, aromáticas; involúcro campanulado, escamas exteriores em geral foliáceas, quase sempre as interiores mais curtas, membranosas, brancacentas e ciliadas nas margens; poucas língulas, brancas, frequentemente maiores que o involúcro, 2-3 lobadas; fruto aquênio anguloso, estreito, preto, de 18-24 mm de comprimento, com 2-4 arestas amarelas, recurvadas, de 3-4 mm (CORRÊA, 1984). Possuem brotos florais terminais compostos de flores tubulares e radiadas de cor amarelo intenso (CORRÊA, 1984; VALDÉS; REGO, 2001; HAKANSSON, 2003). É considerada uma erva daninha em muitos lugares, podendo ser invasora das plantações. De acordo com o Instituto Agrônômico de Campinas (Brasil), a espécie pode ser considerada forrageira de qualidade regular. Esta planta vegeta em terrenos expostos ou baldios, assim como nos campos cultivados, de preferência silicosos.

Figura 5 - *Bidens pilosa* Linné.



Fonte: Raintree-Health (2005).

Existem muitos relatos populares que apontam a *B. pilosa* para aplicação em várias enfermidades, incluindo inflamações e tumores. Estes relatos chegam de Cuba, Bahamas, Amazônia e região sul do Brasil (VALDÉS; REGO, 2001; FRANCO; FONTANA, 2004). Esta planta também tem longa história de uso pelos povos indígenas da Amazônia. Praticamente todas as partes da planta são utilizadas nas preparações medicinais, sobretudo macerações hidroalcoólicas em garrafadas, que são aplicadas por via tópica e/ou oral com propósitos dos mais variados. De acordo com o que foi relatado por Kwiecinski (2008), na Amazônia peruana, o Picão-preto é utilizado para o tratamento da angina, diabetes, disenteria, dismenorréia, edemas, hepatites, icterícia, laringite, verminoses, febre aftosa em gado bovino. A tribo Cuna da região amazônica costuma usar uma mistura das folhas da planta esmagadas com água para tratar dores de cabeça (CORRÊA, 1984; VASQUEZ, 1990). O Picão-preto ainda é usado pelos povos indígenas para: dores de dente (principalmente a raiz), inflamação da garganta, tratamento de feridas, retenção hídrica, lacerações, alívio de calafrios, blenorragia, leucorréia, tonsilites, obstruções hepáticas, infecções urinárias e vaginais, como emoliente, adstringente, antipirético (CORRÊA, 1984; VALDÉS; REGO, 2001). É também estimulante, desobstruente, sialogoga, com ação antiescorbútica (CORRÊA, 1984). As flores são usadas para desconfortos gástricos em intoxicações alimentares (RUTTER, 1990; ALMEIDA, 1993; COIMBRA, 1994; DUKE, 1985; VASQUEZ, 1990). Nas Bahamas e em Cuba tem sido

utilizada para tratar tumores (VALDÉS; REGO, 2001). Também existem relatos do uso popular do Picão-preto para o tratamento de tumores por adeptos da medicina natural do oeste de Santa Catarina e norte do Rio Grande do Sul (FRANCO; FONTANA, 2004).

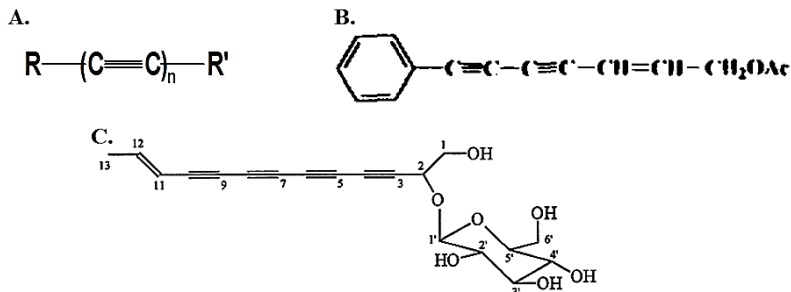
Estudos fitoquímicos realizados sobre *B. pilosa* revelam uma constituição extremamente complexa, que deve variar sutilmente de região para região de coleta. Flavonóides e poliacetilenos foram identificados na espécie como constituintes majoritários (BRANDÃO et al., 1998). Uma pesquisa realizada no Brasil identificou no gênero *Bidens* vinte e quatro substâncias, das quais quatro assemelhavam-se a poliacetilenos, e outros a sesquiterpenos (SÁNCHEZ-VIESCA; ROMO, 1963; CHO et al., 2003).

1.13 Poliacetilenos antitumorais de *B. pilosa*

Considerando a condição de *B. pilosa* como fonte útil para novas moléculas protótipo para pesquisa de fármaco de tratamento do câncer, um interesse especial foi despertado pelo grupo de compostos poliacetilênicos presentes na planta, os quais têm sido identificados e isolados a partir de amostras de *B. pilosa* coletadas em diferentes regiões do mundo e parecem ser os principais responsáveis por sua toxicidade. Foram identificados na *B. pilosa* os compostos poliacetilênicos benzoides fenilheptatrina e α -tertienil, entre carbonatos, cloretos, proteínas (albumina), entre outros (GEISSBERGER; SEQUIN, 1991; ALVAREZ et al., 1996). Em 1996, outros poliacetilenos bioativos foram identificados no extrato metanólico de *B. pilosa*. Entre eles o β -D-glucopiranosiloxi-3-hidroxi-6(E)-tetradeceno-8,10,12-trieno. Estes compostos isolados demonstraram efeito antiproliferativo sobre linhagens celulares humanas normais e transformadas com crescimento acelerado (ALVAREZ et al., 1996).

No Brasil, Brandão et al. (1997) isolou da planta o fenilacetileno denominado acetato de 1-fenilhepta-1,3-diin-5-en-7-ol (Figura 6 B), que demonstrou atividade parasiticida sobre o *Plasmodium berghei*. CHIANG et al. (2007) isolou da planta o composto poliacetilênico denominado citopilofina ou 2-d-glucopiranosiloxi-1-hidroxitrideca-5,7,9,11-tetraino e relatou atividade imunomoduladora para os mesmos. O extrato metanólico obtido de folhas de *B. pilosa* e o poliacetileno daí isolado denominado 2-O-b-D-glucosyltrideca-11E-en-3,5,7,9-tetra-1,2-diol (Figura 6 C) também foram avaliados quanto ao seu potencial imunomodulador (PEREIRA et al., 1999).

Figura 6 - Fórmula estrutural dos poliacetilenos (A). Os compostos poliacetilênicos 1-fenilhepta-1,3-diin-5-en-7-ol (B) e 2-*O*-b-D-glucosyltrideca-11*E*-en-3,5,7,9-tetra-1,2-diol (C).



Fonte: Do autor (A). Brandão et al. (1997) (B). Pereira et al. (1999) (C).

Os poliacetilenos (ou compostos poliacetilênicos) compreendem uma classe relativamente rara de derivados acetilênicos de cadeia longa (Figura 6). Considerando que os acetilenos são normalmente gases muito reativos, é interessante perceber como os poliacetilenos podem ser suficientemente estáveis para serem isolados e caracterizados por técnicas fitoquímicas padronizadas. De fato, mais de 1000 poliacetilenos são agora conhecidos como produtos de plantas. Somente alguns poliacetilenos são derivados de hidrocarbonetos de cadeia simples. A maioria possui grupos funcionais adicionais que podem ser álcoois, cetonas, ácidos, ésteres, aromáticos ou furanos (HARBORNE, 1998).

Há um grande interesse taxonômico sobre os poliacetilenos devido ao seu padrão de distribuição nas famílias de plantas superiores, uma vez que eles só ocorrem regularmente em cinco famílias de organismos vivos (HARBORNE, 1998). Alguns poliacetilenos são sabidamente tóxicos e têm sido considerados fitoalexinas, sendo tóxicos para microrganismos que atacam as plantas que apresentam poliacetilenos em sua constituição. Chega-se a considerar que, se eles têm uma função geral, parece que ela é a de toxina tanto nas interações planta-animal, como nas interações planta-planta (HARBORNE, 1998). Os poliacetilenos são hidrocarbonetos relativamente instáveis, pois absorvem fortemente luz ultravioleta e sua atividade é alterada com a exposição à luz (fotoativação) (WAT et al., 1980). Considera-se que os poliacetilenos podem possuir funcionalidade ímpar relacionada à presença de triplas ligações carbono-carbono em suas moléculas, o que é intrigante por sua ampla variedade de atividades biológicas (HARBORNE, 1998). Como mencionado anteriormente, alguns

compostos poliacetilênicos provenientes de *B. pilosa* já exibiram efeitos citotóxicos sobre parasitas (GEISSBERGER; SEQUIN, 1991; BRANDÃO et al., 1997; RABE, 1997) e algumas linhagens de células transformadas em cultura (ALVAREZ et al., 1996).

Um corpo considerável de evidências da literatura, basicamente resultado de monitoramentos fitoquímicos combinados a ensaios de atividade biológica, indica que entre os vários constituintes de *B. pilosa*, ativos farmacologicamente ou não, os poliacetilenos aparecem como substâncias de interesse por sua toxicidade potencial. Surge aí um desafio, pois estes achados apontam para a possibilidade de pesquisas renderem resultados promissores, dirigindo à purificação dos constituintes poliacetilênicos de *B. pilosa* e para o estudo de sua aplicabilidade, como por exemplo, para o tratamento do câncer. Neste pleito, cabe destacar que uma patente japonesa foi identificada, nela fez-se o registro do sucesso de um método de extração particular na obtenção de extratos ricos em poliacetilenos a partir de material vegetal (*Atractylodes japonica*), refere-se ao método de extração com fluido supercrítico (SHOJI, 1990). A tecnologia supercrítica tem recebido muita atenção por sua aplicabilidade farmacêutica devido a aspectos relacionados à sua seletividade e a atividade biológica dos extratos resultantes (KITZBERGER et al., 2007; MICHIELIN et al., 2009).

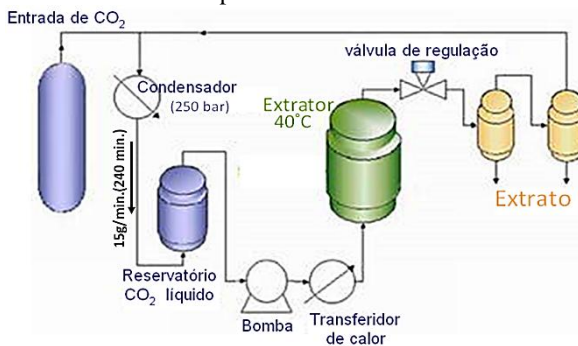
1.14 Extração com fluido supercrítico

Atualmente, existem varias técnicas de extração de compostos de produtos naturais, dentre elas as mais empregadas são processos convencionais, os quais envolvem o arraste à vapor e a extração com solventes orgânicos. Estas operações possivelmente são responsáveis por um nível de degradação térmica de componentes termolábeis presentes na matéria-prima e pela contaminação do extrato com resíduos de solventes, normalmente empregados em grandes quantidades. A extração supercrítica destaca-se por representar uma tecnologia que pode minimizar os prejuízos ao meio ambiente e que vem desenvolvendo-se continuamente nas últimas décadas (MACHMUDAH et al., 2006; CASAS et al., 2007).

A extração supercrítica emprega gases densos como solventes de extração, em operações de alta pressão. Os fluidos supercríticos são produzidos pelo aquecimento de um gás, acima de sua temperatura crítica ou compressão de líquido acima de sua pressão crítica. A temperatura crítica de uma substância é a temperatura acima da qual a

fase líquida não pode existir independentemente da pressão. A pressão de vapor de uma substância em sua temperatura crítica é sua pressão crítica. Em pressões e temperaturas superiores, porém próximas de sua temperatura e pressão críticas (o ponto crítico), uma substância é conhecida como fluido supercrítico. Algumas propriedades físico-químicas são alteradas sob essas condições. A densidade do fluido supercrítico é similar a dos líquidos, sua viscosidade assemelha-se a dos gases e sua capacidade de difusão é intermediária entre os dois estados. Portanto, o estado supercrítico de fluidos pode ser definido como o estado no qual líquido e gás são indistinguíveis entre si. Devido à sua baixa viscosidade e alta capacidade de difusão, os fluidos supercríticos apresentam propriedades de transporte melhores que os líquidos. Podem difundir-se facilmente através de materiais sólidos, resultando, no geral, em melhores rendimentos nas extrações. O solvente supercrítico mais utilizado nestes processos de extração é o dióxido de carbono (CO_2), o qual apresenta natureza apolar e, conseqüentemente, dissolve preferencialmente compostos apolares (PEREIRA, 2010). A figura 7 representa um diagrama esquemático do processo de extração com fluido supercrítico.

Figura 7 - Diagrama esquemático do equipamento de extração com fluido supercrítico.



Fonte: Do autor.

Mais recentemente, atividades de desenvolvimento comercial e de pesquisas nas áreas farmacêuticas, envolvendo a extração de fluidos supercríticos tem despertado grande interesse. Como exemplos comerciais, incluem-se a descafeinização do café, a extração da nicotina do tabaco e a obtenção comercial dos carotenóides da cenoura. Neste contexto, a extração de matérias-primas de plantas medicinais utilizando

este método de extração tem sido muito empregada pela possibilidade de concentrar e isolar compostos utilizando-se dessa tecnologia (MAUL; WASICKY; BACCHI, 1996; MICHIELIN, 2009).

Baseados nas evidências que responsabilizam os poliacetilenos de *B. pilosa* por sua atividade antitumoral, o método de extração com fluido supercrítico foi estrategicamente selecionado aqui para ser obter um extrato rico em constituintes poliacetilênicos que foram assim mais bem avaliados quanto às suas propriedades antitumorais e mecanismo de ação. Como já mencionado, o método de extração supercrítica já havia sido citado na literatura por seu sucesso na extração de poliacetilenos de *Atractylodes japonica* (SHOJI, 1990).

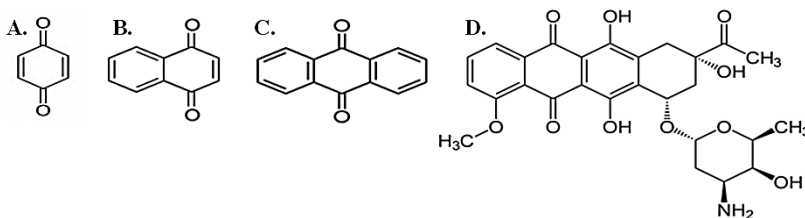
1.15 Quinonas antitumorais

Quinonas são substâncias primeiramente consideradas pigmentos derivados de hidrocarbonetos como o benzeno, naftaleno, antraceno, tetraceno ou outros. A função orgânica destas moléculas é determinada pela presença de um núcleo quinóide. Em princípio, o núcleo quinóide pode ser derivado, por exemplo, a partir do benzeno, quando duas olefinas são substituídas por duas carbonilas, o que leva a um rearranjo das duplas ligações que origina o núcleo quinóide, uma estrutura dicetona completamente conjugada (Figura 8A). Este grupo de substâncias tem despertado a atenção da comunidade científica nas últimas décadas por vários motivos. Pode-se sugerir que entre eles, está o interesse por suas propriedades antitumorais. Este interesse aparece por volta da década de 50. Nesta época, uma companhia de pesquisa italiana, *Farmitalia Research Laboratories*, iniciou um esforço para isolar compostos antitumorais de microrganismos do solo. Uma amostra foi coletada na área dos arredores do *Castel del Monte*, castelo do século XIII na Apulia, sudeste italiano. Dali, uma nova linhagem de *Streptomyces peucetius* que produzia um pigmento vermelho foi isolada, e um antibiótico foi produzido a partir dessa bactéria. Este antibiótico demonstrou inicialmente ter boa atividade contra tumores murinos, ele foi denominado daunorrubicina (Figura 8 D), combinando o nome *Dauni*, uma tribo pré-romana que ocupou a área da Itália onde o composto foi isolado, com a palavra francesa *rubis*, descrevendo a cor deste composto (WEISS, 1992).

Pesquisas em estágio clínico com a daunorrubicina começaram nos anos 60 e o fármaco obteve sucesso no tratamento da leucemia aguda e linfoma. Pouco depois, a Doxorubicina (Adriamicina) e muitos

outros compostos relacionados foram derivados. Alguns deles são usados na clínica médica com sucesso até hoje. Os agentes disponíveis desta classe incluem a daunorrubicina e a doxorubicina, inclusive em preparações lipossomais, a epirubicina, idarrubicina, valrubicina, mitoxantrona, entre outros (WEISS, 1992). Estas substâncias, originalmente consideradas antibióticos, podem matar ou inibir o crescimento de bactérias. Mas, uma vez que foram consideradas excessivamente tóxicas para os humanos, elas nunca foram utilizadas para o tratamento de infecções.

Figura 8 - Parabenzoquinona, o núcleo quinóide (A); 1,4-Naftoquinona (B); Antraquinona (C); Daunorrubicina (D).



Fonte: Do autor.

Literalmente, estas substâncias são derivadas do tetraceno e, originalmente pertencentes à classe química das quinonas. Compõe o grupo de fármacos antitumorais utilizados atualmente na quimioterapia do câncer: as antraciclina. O principal representante do grupo é o fármaco doxorubicina. Estes fármacos são utilizados para a quimioterapia de uma gama de tipos de câncer, incluindo leucemias, linfomas e câncer uterino, de mama, ovariano e de pulmão. Providenciam um dos tratamentos antitumorais mais eficazes, sendo ativos contra mais tipos de câncer do que qualquer outra classe de agentes quimioterápicos. Entretanto, podem ser perigosos, seu principal efeito adverso inclui cardiotoxicidade, que limita consideravelmente sua utilização, além da indução de fortes crises de vômito e perda de cabelo (WEISS, 1992; MINOTTI et al., 2004; PENG et al., 2005).

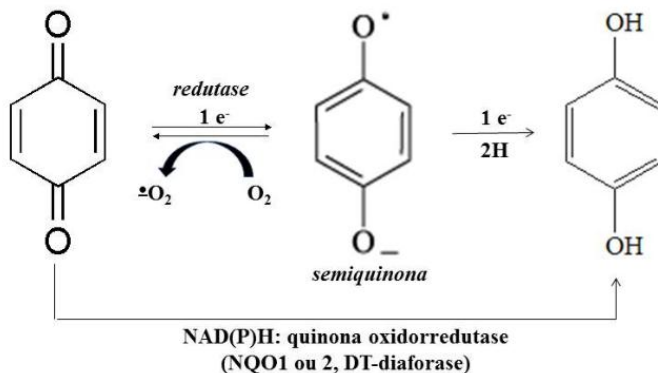
Além das antraciclina, atualmente algumas quinonas têm sido testadas experimentalmente por diversos grupos de pesquisadores. Por exemplo, a Primina é uma benzoquinona que foi extraída de *Primula obconica* Hance e das espécies brasileiras *Myconia sp.* e *Eugenia sp.*, tendo apresentado atividade antileucêmica comparável à daunorrubicina, porém sua aplicação foi limitada pelo seu elevado potencial alergizante (HAZRA et al., 1994; FALKENBERG, 1999; EFFERT et al., 1996).

Desde a década de 70, a benzoquinona lapachol, primariamente extraída de *Tabebuia spp.* tem sido testada e aprimorada por seus notáveis efeitos antitumorais. O lapachol necessita alterações na molécula, pois sem elas, estudos de fase clínica no NCI (EUA) demonstraram que este composto precisa ser administrado em doses muito elevadas devido sua baixa biodisponibilidade e tais doses acabam por resultar em efeitos colaterais como problemas na coagulação (DUKE, 1985; GIRARD et al., 1988).

Outro derivado de quinona que atualmente é alvo das pesquisas de antitumorais é a menadiona ou vitamina K3. Este composto já demonstrou ter efeito citotóxico para tumor de mama, estômago, pulmão, cólon, nasofaringe, cérvix, fígado, leucemia e alguns linfomas (NUTTER et al., 1991).

Com base em evidências relatadas na literatura, algumas características dos agentes antitumorais que contêm o grupo quinona em suas estruturas moleculares, são geralmente aceitas como críticas para sua citotoxicidade e atividade antitumoral. Algumas destas características principais devem explicar o mecanismo de ação através do qual estes agentes podem combater alguns tipos de câncer. A primeira característica refere-se à sua biotransformação que envolve uma redução enzimática da quinona por um ou dois elétrons. Esta redução ocorre no organismo e nas células tumorais, sendo catalisada por flavoenzimas que utilizam NADPH como doador de elétrons, resultando na formação de semiquinona ou hidroquinona do fármaco antitumoral. A NAD(P)H: quinona oxidoreductase (NQO 1 ou 2, DT-diaforase) parece ser uma flavoproteína de transferência de 2 elétrons que catalisa a conversão de quinona em semiquinona ou hidroquinona do fármaco antitumoral (TEDESCHI et al., 1995). A semiquinona é um radical livre, cujos metabólitos, altamente reativos, podem interagir com macromoléculas biológicas através de ligações covalentes. Este processo oxirredutor que conduz à semiquinona pode prosseguir via reações subsequentes com o oxigênio, o que se acredita ser o principal mecanismo responsável pela atividade destes fármacos. Este processo que envolve a redução pela redutase, seguida pela oxidação pelo oxigênio molecular (dioxigênio) é conhecido como ciclo redox (Figura 9), ele permanece até que o sistema torne-se anaeróbico. Quando dois elétrons são envolvidos na redução da quinona, a hidroquinona correspondente pode tornar-se estável e ser excretada pelo organismo por alguma via de detoxificação (O'BRIEN, 1992; MONKS et al., 1992; GUTIERREZ, 2000; ABREU et al., 2002).

Figura 9 - Biorredução de quinona e ciclo redox.



Fonte: Adaptado de Yoder (1991).

No entanto, a redução por doação de um elétron deve ter como consequência que o elétron extra da semiquinona acaba passando para o oxigênio, havendo recuperação da quinona original e formação de radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e outras EROs. Sob determinadas condições, a taxa de formação de EROs pode exceder a capacidade dos mecanismos de defesa antioxidante do organismo e, o resultado disto é o estresse oxidativo, onde os radicais livres começam a causar danos ao DNA e em outras macromoléculas, além de ativar vias de sinalização celular, podendo assim disparar mecanismos de morte em células tumorais susceptíveis. Todavia, sabe-se que estes eventos moleculares podem, dependendo de seus níveis, estarem associados tanto com a inibição, assim como a ativação da carcinogênese. Sabe-se que a capacidade dos derivados quinóides para produzir radicais livres é influenciada pelos substituintes de suas moléculas que determinam a eficiência na qual serão reduzidos a metabólitos de semiquinona (ÖLLINGER; BRUNMARK, 1991).

Como segunda característica das quinonas com atividade antitumoral, pode-se citar seu potencial de interferir com as reações catalisadas pelo complexo enzimático da DNA topoisomerase. Evidências têm sido acumuladas para sugerir que estas interações estão diretamente relacionadas à citotoxicidade destes compostos (DICKANCAITÉ et al., 1997). Outro mecanismo que também tem sido especulado e muito estudado por poder ter relação com o efeito antitumoral de alguns agentes derivados quinóides trata-se de uma potencial atividade inibidora sobre alguns sistemas oxirredutores (NADH-oxirredutases) associados à membrana plasmática (CRANE;

BÖTTGER, 2001). Também se considera um mecanismo que envolve um processo de indução de alquilação redutora sobre o DNA com potencial formação de ligações cruzadas e adutos devido sua eletrofilicidade (BORMAN, 2004).

1.16 Efeito da associação quinona e ascorbato

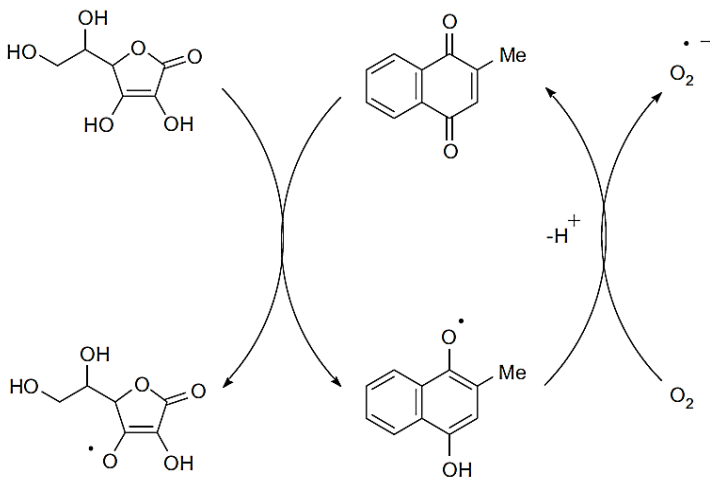
É sabido que a vitamina C, ou ascorbato, pode servir para regenerar as pequenas moléculas antioxidantes como tocoferóis, glutatona, uratos e beta caroteno e também manter os íons metálicos de centros ativos de hidroxilases e oxigenases em um estado reduzido ótimo para suas atividades (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012). Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado que quando administrado em doses elevadas, o ascorbato pode apresentar citotoxicidade para células tumorais (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012). Por exemplo, estudos clínicos em andamento já determinaram em fase I que uma alta concentração plasmática de ascorbato pode ser alcançada de forma segura por meio de administração intravenosa e, que neste caso ele é capaz de restringir o avanço do câncer (HOFFER et al., 2008; VERRAX; CALDERÓN, 2009). Vale esclarecer que neste caso a ação desta substância não está relacionada àquela de vitamina, mas sim a um processo citotóxico que ocorre graças a características do metabolismo das células tumorais. Na verdade, alguns estudos têm gerado evidências de que em altas concentrações, o ascorbato apresenta citotoxicidade, podendo induzir quebras oxidativas no DNA, além de poder interagir com íons metálicos de transição, o que pode gerar radicais livres via reação de Fenton (VENOGUPAL et al., 1996; CARR; FREI, 1999). O ascorbato em altas concentrações apresenta citotoxicidade para células de mieloma maligno, células leucêmicas humanas, neuroblastomas, células de tumor ascítico, leucemia linfoblástica aguda e carcinoma epidermoide (DE LAURENZI et al., 1995).

Tratando mais especificamente deste presente trabalho de pesquisa, os motivos relacionados ao ascorbato e sua associação a quinonas com efeito antitumoral que despertaram maior interesse surgiram a partir de resultados anteriores de pesquisas que vêm sido divulgadas, primeiramente por Taper et al. (1971, 1981, 1996), mas principalmente pelo grupo chileno e belga orientado pelo Dr. Pedro Buc Calderon do *Toxicology and Cancer Biology Research Group (GTOX)* da *Université Catholique de Louvain (UCL – Bélgica)* GTOX – UCL, por exemplo, Verrax et al. (2003, 2004, 2006, 2009 e 2011); Beck et al.

(2009); Benites et al. (2008, 2010) e Glorieux et al. (2011). Estes resultados têm demonstrado de fato que a atividade antitumoral de algumas quinonas, como a menadiona (vitamina K3), é notavelmente potencializada por sua associação ao ascorbato na proporção de 1:100 (VERRAX et al., 2004; BECK et al., 2009). Essa conclusão foi obtida, primeiramente, após a verificação da reativação de DNases ácida e alcalina por ascorbato e menadiona, levando à morte de células tumorais e regressão de tumor (TAPER et al., 1971; TAPER et al., 1981).

Segundo Taper et al. (1996), o aumento da citotoxicidade, consequência da associação do ascorbato à menadiona, pode ser explicado pelo próprio ciclo redox ocorrido entre ambas as substâncias que culmina em indução de estresse oxidativo (Figura 10). As quinonas, como a menadiona, podem ser reduzidas de maneira não enzimática pelo ascorbato para formar deidroascorbato e um radical livre semiquinona. A semiquinona, como já explicado anteriormente, é rapidamente reoxidada para sua forma quinona pelo oxigênio molecular, havendo geração de EROs, tais como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Figura 10), e conseqüentemente, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (HO^{\bullet}) que podem causar uma cascata de reações incluindo peroxidação lipídica, protéica e dano ao DNA, culminando em morte celular (KAPPUS, 1986).

Figura 10 - Ciclo redox: biorredução não enzimática da quinona menadiona pelo ascorbato.



Fonte: BECK et al. (2009).

Características adicionais acerca deste fenômeno são apresentadas por Benites et al. (2008). Neste trabalho, os autores explicam que, em se tratando do resultado da associação do ascorbato com a menadiona, algum crítico até poderia arguir que o radical semiquinona gerado pelo processo biorredutivo poderia ser sequestrado pelo ascorbato para formar radicais ascorbila, um radical mais estável com baixo potencial para gerar danos oxidativos. Contudo, Benites et al. (2008), a partir de experimentos, afirmam que tal possibilidade parece improvável. O que foi demonstrado na verdade, é que o ascorbato potencializa o ciclo de oxirredução quando associado à menadiona, gerando EROs e conduzindo a uma lesão oxidativa letal em células tumorais. Como demonstrado na figura 10, um ciclo redox é iniciado pela transferência de um elétron do ascorbato para a quinona menadiona. Em concordância com os cálculos e previsões anteriores de outros autores como Roginsky et al. (1999) e Benites et al. (2008) que observaram a ocorrência de uma rápida reoxidação da semiquinona para sua forma quinona, juntamente com um aumento no aporte de oxigênio e consequente geração de EROs (JAMISON et al., 2004; VERRAX et al., 2006). Além disso, os autores ainda explicam que também já foi observado que entre as espécies reativas geradas, o H_2O_2 aparece como o agente oxidante de maior importância resultante do ciclo redox ocorrido entre o ascorbato em associação à menadiona e que provavelmente também seja a principal espécie resultante da associação do ascorbato feita com outros derivados quinóides, dependendo aí somente do potencial redox médio de cada substância (VERRAX et al., 2005).

Mais tarde, Verrax et al. (2009) ainda demonstraram que este efeito pode ter alguma seletividade, uma vez que o ascorbato deve ser preferencialmente captado pelas células cancerosas que superexpressam receptores GLUT (VERRAX et al., 2009). Isto ocorre porque as células tumorais são altamente dependentes da glicose, pois apresentam taxas altas de divisão ou “*turnover*” celular (BENITES et al., 2009). Neste caso, o ascorbato disponibilizado em excesso deve desencadear o ciclo redox e a geração das EROs nestas células (VERRAX et al., 2003; 2004; 2005; BENITES et al., 2008; BECK et al., 2009). Também foi observado que a combinação das vitaminas C/K3 na razão de 100/1, após a inoculação de tumor em camundongos, produziu a inibição do crescimento do câncer em tumor transplantado de fígado com um aumento de sobrevivência de 45,8%, além de seletiva potenciação da quimioterapia com a ciclofosfamida (80 mg/kg de peso) e radioterapia

(20 Gy raios-X de irradiação local) na forma sólida de tumor hepático de transplante intramuscular (TAPER et al., 1996).

Tomando como base as informações acima, pode-se considerar que os ensaios de avaliação do efeito de uma quinona antitumoral em potencial podem revelar vantagens em termos de atividade, se também for avaliado o efeito de sua associação a doses elevadas de ascorbato. Foram estes motivos que nos impulsionaram a avaliar a juglona, assim como explicado mais adiante.

1.17 Juglona

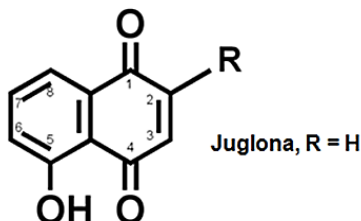
A juglona é um pigmento que normalmente ocorre como um metabólito secundário natural nas raízes, madeira, casca, folhas e nozes da noqueira preta (*Juglans nigra* L.), noqueira européia (*Juglans regia* L.) e noqueira da América do Norte (*Juglans cinerea* L.), todas pertencentes à família Juglandaceae (AITHAL et. al., 2009). A juglona também pode ser encontrada como um produto de síntese orgânica, derivado primariamente da oxidação do naftaleno (WILBUR; SUBLETT, 1977). Esta quinona tem sido obtida alternativamente por método de química verde através da fotoxigenação de 1,5 diidróxinaftaleno na presença de luz solar, oxigênio molecular e aditivo de *Rose Bengal* (OELGEMÖLLER et al., 2005). Este processo mais sustentável apresenta bom rendimento e diminui o custo da obtenção, poupa a natureza e diminui a geração de resíduos originários do uso de solventes orgânicos.

Entre as funções biológicas primárias da juglona produzida e excretada para o ambiente pelas raízes das noqueiras, está atividade alelopática, ou seja, a substância é capaz de inibir a germinação de outras espécies nas proximidades e assim protege o vegetal contra outros competidores (VAN DEN BERG; LABADIE, 1989).

Quimicamente, a juglona é a 5-hidróxi-1,4-naftalenodiona (IUPAC) ou 5-hidróxi-1,4-naftoquinona (C₁₀H₆O₃) (Figura 11). É um composto derivado de hidroxilação da 1,4-naftoquinona (Figura 8 B), sendo isolada como um pó alaranjado a castanho-alaranjado, pigmento que é caracterizado pela presença do grupo cromóforo em sua estrutura molecular, a própria unidade *p*-benzoquinóide. A juglona possui o peso molecular de 174,15 g/mol e seu ponto de fusão fica em torno de 161-164 °C. Apresenta caráter mais lipofílico e possui três picos máximos de absorção espectrais em etanol (249, 345 e 422 nm) (WILBUR e

SUBLETT, 1977; VAN DEN BERG; LABADIE, 1989; AITHAL et al., 2009; YAMASHITA et al., 2009).

Figura 11 - Estrutura química da juglona.



Fonte: Adaptado de Inbaraj e Chignell (2004).

A juglona pode ser tóxica se ingerida por via oral, sendo que estudos com animais indicam que a ingestão de menos de 40 g pode ser fatal ou produzir sérios danos à saúde dos humanos. Pode causar irritação em contato com a pele, vias aéreas ou olhos. A DL_{50} foi determinada por via oral em cerca de 2,5 mg/kg para camundongos. Por via intraperitoneal, a DL_{50} foi determinada em 25 mg/kg para camundongos. Por via intravenosa, a DL_{50} foi igual a 10mg/kg para cães (WESTFALL et al., 1961; SANTA CRUZ INC., 2011).

Estudos científicos já demonstraram que a juglona é bioativa. Pode inibir a liberação de acetilcolina (COOPER; PIROS, 1977). Apresenta toxicidade sobre hepatócitos de ratos (ÖLLINGER; BRUNMARK, 1991). Dependendo da dose pode causar degradação da P53 e induzir rápida fosforilação de H2AX, causando morte celular de fibroblastos humanos (PAULSEN; LJUNGMAN, 2005). Atinge 3 enzimas chaves de *H. pylori* (cistationina γ -sintase [HpCGS], carregador proteico malonil-CoA:aciltransacilase [HpFabD] e β -hidroxiacil-ACP desidratase [HpFabZ]) (KONG et al., 2008). Como a maioria dos derivados quinóides, a juglona tem potencial antitumoral.

Já se sabe que a juglona pode participar de processos geradores de radicais livres (HERNÁNDEZ-MUÑOZ, 2009). Apresentou citotoxicidade e efeito genotóxico sobre células de melanoma em cultura, sendo que após o tratamento à base de juglona, estas células foram encontradas em estado de apoptose tardia e/ou necrótico (AITHAL et al., 2009). A juglona apresentou citotoxicidade sobre células de hepatoma humano HepG2 e fibroblastos de camundongos Balb-c 3T3 (BABICH; STERN, 1993). Finalmente, há ainda evidências de que a juglona possa inativar proteínas ricas em cisteína que são

requeridas para a progressão da mitose por inibir a enzima peptidil-prolil cis/trans isomerase Pin 1 (FILA et al., 2008).

O Laboratório de Bioquímica Experimental do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (LABIOEX – CCB – UFSC), coordenado pela Dra. Profa. Rozangela Curi Pedrosa, em parceria com o grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Pedro Buc Calderón, do GTOX (UCL – Bélgica) têm desenvolvido, nos últimos anos, trabalhos com foco associado à linha de pesquisa do estudo da atividade antitumoral e mecanismo de ação de quinonas naturais e/ou sintéticas e o efeito de sua associação ao ascorbato, como forma de aprimorar a eficácia e a segurança desses produtos. Neste sentido, outra parceria importante foi firmada entre os laboratórios, incluindo o grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Júlio Benites do Laboratório de Química Orgânica da *Universidad Arturo Prat*, de Iquique, no Chile. Este último grupo tem desenvolvido um trabalho baseado na síntese orgânica de quinonas, incluindo processos de química verde. Esta cooperação entre os laboratórios, em formato de tripé, tem pretendido trabalhar em um esforço organizado para identificar novas alternativas terapêuticas e/ou coadjuvantes para o câncer, sempre dando a maior importância à eficácia e a segurança das quinonas testadas em associação ao ascorbato. Foi a partir desta parceria que surgiu a ideia do estudo da associação de juglona e ascorbato para ser avaliada durante o trabalho de doutoramento de Maicon Roberto Kwiecinski que faz a defesa desta presente tese. A hipótese desse trabalho é que o ascorbato pode potencializar a citotoxicidade da juglona, apresentando ainda efeito antiproliferativo e inibidor da migração de células transicionais de carcinoma de bexiga T24.

1.18 Desenvolvimento sustentável de fármacos

Embora, a atividade química tenha sido frequentemente relacionada, direta ou indiretamente, à maioria dos chamados “desastres ambientais”, exercendo papel importante na degradação e poluição ambientais, mais recentemente, medidas vêm sendo tomadas e, cada vez mais incentivadas, no sentido de minimizar o impacto ambiental causado pelas atividades industriais que geram algum tipo de resíduo, ou seja, medidas de tratamento adequado de resíduos, medidas de “remediação” e técnicas de redução na fonte têm colaborado bastante para diminuir a velocidade de contaminação do ambiente por muitas atividades industriais (LENARDÃO et al., 2003).

Neste sentido, em 1991, a agência ambiental norte americana EPA (“*Environmental Protection Agency*”), através de seu escritório para prevenção de poluição lançou seu programa “Rotas Sintéticas Alternativas para Prevenção de Poluição”, uma linha de financiamento para projetos de pesquisa que incluem a prevenção de poluição em suas rotas sintéticas, caracterizando o nascimento da química verde. Alguns anos depois, em 1995, o Governo dos EUA instituiu o programa de premiação “*The Presidential Green Chemistry Challenge*” (“PGCC”), com o objetivo de premiar inovações tecnológicas que possam vir a ser implementadas na indústria para a redução da produção de resíduos na fonte, em diferentes setores da produção. Prêmios similares foram instituídos em vários países, como Inglaterra, Itália, Austrália e Alemanha, entre outros (LENARDÃO et al., 2003).

Esta chamada por tecnologias limpas tem levado a um crescente interesse sobre a química verde (TUNDO et al., 2000). Entre as abordagens da química verde conhecidas, os processos de fotoquímica, que utilizam como, por exemplo, a luz solar, podem ter aplicações valiosas, uma vez que a luz solar é utilizada como energia (ALBINI; FAGNONI, 2004 *apud* OELGEMÖLLER et al., 2005). Os experimentos de fotoquímica geralmente são desenvolvidos nos telhados dos institutos de química ou em países do sul. Os reagentes são expostos sob a luz solar direta, sendo submetidos a reações de foto-oxigenação (GOLLNICK, 1982 *apud* OELGEMÖLLER et al., 2005).

Tendo em vista o forte incentivo global existente para as metodologias verdes de reações de obtenção e síntese de fármacos e outros compostos, cabe explicar que a juglona utilizada neste trabalho foi estrategicamente obtida através de um método verde de foto-oxigenação descrito a seguir na seção 3.5 em Materiais e Métodos.

Em 1998, Anastas e Warner uniram-se para escrever o *best-seller* e mais citado livro na área de química verde, *Química Verde: Teoria e Prática*. Nele são explicados os 12 princípios da química verde. São eles:

1. É melhor prevenir do que tratar os resíduos ou limpar o lixo depois que é formado.

2. Métodos de síntese devem ser concebidos para maximizar a incorporação de todos os materiais utilizados no processo para o produto final.

3. Sempre que possível, as metodologias sintéticas devem ser projetadas para utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade para a saúde humana e para o ambiente.

4. Produtos químicos devem ser projetados para preservar a eficácia da sua função, enquanto se reduz sua toxicidade.

5. A utilização de substâncias auxiliares, por exemplo, solventes e agentes de separação; deve ser desnecessária na medida do possível e inofensiva quando utilizada.
6. Necessidades energéticas devem ser reconhecidas por seu meio ambiente e impactos econômicos; devendo ser minimizadas. Os métodos sintéticos devem ser conduzidos em condição ambiente de temperatura e pressão.
7. A matéria-prima deve ser renovável ao invés de esgotar, sempre que técnica e economicamente viável.
8. Derivatização desnecessária (bloqueio, proteção ou desproteção, modificação temporária de processos físicos e/ou químicos) deve ser evitada sempre que possível.
9. Reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) devem ser superiores em comparação a reagentes estequiométricos.
10. Produtos químicos devem ser concebidos de modo que, no final da sua função, não persistam no ambiente e degradem-se em produtos inócuos.
11. Metodologias analíticas necessitam ser mais elaboradas para permitir monitoramento instantâneo e controle antes da formação de substâncias perigosas.
12. As substâncias e a forma de uma substância utilizada em um processo químico devem ser escolhidas de modo a minimizar o potencial de acidentes químicos, incluindo lançamentos, explosões e incêndios (LOMBARDO; TROMBINI, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral de extratos de *B. pilosa* ricos em poliacetilenos e da associação de juglona e ascorbato de sódio, além de investigar possíveis mecanismos de ação associados a esta atividade.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extrato rico em poliacetilenos de *B. pilosa* a partir do método de extração com fluido supercrítico (SFE);
- Analisar a constituição de SFE com respeito à presença de poliacetilenos por meio de métodos cromatográficos com detecção espectrofotométrica;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato obtido por maceração hidroetanólica (HCE) e SFE de *B. pilosa* sobre a linhagem de célula tumoral MCF-7;
- De forma preliminar, avaliar o mecanismo de citotoxicidade de HCE e SFE de *B. pilosa* por meio da avaliação do potencial indutor de dano sobre o DNA plasmidial;
- Avaliar o potencial antitumoral de SFE de *B. pilosa* em camundongos Balb-c isogênicos portadores de tumor ascítico de Ehrlich e compará-lo ao de HCE;
- Avaliar comparativamente a citotoxicidade da juglona e desta associada ao ascorbato sobre a linhagem de células tumorais T24;
- Avaliar comparativamente o potencial antiproliferativo da juglona e desta associada ao ascorbato sobre a linhagem de células tumorais T24;
- Avaliar comparativamente o potencial efeito anti-invasivo da juglona e desta associada ao ascorbato sobre a linhagem de células tumorais T24;

- De forma preliminar, avaliar a indução do estresse oxidativo como um possível mecanismo de ação envolvido na citotoxicidade e atividade antiproliferativa da juglona e de sua associação com o ascorbato;

- Preliminarmente, avaliar em células T24 o efeito da associação de juglona e/ou ascorbato sobre a citotoxicidade de dois agentes quimioterápicos convencionais utilizados no tratamento do câncer de células transicionais de bexiga, a doxorrubicina e a cisplatina;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes químicos e anticorpos

O meio de cultura modificado de Eagle (DMEM), soro fetal de bovino e os antibióticos para cultura de células foram adquiridos da Gibco (EUA). O ascorbato de sódio, N-acetilcisteína (NAC), catalase (CAT), dimetilsulfóxido (DMSO), diacetato de 2', 7' - diclorofluoresceína, a glutationa-redutase, ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB), ácido 5-sulfossilicílico, dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato reduzido (NADPH), albumina de soro bovino, doxorubicina, cisplatina e coquetel inibidor de proteases foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). O kit de extração de DNA Perfect PepPlasmidi Mini foi proveniente da Eppendorf®. O substrato de fluorescência conjugado a 7 - amino - 4 trifluorometilcumarina (Ac-DEVD-AFC) foi obtido da Enzo Life Sciences (EUA). O coquetel de inibidores de fosfatases foi obtido junto a Calbiochem (Merck4Biosciences). O anticorpo policlonal de coelho contra gama-H2AX humana foi da Upstate (EUA) e o anticorpo de coelho monoclonal contra fosfo-eIF2 α (Ser51) (fator de iniciação eucariótico eIF2) foi obtido junto a Cell Signaling Technology (EUA). O anticorpo monoclonal contra eIF2 α foi da Abcam (UK) e anticorpo policlonal de coelho contra poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) foi originário da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (EUA). Os anticorpos da cascata de sinalização das MAPKs foram originários da Cell Signaling e os anticorpos da cascata da Akt foram da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (EUA). Os anticorpos secundários foram originários da Dako (Dinamarca) e Chemicon (Millipore, EUA). Todos os demais produtos químicos foram obtidos de reagentes de grau de pureza ACS.

3.2 Material vegetal

As amostras da planta *B. pilosa* foram coletadas na Reserva Florestal do Parque da Juréia (Mata Atlântica), no estado de São Paulo, Brasil. O tratamento das amostras foi realizado pelo grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Maria Helena Rossi do Instituto Biológico de São Paulo. Exsiccatas dos indivíduos coletados foram depositadas no Herbário Eneida P. K. Fidalgo do Instituto Botânico de São Paulo. O

material foi limpo e seco em estufa a 40°C, posteriormente procedeu-se com uma moagem por moinho de facas.

3.3 Extração a partir de *B. pilosa*

O extrato bruto hidroetanólico de *B. pilosa* (HCE) foi obtido também pelo grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Maria Helena Rossi do Instituto Biológico de São Paulo. As partes aéreas pulverizadas foram submetidas à maceração exaustiva em etanol-água (9:1) sob temperatura ambiente por três dias (3 vezes). Após, os solventes foram eliminados em rotaevaporador sob pressão reduzida, para a obtenção de um extrato seco, havendo um rendimento de cerca de 8,3% em termos de material inicial.

O extrato supercrítico (SFE) foi obtido pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira do Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) do Departamento de Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. A extração foi feita numa unidade extratora dinâmica. Uma massa de 15 g de material vegetal pulverizado foi colocada no extrator para formar um leito de partículas que permaneceu sob condições controladas de temperatura e pressão (MICHIELIN et al., 2009). A extração foi realizada utilizando CO₂ como solvente e mantendo as condições de extração em 40 °C, 250 bar e fluxo de solvente 5 ± 0,5 g/min por 240 min (SHOJI, 1990). O processo utilizou CO₂ 99,9% puro (White Martins, Brasil) liberado em pressão superior a 60 bar. O extrato resultante (SFE) foi coletado em frascos âmbar e pesado em balança analítica. No geral, o procedimento apresentou um rendimento de 2% em termos de material inicial, ele foi repetido tantas vezes quanto foi necessário para se obter a quantidade suficiente de extrato para os ensaios biológicos e fitoquímicos.

3.4 Presença de poliacetilenos em SFE

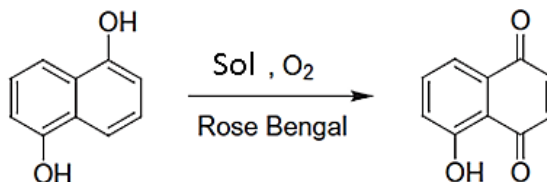
A presença de poliacetilenos em SFE foi confirmada a partir dos seguintes procedimentos de caracterização fitoquímica. O extrato seco foi inicialmente solubilizado em acetato de etila P.A., após foi submetido à cromatografia em camada delgada em escala semipreparativa realizada em sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) e solução composta de AcOEt-H₂CO₂-AcOH-H₂O (75:5:5:20) para a fase

móvel. O material contido na mancha majoritária foi coletado e ressolubilizado em metanol P.A. Após centrifugação (14.000 rpm durante 15 min), a solução sobrenadante foi submetida a varredura espectrofotométrica UV-Vis. Os dados espectrais foram então comparados com dados da literatura (BRANDÃO et al., 1997; HARBORNE, 1998).

3.5 Obtenção de juglona

A juglona foi gentilmente fornecida pela equipe coordenada pelo Prof. Dr. Julio Benites, do Laboratório de Química Orgânica da Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile. A juglona foi obtida como produto de um processo de fotoquímica verde via foto-oxigenação de 1,5 diidróxinaftaleno (Figura 12), o reagente de partida, na presença de luz solar, oxigênio molecular e aditivo fotossensibilizador de *Rose Bengal* (4, 5, 6, 7-tetracloro-2', 4', 5', 7'-tetraiodofluoresceína) de acordo com o método proposto por Oelgemoller et al. 2005. Estes autores explicam que, embora a maioria das reações térmicas possam sofrer de algumas desvantagens severas relacionadas à produção, seletividade, sustentabilidade ou reprodutibilidade do procedimento, de forma diferente, a oxigenação fotossensibilizada do 1,5 diidróxinaftaleno com luz apropriada pode fornecer juglona em rendimentos de 70-75%, mesmo em escala de multigramas (OELGEMÖLLER et al., 2005). A reação de síntese está ilustrada na figura 12.

Figura - 12 Foto-oxigenação do 1,5 diidróxinaftaleno.



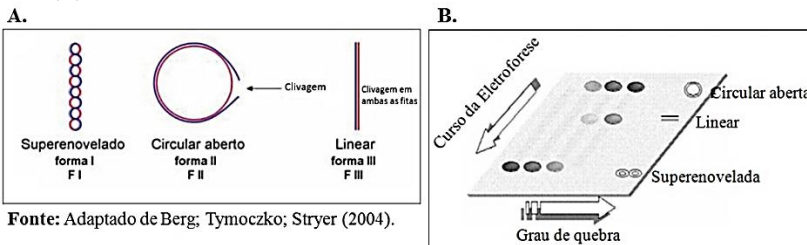
Fonte: Oelgemöller et al.(2005).

3.6 Avaliação do potencial indutor de danos diretos sobre DNA plasmidial

Este ensaio foi realizado com a colaboração do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Claus Pich (Centro Tecnológico, UFSC, Araranguá, SC - Brasil). A capacidade de HCE e SFE para induzir

quebra nas fitas de DNA *in vitro* foi avaliada por meio de uma eletroforese padrão em gel de agarose 0,8% feita com DNA plasmidial pUC9.1 extraído de *E. coli* cultivada em meio DH5 α FIQ Lauria-Bertani sólido de acordo com Dantas et al. (1999). As substâncias capazes de causar danos ao DNA podem gerar quebras nas suas fitas que alteram sua conformação e seu padrão de migração eletroforético em agarose (Figura 13). Em princípio, o DNA intacto deve ser encontrado sob a conformação superenovelada (FI). Uma lesão pode causar uma quebra simples na estrutura em dupla hélice que dará origem, primeiramente, a uma estrutura anelar das fitas de DNA (FII). Um dano maior deve ser capaz de provocar rupturas em ambas as fitas, dando origem a conformação planar das fitas (FIII). Veja a figura 13.

Figura - 13 Esquema de clivagem do DNA plasmidial (A). Imagem do gel obtido pela eletroforese do DNA plasmidial intacto e clivado em uma ou duas fitas (B).



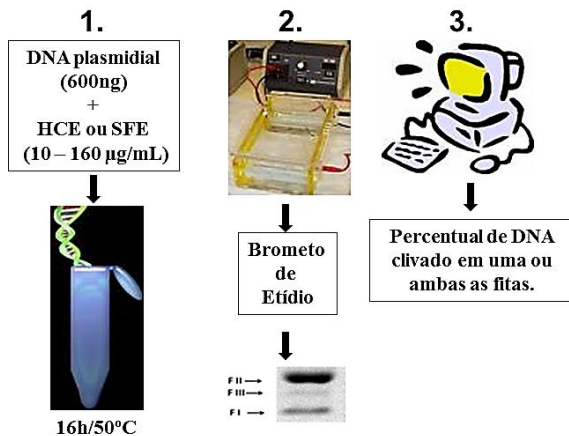
Fonte: Adaptado de Berg; Tymoczko; Stryer (2004).

Fonte: Mancini et al. (2005).

O kit Perfect PepPlasmidi Mini (Eppendorf ®) foi utilizado para extrair o DNA plasmidial que foi quantificado espectrofotometricamente a 260 nm. Este procedimento está esquematizado e ilustrado na figura 14. Para a presente avaliação, 5 μ L de uma solução feita com de 600 ng de DNA foram incubadas com 45 μ L de uma solução feita com SFE ou HCE (10 – 160 μ g/mL) solubilizados em água - veículo (9:1) em pH 7,4 a 50°C por 16 h. Fe-EDTA (20 μ M), neste caso foi utilizado por suas propriedades tóxicas sobre o DNA, funciona como agente indutor de danos oxidativos, por isso foi utilizado como controle positivo. Somente veículo foi usado para o controle negativo (45 μ L). Após a incubação com os referidos produtos, o DNA foi carregado no gel (aproximadamente 10 μ L/poço) e submetidas à eletroforese em 70-80 V em tampão TBE (89 mM Tris Borato, 2 mM EDTA) por 30-45 min. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL, 20 min) e então, as bandas foram visualizadas e fotografadas. Finalmente, as imagens foram

analisadas pelo software de bioinformática AlphaImage (AlphaImaging[®]), que compara a intensidade das bandas e a quantidade de pixels, assim gráficos relativos à densitometria das bandas também foram obtidos.

Figura- 14. Avaliação do potencial para clivar o DNA plasmidial.



Fonte: Do autor.

3.7 Cultura de células

Para os ensaios realizados no Brasil, células da linhagem tumoral humana MCF-7 (carcinoma humano de mama) foram adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro. Para os ensaios realizados na Bélgica, as células T24 (carcinoma humano de bexiga) foram adquiridas junto ao *Ludwig Institute for Cancer Research*, Bruxelas. As células foram cultivadas e mantidas a 37 °C em uma atmosfera de CO₂ (5%) com 95% de umidade em meio DMEM (Cultilab[®]) suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (ZHONG et al, 2006).

3.8 Avaliação da viabilidade celular

A citotoxicidade foi primeiramente avaliada através do método que emprega o sal de 3-(4, 5 - dimetil - 2 - tiazol) 2, 5 - difenil-brometo de tetrazólio (MTT) (FRESHNEY, 1999). Este método avalia a

viabilidade celular em nível de mitocôndria. Originalmente o sal de tetrazólio apresenta-se na cor amarelo-ouro. Células viáveis, pela atividade de enzimas como a succinato desidrogenase mitocondrial, podem reduzir o sal de tetrazólio e produzir derivados do formazan, de cor púrpura, cuja intensidade de cor pode ser determinada espectrofotometricamente e é proporcional ao número de células viáveis na amostra (MOSMANN, 1983). Para o ensaio, primeiro as células foram plaqueadas em placas *multiwell* de 96 poços, sendo 10^4 células semeadas por poço seguido de uma incubação de 24 h para permitir a aderência e confluência celulares. Depois, o meio de cultura completo foi substituído por outro (200 μ L) contendo SFE ou HCE (0-1000 μ g/mL), juglona (0-40 μ M) administrada sozinha ou associada ao ascorbato em excesso 1 mM (BECK et al., 2009), ou somente ascorbato (até 1mM), então procedeu-se com uma nova incubação até alcançar o tempo de tratamento a ser avaliado (de 3 a 24 h, dependendo do caso). A incubação do controle negativo foi feita somente com meio de cultura completo e fresco contendo quantidades equivalentes dos veículos utilizados para os vários tratamentos (DMSO 0,1%). Cada concentração foi testada em triplicata, em três experimentos individuais feitos em dias diferentes.

No caso específico dos ensaios com a juglona e sua associação ao ascorbato, para se avaliar a participação do estresse oxidativo induzido sobre a citotoxicidade dos produtos testados, foram também empregados junto aos tratamentos os antioxidantes a N-acetilcisteína (NAC) 3 mM e a catalase (CAT) 100 U. Já para avaliação do efeito da associação de juglona e/ou ascorbato com a quimioterapia convencional de câncer de células transicionais de bexiga, a doxorrubicina foi aplicada associada em 1,6 μ M e a cisplatina 20 μ M, ocorrendo neste caso uma incubação de 24 h. Na sequência, o meio e os demais produtos eram retirados, as células lavadas com tampão fosfato (PBS) a 37 °C, sendo 100 μ L de MTT (1 mg/mL) adicionado neste momento. Permitiam-se mais 2 horas de incubação, decorrido esse período, o MTT excedente era retirado, e então adicionado 100 μ L de DMSO (P.A.) para solubilizar os cristais de formazan produzidos durante a incubação. Em seguida, as placas eram encaminhadas à leitura espectrofotométrica com o uso de um leitor UV-ELISA (540 nm) para determinação da intensidade de cor do cromógeno violeta diretamente proporcional ao nível de viabilidade celular e, conseqüentemente, a atividade citotóxica dos compostos era determinada.

Os dados obtidos foram expressos graficamente em percentual de células viáveis em relação ao controle negativo. A partir daí um valor de

CI₅₀ foi determinado a partir do software GraphPad Prisma (San Diego, EUA). O valor de CI₅₀ é uma estimativa matemática que corresponde à concentração inibitória 50%, ou seja, a concentração na qual, dado composto potencialmente citotóxico é capaz de produzir a morte de 50% das células expostas sob a incubação.

3.9 Morfologia das células em processo de morte

As células foram colocadas em placas de Petri (10⁶ células), sendo permitidas inicialmente 24 h de incubação para a aderência celular. Na sequência, o meio foi substituído por outro contendo os tratamentos, ou seja, juglona 10 µM e/ou ascorbato 1 mM, administrados isoladamente ou em associação. Sanguinarina 5 µM foi utilizada para o tratamento do controle positivo. A sanguinarina é um conhecido flavonoide indutor de apoptose (ADHAMI et al., 2003). Somente veículo inerte foi utilizado para o tratamento do controle negativo. Após mais 24 h de incubação, a morfologia das células sob o efeito do tratamento foi feita usando um microscópio óptico (aumento de 400 x) acoplado a uma câmera. As análises foram feitas com auxílio do software de captura e digitalização de imagens Motics Image Plus 2.0 (Ted Pella Inc., Redding, EUA). Os resultados foram obtidos através da comparação entre o efeito dos diferentes tratamentos.

3.10 Medida do conteúdo celular de EROs

O conteúdo de EROs intracelular foi avaliado de acordo com o relatado por Glorieux et al. (2011) pelo método do reagente fluorescente diclorofluoresceína. O diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) é um reagente que permeia as células. No compartimento intracelular ele sofre a ação de esterases, sendo convertido em diclorofluoresceína reduzida (DCFH) que assim fica mantido compartimentalizado. O DCFH é oxidado pelas EROs celulares produzindo diclorofluoresceína fluorescente. A medida da fluorescência é proporcional ao conteúdo de EROs celular. Inicialmente, 15.000 células aderidas eram incubadas com uma solução de DCFH-DA (10 µM) em solução tampão de Hank (HBSS) a 37°C por 30 min. Após, o excesso de DCFH-DA era removido por lavagem com HBSS fresco. As células eram então incubadas por 2 h com os compostos-teste (juglona 10 µM e/ou ascorbato 1 mM). Na sequência, as células tratadas eram submetidas a

mais uma lavagem dupla com HBSS e, então mais 100 μL de HBSS era finalmente adicionado por poço na placa de cultura celular de 96 poços. A intensidade da fluorescência era medida em um leitor de microplacas (Victor™ X2, PerkinElmer) programado em 485 nm para excitação e 530 nm para emissão. As alterações dos níveis de EROs foram determinadas, calculando-se $\Delta F = (F - F_0)/F_0$, onde F representa a fluorescência média do teste registrada a cada intervalo de 30 min e F_0 a fluorescência média dos controles.

3.11 Conteúdo celular de glutatona reduzida

O conteúdo celular de glutatona reduzida (GSH) foi estimado de acordo com o método descrito por Griffith (1980), baseado em uma reação onde o ácido 5, 5 - ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) reage com a GSH para formar o ácido 2 - nitro - 5 - tiobenzóico (DTNB reduzido), um produto amarelo com absorção característica em 412 nm. Primeiramente, era estimada a concentração de GSH total presente na amostra, sendo o conteúdo de glutatona oxidada (GSSG) reciclado pela atividade da enzima glutatona redutase, na presença de NADPH. Resumidamente, realizados os tratamentos (juglona 10 μM e/ou ascorbato 1 mM) por 3 h, as células eram lavadas com PBS frio e imediatamente acidificadas com ácido sulfosalicílico (SSA) 5%. Estas amostras eram então submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento seguidos de centrifugação a 4°C (10.000 g/10 min). Dez microlitros do sobrenadante eram então utilizados para a mistura de reação contendo 0.2 U/mL de glutatona redutase, 50 mg/mL de DTNB e 1 mM de ácido etileno diamina tetracético (EDTA) em pH 7. A reação era iniciada adicionando-se 50 μL de NADPH (0,16 mg/mL) e as alterações na absorbância eram registradas a 412 nm. O conteúdo de GSSG era medido, eliminando-se o GSH com 2-vinilpiridina. A concentração de GSH era então deduzida e os resultados expressos em nmols, sendo normalizados pelo conteúdo de proteína nas amostras determinado pelo método descrito por Lowry et al. (1951).

3.12 Ensaios de imunoeletroforese

Tendo sido realizados os devidos tratamentos das células em cultura (juglona 1-20 μM e/ou ascorbato 1 mM por até 4 h), as células eram lavadas 3x com PBS e tratadas com o tampão de lise RIPA a pH

7,4 (Tris-Cl 25 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, desoxicolato de sódio 0,25% e fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1 mM) suplementado para uso com um coquetel inibidor de proteases 1% e outro inibidor de fosfatases 3%, ambos procedentes da Sigma-Aldrich®. As amostras eram totalmente destacadas das paredes dos pocinhos com auxílio de um espalhador e então recolhidas em microtubos. A concentração de proteínas presente em cada amostra era determinada pelo método de Bradford por meio de um *kit* para determinação (BioRad). Na sequência, as amostras eram desnaturadas em tampão Laemmli em pH 6,8 composto por Tris-Cl 60 mM, dodecil sulfato de sódio 2% (SDS), glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5% e 0,01% de azul de bromofenol. Quantidades iguais de proteínas (30 μ g) originárias de homogenatos de células totais eram então submetidas à eletroforese em géis de poli(acrilamida) (SDS-PAGE). Na sequência as proteínas eram separadas e transferidas para membranas de nitrocelulose por eletrotransferência. Estas membranas foram então bloqueadas com leite em pó desnatado, lavadas e depois incubadas *overnight* com os anticorpos primários (1: 1.000). Então, as membranas eram lavadas novamente e incubadas por mais algumas horas com os anticorpos secundários (1: 2.500) conjugados com peroxidase (DEJEANS et al., 2010).

A detecção das bandas foi feita com um *kit* para detecção de quimiluminescência (Amersham®) e as imagens foram obtidas por revelação em filme de raio-X. Para o controle da carga de proteínas utilizava-se como marcador a β -actina (US Santa Cruz Biotechnoly, Inc.). O anticorpo policlonal de coelho contra histona 2A fosforilada (gama H2Ax) era da marca Upstate (EUA). Os anticorpos monoclonais de coelho contra o fator de iniciação eucariótico 2 α fosforilado e total eram da Abcam (UK). O anticorpo policlonal de coelho contra poli-(ADP-ribose)-polimerase (PARP) clivada foi da Santa Cruz Biotechnoly, Inc. (EUA). Os anticorpos secundários foram da Dako (Dinamarca) e Chemicon (Millipore, EUA).

3.13 Atividade de caspases

Para este estudo, em princípio, 10⁶ células aderidas eram tratadas apropriadamente em placas de Petri (juglona 10 μ M e/ou ascorbato 1 mM, por 6 até 24 h). Depois, as células eram lavadas duas vezes com PBS, para então serem tratadas com tampão de lise pH 7,4 composto por Hepes 50 mM, CHAPS 5 mM e ditiotreitól (DTT) 5 mM. Estas amostras eram coletadas em tubos, depois, as mesmas eram

centrifugadas e, os sobrenadantes incubados com um substrato da caspase-3 fluorogênico Ac-DEVD-AFC da Enzo Life Sciences® em tampão de reação pH 7,4 composto de Hepes 20 mM, CHAPS 0,1%, DTT 5 mM e EDTA 2 mM. Este substrato é um peptídeo sintético marcado com uma molécula fluorescente 7-amino-4-trifluorometil cumarina (AFC ou Ac), na seguinte sequência Ac-Asp-Glu-Val-Asp (Ac-DEVD). A liberação da molécula fluorescente do substrato pode ser utilizada para a avaliação da atividade das caspases. Quando AFC está ligado ao substrato peptídico, ele produz uma fluorescência azul sob a exposição à luz UV (400 nm). A caspase-3 cliva enzimaticamente o substrato-AFC e libera AFC livre, que produz uma fluorescência amarelo-esverdeada em 505 nm quando exposta à luz UV. A atividade da caspase-3 na amostra é proporcional à quantidade de AFC livre produzida. A liberação do fluorocromo foi determinada cineticamente em temperatura ambiente utilizando um espectrofotômetro Victor X2 programado em 380 nm para excitação e 505 nm para emissão (Perkin Elmer, Waltham, USA). Os resultados foram expressos como U/mg de proteína, como originalmente descrito por Nicholson et al. (2002). Sanguinarina (5 µM), um flavonóide conhecido por induzir apoptose (Adhami et al., 2003), foi utilizada para o tratamento do controle positivo.

3.14 Ensaio de formação de colônias ou ensaio clonogênico

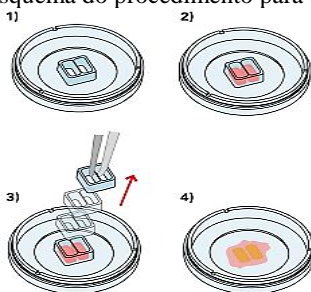
Para a avaliação do potencial efeito antiproliferativo, fez-se o ensaio de formação de colônias ou ensaio clonogênico (AITHAL et al., 2009; BENITES et al., 2010). Primeiramente, 500 células eram incubadas por 24 h para a aderência em cada poço das placas de cultura de 6 poços. Transcorrido este período o meio de cultura completo era substituído por outro contendo juglona (1-5 µM) isoladamente ou associada ao ascorbato de sódio 1 mM, ou somente ascorbato de sódio 1mM. Para avaliar o papel do estresse oxidativo sobre a proliferação celular, foram também administrados os antioxidantes NAC 3 mM ou CAT 100 U. A incubação do controle negativo foi feita somente com meio de cultura e quantidade equivalente de veículo (DMSO 0,1%). Para o tratamento-teste, procedeu-se com uma incubação por 2 horas. Depois, as células eram lavadas com PBS a 37°C (3x) e o meio era novamente substituído por outro fresco para uma incubação de cerca de 8-10 dias, ou até a presença das colônias ser percebida (pelo menos uma colônia com cerca de 50 células). O ensaio era então finalizado, o meio

retirado e as colônias fixadas e coradas com uma solução de cristal violeta 0,2% para serem posteriormente visualizadas e quantificadas em contador de colônias, sendo os resultados expressos pelo número de unidades formadoras de colônias (UFCs), comparativamente ao controle negativo.

3.15 Ensaio *in vitro* de migração

Para avaliação do potencial efeito inibidor da motilidade celular ou antimigratório, os tratamentos foram avaliados pelo ensaio de migração, também conhecido com ensaio de cicatrização de feridas. Para estes experimentos, foram utilizadas placas de cultura com inserto (Ibidi®), através de um protocolo sugerido pelo próprio fabricante. Inicialmente, uma suspensão contendo 7×10^5 células/mL era preparada, sendo 70 μ L semeados em cada compartimento das placas que contém 2 compartimentos/cada. Procedia-se com uma incubação de 24 h, permitindo que as células aderissem. Após, o inserto era retirado com auxílio de uma pinça estéril. A partir daí, formavam-se em cada placa duas populações celulares distintas, separadas por um espaço (*gap*) intercelular de cerca de 500 μ m (Figura 15).

Figura 15–Esquema do procedimento para o ensaio de migração.



Fonte: Ibidi®.

Cada placa recebeu o respectivo tratamento, havendo placas onde foram adicionados 2 mL de meio de cultura contendo juglona (1- 5 μ M) administrada sozinha ou associada ao ascorbato de sódio 1 mM ou somente ascorbato de sódio 1mM, sendo feita a incubação do controle negativo somente com meio de cultura fresco e o volume respectivo de veículo (DMSO 0,1%). Desta vez, o meio de cultura para os tratamentos não continha soro bovino fetal, para evitar a proliferação celular.

Na sequência, sob um microscópio acoplado a um sistema de captura de imagens, fotos eram feitas no tempo inicial zero (imediatamente à adição do meio contendo os tratamentos), depois às 8, 12, 16, 20 ou 24 h (tempo final). As imagens foram comparativamente analisadas a fim de se identificar o potencial efeito inibidor da motilidade celular e/ou atração entre as duas populações celulares existentes. Os resultados foram apresentados a partir destas imagens (IBIDI™, 2011).

3.16 Estudo da atividade antitumoral *in vivo*

Antes do início da execução desta parte da pesquisa, um projeto detalhado solicitando a autorização para o uso de animais foi protocolado e aprovado junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (Protocolo n. PP00477).

Neste protocolo experimental foram utilizados camundongos Balb/c isogênicos (*Mus musculus*), machos, com 20 ± 2 g de peso, obtidos por reprodução e manejo controlados no Biotério Setorial do LABIOEX. A criação seguiu conforme recomendações de guias reconhecidos internacionalmente e destinados à espécie. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas sob condições ambientais controladas (ciclo claro-escuro de 12 h, temperatura 22 ± 2 °C, ~ 60 % de umidade relativa do ar), recebendo ração laboratorial e água *ad libitum*.

Para a indução de tumor, o tratamento experimental e a avaliação *in vivo* da atividade antitumoral, células (5×10^6) do tumor ascítico de Ehrlich foram inoculadas no abdome dos animais em condições assépticas para induzir o desenvolvimento de tumor ascítico. As células do carcinoma de Ehrlich são mantidas no LABIOEX em camundongos, por meio de transplante sistemático. Originalmente, estas células foram obtidas junto a Universidade do Vale do Itajaí (Univali, Itajaí, SC - Brasil).

O dia da inoculação foi considerado dia zero (0). Os animais foram divididos em grupos (n = 12): a) controle normal; b) controle negativo (com tumor, sem tratamento ativo); c) controle positivo tratado com doxorrubicina 0,06 mg/kg; d) dois grupos-teste tratados com os extratos de *B. pilosa*, SFE ou HCE 100 mg/kg. Os tratamentos foram realizados por via intraperitoneal (i.p.). Os tratamentos foram iniciados 24 h após a inoculação das células tumorais. Os extratos foram administrados nas concentrações máximas previamente determinadas

que, em princípio, não induziram a morte dos animais pelo menos sob este esquema de tratamento. Os tratamentos foram feitos durante 9 dias consecutivos. Ao décimo dia, seis animais selecionados aleatoriamente de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical para a medida da atividade antitumoral feita através das seguintes avaliações:

a) Determinação do volume total de líquido ascítico e células compactadas (KVICINSKI et al., 2008). O fluido ascítico de cada animal foi coletado total e individualmente por meio de seringa e, seu volume medido utilizando tubos graduados. Na sequência estes tubos eram centrifugados (1000 g por 5 min) e então, o volume de células compactadas era determinado.

b) Medida da circunferência abdominal e determinação do peso dos animais (KVICINSKI et al., 2008). A variação destas medidas foi determinada por subtração entre os valores medidos no final, ou seja, após 9 dias de tratamento, menos os valores de peso e circunferência medidos no primeiro dia de tratamento. Os resultados foram expressos em centímetros, no caso da circunferência ou gramas, no caso do peso. Baseados na medida da variação média da circunferência abdominal dos grupos-teste, o percentual de inibição do crescimento do tumor (% ICT) era determinado por comparação, por regra de três, junto com as medidas médias obtidas do grupo controle negativo, a partir da seguinte equação (KVICINSKI et al., 2011b):

$$\text{ICT (\%)} = (\text{variação média circunferência abdominal do grupo-teste} \times 100 / \text{medida média do grupo controle negativo}) - 100 \quad (1)$$

Os animais restantes em cada grupo foram mantidos vivos para a avaliação dos parâmetros de tempo médio de sobrevida (TMS) e percentual de aumento da longevidade (PAL) de acordo com as equações a seguir (QURESHI, 2001):

$$\text{TMS (dias)} = (\text{dia da primeira morte} + \text{dia da última morte}) / 2 \quad (2)$$

$$\text{PAL (\%)} = [(\text{TMS do grupo tratado} / \text{TMS grupo controle}) - 1] \times 100 \quad (3)$$

3.17 Análise estatística

Na grande maioria dos casos, os resultados foram expressos através de média \pm desvio padrão ou fornecido o intervalo de confiança. Os ensaios bioquímicos foram sempre realizados em triplicata e, no caso dos ensaios *in vitro*, repetidos três vezes. Os dados foram submetidos à

análise de variância *one-way* ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni ou Tukey-Kramer, quando apropriado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Atividade antitumoral de extratos de *B. pilosa*

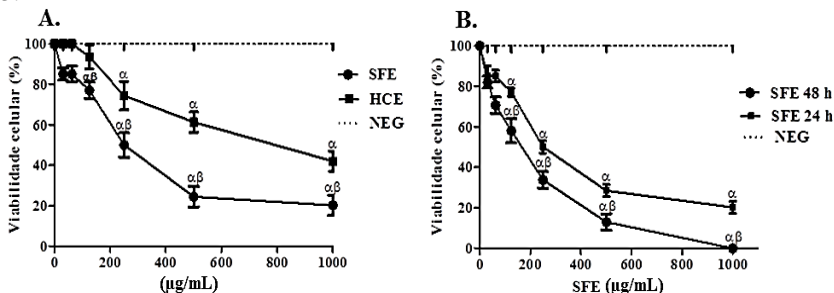
4.1.1 Citotoxicidade *in vitro*

Inicialmente, ambos os extratos de *B. pilosa*, HCE e SFE foram testados com respeito à citotoxicidade sobre células MCF-7 através do ensaio do MTT. Os resultados são apresentados na figura 16. Pode-se observar, que sob a incubação de 24 h, ambos os extratos apresentaram alguma citotoxicidade, tendo sido observado uma diminuição progressiva nos níveis de viabilidade celular, em comparação ao controle negativo, proporcional ao aumento da concentração de cada extrato, tanto em amostras de células tratadas por HCE, como naquelas tratadas com SFE (Figura 16 A). No entanto, ainda de acordo com os dados desta figura, aparentemente o tratamento realizado com SFE causou redução maior na viabilidade celular proporcionalmente ao aumento de sua concentração (Figura 16 A). Estes dados foram utilizados para o cálculo do valor de CI_{50} , às 24 h, tendo sido determinada a $CI_{50} = 811 (795-828) \mu\text{g/mL}$ para HCE, enquanto que SFE confirmou sua citotoxicidade mais elevada, exibindo $CI_{50} = 437 (429-446) \mu\text{g/mL}$.

A extração com fluido de CO_2 supercrítico já havia sido empregada sobre amostras de *B. pilosa* para render um produto no qual foram identificados os poliacetilenos citopiloína e outros glicosídeos poliacetilênicos com atividade antidiabética (CHIEN et al., 2009). No entanto, o presente estudo foi o primeiro a avaliar a citotoxicidade do extrato supercrítico de *B. pilosa* sobre células MCF-7. Além disso, alguns dos resultados obtidos aqui são comparáveis àqueles encontrados anteriormente em um estudo onde a citotoxicidade do extrato bruto hidroetanólico de *B. pilosa* e três de suas frações metanólica, acetato de etila e clorofórmica foi avaliada sobre células do carcinoma de Ehrlich *in vitro*. Neste estudo, a citotoxicidade do extrato bruto foi destacada ($CI_{50} = 701,7 \pm 5,3 \mu\text{g/mL}$), também tendo sido demonstrado que a fração clorofórmica foi a mais citotóxica ($CI_{50} = 83,0 \pm 5,2 \mu\text{g/mL}$). Desta forma, evidências já haviam sido geradas indicando que, no caso de *B. pilosa*, seus constituintes mais citotóxicos possuem maior afinidade para solventes com características mais apolares, corroborando com as previsões de que os poliacetilenos podem ser os responsáveis

pela citotoxicidade dos extratos (KVIECINSKI et al., 2008). Uma comparação entre a citotoxicidade dos extratos de *B. pilosa* sobre células do carcinoma de Ehrlich com a citotoxicidade observada neste momento sobre as células MCF-7, permite sugerir a citotoxicidade superior de SFE em relação à aquela de HCE é então coerente. Vale lembrar que na extração feita aqui com fluido supercrítico foi utilizado CO₂ como solvente e este fluido possui um caráter apolar. Esta percepção é importante, pois serve para indicar que a extração sobre *B. pilosa* com fluido de CO₂ supercrítico representa uma alternativa para a extração dos constituintes mais citotóxicos, havendo a vantagem relacionada à pureza do extrato resultante deste procedimento que termina com a eliminação praticamente total do CO₂, uma vez liberada a pressão empregada pelo sistema extrator.

Figura 16- Citotoxicidade de SFE e HCE sobre células MCF-7 após incubação de 24 h (A); Citotoxicidade de SFE às 48 h de incubação (B). (^α) Denota diferença estatística em comparação ao controle negativo (NEG) e (^β) diferença em comparação a HCE (A) e às 24 h (B), respectivamente quando $p < 0,05$, $n = 3$.



Fonte:Ensaio do MTT de citotoxicidade *in vitro*.

Tendo sido demonstrado uma citotoxicidade superior de SFE, este extrato foi selecionado para ser avaliado quanto à interferência da variável tempo de tratamento para sua atividade. Então, novos ensaios foram realizados quando as células MCF-7 foram tratadas com a mesma faixa de concentração de SFE utilizada anteriormente, mas permitindo que a incubação fosse mantida até 48 h. Os resultados apresentados na figura 16 B demonstram que o tempo pode ser determinante para a citotoxicidade de SFE, tendo sido encontrado sempre uma redução mais acentuada na viabilidade celular às 48 h em comparação à viabilidade resultante do mesmo tratamento em 24 h (Figura 16 B). Por consequência, a CI₅₀ determinada para SFE às 48 h foi igual a 291 (283-

300) µg/mL. Portanto, encerrando esta etapa, considerou-se que a extração realizada com fluido supercrítico apresentou vantagens relacionadas a uma maior seletividade no que se refere à extração dos componentes citotóxicos de *B. pilosa*.

4.1.2 Presença majoritária de poliacetilenos em SFE

A literatura relata que *B. pilosa* tem sido considerada como uma espécie vegetal de constituição química bastante ampla, fato que é inclusive utilizado pelos pesquisadores na tentativa de justificar a variedade de efeitos terapêuticos que são alegados popularmente para a espécie (GEISSBERGER; SEQUIN, 1991). Há relatos que descrevem a presença em *B. pilosa* de substâncias com atividades diversas àquelas apresentadas nesta presente investigação. Assim, por exemplo, a atividade hepatoprotetora é tradicionalmente reconhecida entre os usos populares de *B. pilosa* e existem artigos científicos que confirmam a presença de constituintes flavonoides citoprotetores e antioxidantes na planta (CHIANG et al., 2004; YUAN et al., 2008; KVIECINSKI et al., 2011a).

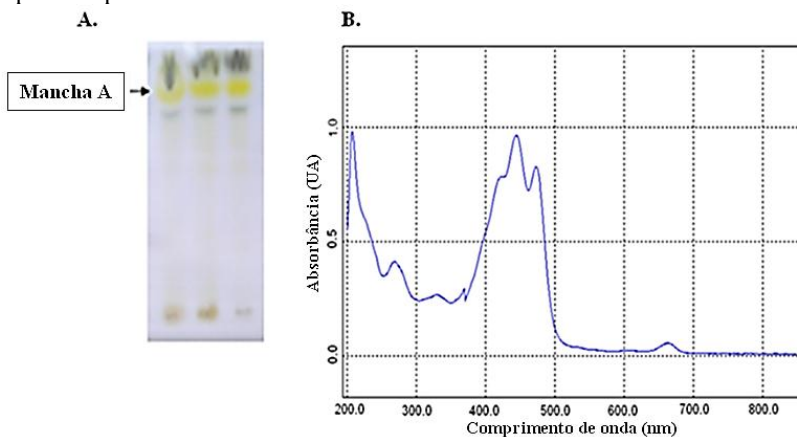
Já os estudos que relatam a atividade citotóxica, parasiticida e antitumoral de extratos ou frações de *B. pilosa*, no geral têm atribuído a responsabilidade destes efeitos aos constituintes poliacetilênicos que normalmente são abundantes na planta (ALVAREZ et al., 1996; BRANDÃO et al., 1997). Como explicado na introdução deste trabalho, o método de extração supercrítica foi estrategicamente selecionado para a obtenção dos poliacetilenos de *B. pilosa*.

Os primeiros achados confirmaram que a atividade citotóxica sobre células MCF-7 havia sido superior ao se administrar o extrato resultante da extração com fluido supercrítico (SFE). Assim, foi deduzido que os compostos majoritários de SFE estariam primariamente relacionados com a toxicidade da planta. O emprego da tecnologia supercrítica havia resultado em extração superior de constituintes citotóxicos. Então, ensaios adicionais sobre SFE foram realizados no sentido de monitorar por métodos fitoquímicos o processo de tecnologia supercrítica, para se buscar a caracterização dos constituintes do grupo de substâncias majoritárias presente neste extrato.

SFE foi submetido à cromatografia semipreparativa em camada delgada combinada às análises espectrofotométricas UV-Vis. Inicialmente, a cromatografia foi realizada em batelada para se avaliar algumas formulações para a constituição de um sistema de fase móvel

eficiente. Definido a fase móvel adequada (AcOEt - H₂CO₂ - AcOH - H₂O/75:5:5:20), as substâncias foram separadas, agrupando-se em basicamente 5 manchas principais A, B, C, D e E, sendo a mancha A amarelada a majoritária (mancha A destacada na figura 17 A). Algumas vezes, foi observado alterações na cor dos constituintes da mancha A, que podem ser resultados da exposição das substâncias purificadas ao tempo ou à luz. Os poliacetilenos podem sabidamente sofrer fotoalterações (WAT et al., 1980). Desta forma, as análises do comportamento de absorção sob varredura espectrofotométrica foram realizadas imediatamente na sequência sob o abrigo da luz, calor, etc. As substâncias da mancha A foram destacadas das placas de cromatografia, seu conteúdo solubilizado em metanol P.A. e após centrifugação, a solução sobrenadante foi utilizada para a obtenção de dados referentes às suas máximas espectrais (HARBORNE et al. 1998). Os resultados são apresentados na figura 17 B, onde é possível observar um espectro com bandas consideradas, por comparação com a literatura, típicas de poliacetilenos (BRANDÃO et al., 1997). Picos de absorção máxima foram registrados na faixa do UV em 208, 269 e 334 nm.

Figura 17 - SFE cromatografado em camada delgada, constituintes majoritários contidos na mancha A (A); Espectro de varredura UV-Vis obtido a partir da solução composta pelas substâncias da mancha A em metanol P.A. com bandas típicas de poliacetilenos.



Fonte: Ensaios de caracterização fitoquímica.

Ao final desta etapa foram obtidos resultados que somados permitem concluir que o método de extração supercrítica pode ser considerado uma operação eficiente que avança no sentido da

purificação de poliacetilenos e foi útil na obtenção de um extrato de *B. pilosa* mais potente em termos de atividade antitumoral *in vitro*. Os resultados sugerem a preservação da funcionalidade dos poliacetilenos extraídos do vegetal pelo método supercrítico. Como indicado na literatura, a funcionalidade destas moléculas deve estar relacionada à presença das triplas ligações carbono-carbono na extensa cadeia de acetilenos dos poliacetilenos (HARBORNE et al., 1998).

4.1.3 Indução de danos sobre o DNA plasmidial

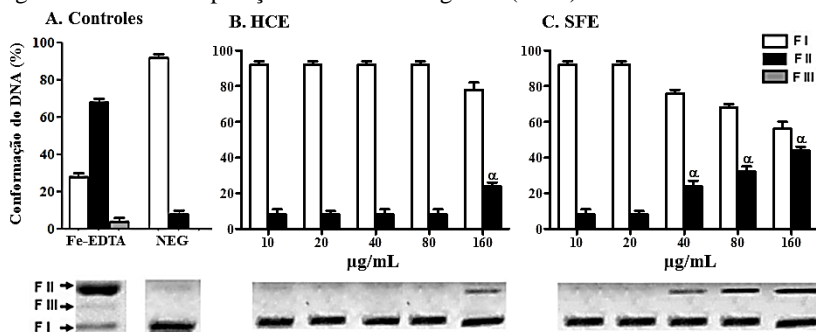
Tendo sido obtidos dados indicativos de citotoxicidade para HCE e SFE de *B. pilosa*, o mecanismo através do qual estes extratos atuam começou a ser avaliado. Entre as várias abordagens possíveis para o estudo do mecanismo da ação citotóxica, de maneira preliminar, foi realizada uma avaliação para detecção *in vitro* de um potencial para induzir danos diretos sobre DNA plasmidial. Alguns autores sugerem que as substâncias capazes de causar danos no DNA podem alterar sua conformação e conseqüentemente seu padrão de migração eletroforética (REY et al., 2009). Estas substâncias podem ter uma atividade nucleásica geradora de estresse sobre o DNA que promove sua clivagem, a qual pode ocorrer por hidrólise e/ou oxidação, entre outras possibilidades (REY et al., 2009). Em princípio, sabe-se que uma vez que o DNA das células é lesionado, os mecanismos que dirigem à morte celular podem ser disparados (TAN et al., 2009).

Os resultados obtidos na avaliação do potencial de HCE e SFE para induzir danos diretos sobre o DNA plasmidial são apresentados na figura 18. Inicialmente, são apresentados os resultados obtidos a partir dos tratamentos realizados para os controles positivo e negativo, respectivamente, para validação deste modelo experimental (Figura 18 A). Fe-EDTA, um agente indutor de danos oxidativos, foi utilizado como controle positivo. O DNA tratado pela solução de Fe-EDTA (20 μ M) apresentou alterações marcantes em termos de padrão de migração eletroforética em comparação ao DNA do controle negativo. A eletroforese do DNA tratado por Fe-EDTA possibilitou averiguar o predomínio da conformação FII, resultado de rupturas simples na estrutura em dupla hélice do DNA e também a presença da conformação planar FIII, resultado de extenso dano em ambas às fitas do DNA.

No DNA tratado somente com o veículo inerte para o controle negativo, foi evidenciado o predomínio da conformação FI de DNA intacto (Figura 18 A). Já na figura 18 (B e C), os gráficos ilustram o

padrão de migração do DNA plasmidial encontrado após o tratamento com HCE ou SFE, respectivamente. Mais uma vez, foi possível perceber que ambos os extratos apresentaram alguma toxicidade. Os dados apresentados na figura 18 (B) demonstram que HCE foi capaz de causar algum nível de dano sobre o DNA somente detectável na concentração mais alta testada deste extrato (160 $\mu\text{g/mL}$), quando houve indução de aumento em termos de DNA na forma FII, com diferença estatística em comparação ao DNA do controle negativo (Figura 18 B). Por outro lado, os dados apresentados no gráfico da figura 18 (C) demonstram que, embora mais uma vez a conformação FIII não tenha sido alcançada, SFE aplicado na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ foi suficiente para induzir danos sobre o DNA, quando comparado ao controle negativo. A partir desta concentração, o dano ao DNA elevou-se proporcionalmente ao aumento da concentração de SFE (Figura 18 C). Estes resultados, mais uma vez demonstram a validade do método de extração com fluido supercrítico na obtenção dos compostos de *B. pilosa* mais tóxicos. Se tomado por base os efeitos observados no teste do potencial indutor de danos sobre o DNA plasmidial, mais uma vez é possível deduzir que SFE apresentou toxicidade superior quando comparado àquela apresentada por HCE.

Figura 18 – Efeito dos tratamentos feitos com o extrato hidroetanólico HCE e extrato supercrítico SFE de *B. pilosa* (10 – 160 $\mu\text{g/mL}$) sobre o DNA plasmidial. Primeiramente, o efeito dos controles, Fe-EDTA (20 μM), utilizado para o controle positivo, causa danos sobre o DNA plasmidial. Por outro lado, a conformação FI é predominante no DNA tratado para o controle negativo (NEG) (painel A). Os níveis de danos no DNA plasmidial causados pelo HCE e SFE, respectivamente (painéis B e C). (α) denota diferença estatística significativa em comparação ao controle negativo (NEG).



Fonte: Ensaio de dano ao DNA plasmidial.

A capacidade de alguns poliacetilenos de ocorrência natural e α -tertienila para induzir danos citogenéticos já foi avaliada anteriormente. Em um estudo realizado por MacRae et al. (1980), α -tertienila e outros 5 poliacetilenos foram avaliados por uma atividade lesiva sobre os cromossomos em células de *hamsters Syrian*. Nenhum destes compostos foi capaz de induzir o câmbio de cromátides irmãs ou mesmo induzir aberrações cromossômicas (mutações). Em um estudo posterior, três poliacetilenos purificados de *Panax ginseng* C.A. Meyer, nominalmente o panaxidol, panaxinol e panaxitriol foram avaliados pelo mecanismo de ação citotóxica em células L1210 de leucemia linfocítica de camundongos. Neste estudo, foi constatado que os poliacetilenos induziram à inibição da síntese do DNA de maneira dose-dependente (KIM et al. 1989). Assim, a partir da avaliação da indução dos danos sobre o DNA plasmidial tratado por HCE e SFE, rico em poliacetilenos de *B. pilosa*, pode-se sugerir que, adicionalmente, os poliacetilenos podem causar danos no DNA por meio de quebras de suas fitas.

4.1.4 Atividade antitumoral *in vivo* dos extratos de *B. pilosa*

O tumor ascítico de Ehrlich é um carcinoma que foi desenvolvido para a forma ascítica por Loewenthal e Jahn em 1932, a partir de uma das várias linhagens do carcinoma de Ehrlich que surge de tumores epiteliais espontâneos, provavelmente originados de glândulas mamárias (GUPTA et al., 2000). Ele cresce rapidamente, apresenta um comportamento muito agressivo, e tem sido amplamente citado na literatura, para investigar propriedades antitumorais de vários novos agentes (AJITH; JANARDHANAN, 2003).

A atividade antitumoral *in vivo* dos extratos de *B. pilosa* foi avaliada comparativamente em camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Quando células do carcinoma de Ehrlich são inoculadas no abdome dos animais, isto leva ao desenvolvimento rápido e regular de um tumor ascítico. Em camundongos portadores de tumor ascítico, o líquido ascítico é considerado a fonte nutricional direta para a manutenção das células tumorais. Neste líquido, há uma variedade de fatores de crescimento e nutrientes necessários para a sobrevivência das células tumorais e sua proliferação. O líquido é o meio onde as células do carcinoma crescem em suspensão (PRASAD; GIRI, 1994). Desta forma, é esperado que a medida do volume de líquido ascítico possa dar uma ideia acerca da requisição e do estado nutricional das células e da disponibilidade de nutrientes. Já a medida do volume de células

compactadas, que pode ser determinado a partir da centrifugação de amostras ou da quantidade total do fluido, pode servir no sentido de indicar o real tamanho do tumor. Neste caso, em geral é de se esperar que a atividade antitumoral de um produto promissor deva induzir à diminuição de ambas as medidas comentadas e conseqüentemente à redução também do ganho de peso e da medida da circunferência abdominal dos animais. A indução ao ganho de peso e aumento da circunferência abdominal por parte do TAE é tão forte que, mesmo que exista um comprometimento motor que finalmente leva a uma diminuição no consumo de alimento e, talvez também de água, mesmo assim, os animais não tratados do controle negativo elevam ao máximo essas medidas, até chegar a um ponto letal, onde a morte ocorre em decorrência da doença. Na Tabela 1, pode-se notar que todas essas prerrogativas foram observadas neste experimento, sendo que com diferenças em comparação ao grupo controle normal, os animais do grupo controle negativo demonstram marcado ganho de peso, aumento da circunferência abdominal e presença de ascite. Por outro lado, pode-se ainda observar na tabela que a melhora induzida pelo quimioterápico convencional doxorrubicina (DOX) e os tratamentos-teste (HCE e SFE) foram capazes de inibir essas mesmas medidas (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito dos tratamentos realizados com os extratos de *B. pilosa* (HCE ou SFE, 100 mg/kg) ou doxorrubicina (DOX, 0,06 mg/kg) em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich e controles. Controle normal (CN), controle negativo (NEG). Dados expressos pela média \pm DP, n = 6. (^a) diferença estatística, comparado à NEG e (^b) comparado à HCE ($p < 0,05$). TMS: Tempo médio de sobrevivência; PAL: Percentual de aumento na longevidade, n=6.

Parâmetro/Grupo	CN	NEG	HCE	SFE	DOX
Ganho de peso (g)	1 \pm 1	8 \pm 1	7 \pm 2	5 \pm 1 ^a	3 \pm 1 ^{ab}
Aumento da circunferência abdominal (cm)	< 1	4 \pm 1	1 \pm 1 ^a	1 \pm 1 ^a	< 1 ^{ab}
Fluido ascítico (mL)	-	10 \pm 1	7 \pm 1 ^a	4 \pm 1 ^{ab}	2 \pm 1 ^{ab}
Células tumorais (mL)	-	4 \pm 1	2 \pm 1 ^a	1 \pm 1 ^a	< 1 ^{ab}
Células não-viáveis/viáveis	-	< 1	< 1	1 \pm 1 ^{ab}	2 \pm 1 ^{ab}
TMS (dias)	30	13	15 ^a	17 ^{ab}	20 ^{ab}
PAL (%)	100	0	15 ^a	31 ^{ab}	54 ^{ab}

Fonte: Ensaios *in vivo*.

Sendo observados primeiro os dados da histomorfologia dos animais, pode-se afirmar que ambos os tratamentos (HCE e SFE) tiveram algum efeito com base na avaliação do aumento da medida da circunferência abdominal que foi achada diminuída, tendo sido causado

também, por ambos os tratamentos, uma diminuição no aumento do volume de líquido ascítico e de células compactadas com diferença estatística significativa em comparação aos dados obtidos no grupo controle negativo (Tabela 1). Agora comparando as atividades apresentadas somente pelos dois extratos testados, percebe-se que a atividade do tratamento com SFE foi maior, se levado em conta que ele foi o único capaz de causar diminuição no ganho de peso corporal dos animais e aumentar a proporção de células inviáveis/viáveis com diferença estatística significativa, comparado ao grupo controle negativo. Em animais tratados com SFE, o desenvolvimento de fluido ascítico foi inferior (Tabela 1/Figura 19). A atividade apresentada por SFE revelou-se mais próxima daquela apresentada pelo controle positivo doxorubicina (Tabela 1/Figura 19).

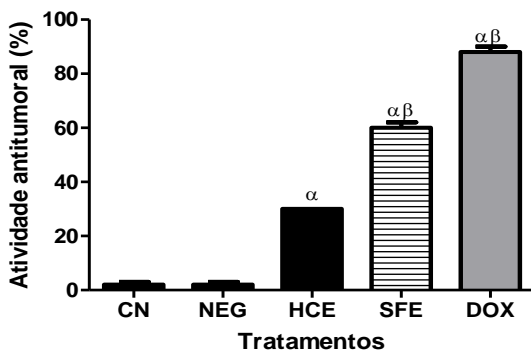
Para a avaliação dos resultados que concernem aos efeitos dos tratamentos sobre o tempo de sobrevida dos animais portadores de TAE, é importante apresentar primeiro o ponto de vista de alguns outros pesquisadores, como por exemplo, Clarkson e Burchenal (1965). Estes autores consideraram que a avaliação do efeito de um tratamento experimental, quanto à sua eficácia para induzir aumento no tempo de duração da sobrevida de animais, pode configurar-se como um critério dos mais confiáveis para se julgar o valor de qualquer fármaco antitumoral em potencial. Analisando os dados obtidos, pode-se perceber que novamente ambos os tratamentos (HCE e SFE) apresentaram algum efeito. No grupo do controle negativo, uma vez induzido o tumor, a primeira morte foi registrada no dia 11. A partir daí os camundongos começaram a morrer gradativamente, sendo a última morte registrada no dia 15. Sendo assim, o TMS determinado para o grupo controle negativo foi 13 dias (Tabela 1). O tratamento feito com HCE aumentou o TMS de 13 para 15 dias, enquanto que o tratamento feito com SFE aumentou o TMS para 17 dias. Por consequência, o PAL determinado a partir dos dados obtidos do grupo de animais tratados com HCE foi igual a 15%, enquanto que no grupo de animais tratados pelo SFE foi igual a 31%. Contudo, nenhum dos tratamentos experimentais foi capaz de induzir a presença de animais sobreviventes em longo prazo (*long term survivors*).

Desta maneira, os dados apresentados anteriormente quando avaliados em conjunto permitem afirmar que o tratamento com SFE de *B. pilosa* foi mais promissor com respeito à atividade antitumoral, apresentando vantagens em termos de eficácia verificadas *in vitro* e *in vivo*, em comparação ao tratamento feito à base de HCE. Possivelmente,

os compostos responsáveis por esta atividade farmacológica pertencem à classe dos poliacetilenos.

Sendo utilizado este mesmo modelo experimental, Kwiecinski et al. (2008) demonstraram anteriormente de maneira inédita que HCE de *B. pilosa* apresentou atividade antitumoral significativa em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich. Neste sentido, considerando agora comparativamente os dados da inibição do crescimento do tumor *in vivo* induzidos pelos tratamentos feitos com HCE e SFE de *B. pilosa*, fica claro que esta investigação avançou, uma vez que demonstrou que o tratamento feito com o extrato de *B. pilosa* obtido com fluido supercrítico apresenta vantagens, levando a uma inibição superior, mais próxima àquela induzida pela doxorrubicina (Figura 19).

Figura 19-Atividade antitumoral (%) dos tratamentos feitos com doxorrubicina, SFE ou HCE em camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich, com base no volume de fluido ascítico. Controle normal (CN), controle negativo (NEG). (^α) diferença estatística comparado à NEG e (^β) comparado à HCE ($p < 0,05$), $n=6$.



Fonte: Ensaios *in vivo*.

Os resultados apresentados até aqui foram publicados no periódico *The Journal of Supercritical Fluids*, volume 56, páginas 243 a 248 (2011), sob o título *SFE from Bidens pilosa Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity*. DOI: 10.1016/j.supflu.2010.12.011 (Anexo A).

4.2 Atividade antitumoral da juglona e sua associação com ascorbato de sódio

A principal vantagem da utilização de células T24 talvez se relacione com a rapidez com que elas dividem-se, o que leva a uma pronta disponibilização das mesmas para a pesquisa (tempo de duplicação de cerca de 20h). Mais além, as células T24 são invasivas e derivadas de células transicionais do urotélio humano, sendo assim adequadas para a realização de estudos de proliferação celular e invasão.

O câncer de bexiga é um tipo de câncer urológico de elevada incidência. Quase todos os tumores de bexiga originam-se no urotélio que é uma mucosa de 3 a 7 camadas de células, intimamente ligada ao tecido muscular da bexiga. Na América do Norte, América do Sul, Europa e Ásia, o tipo mais comum de tumor urotelial diagnosticado é o carcinoma de células transicionais sendo que mais de 90% dos tumores de bexiga são deste tipo (PRASAD et al., 2011).

De acordo com o instituto americano *National Cancer Institute* (NCI), os fármacos aprovados até o presente momento para o tratamento do câncer de bexiga são: a doxorrubicina e seus derivados (antraciclina) ou derivados da platina (cisplatina). No entanto, é fato que o emprego de ambas as classes de fármacos apresenta sérias limitações. Considerando a questão de seu emprego terapêutico, pode-se dizer que ambas as classes apresentam sérios efeitos colaterais. A administração de doxorrubicina está intimamente relacionada com indução de cardiotoxicidade, já a administração tanto de doxorrubicina como de cisplatina está associada com o desenvolvimento de resistência multifármacos, perda de cabelos e de peso, problemas com a respiração, supressão hematopoiética e leucemia secundária, entre outros (PENG et al., 2010; OCTAVIA et al., 2012). Também se sabe, que quando se considera a questão dos problemas devidos aos resíduos desses fármacos no meio ambiente, que eles são consideravelmente persistentes no solo, o que de acordo com as informações apresentadas a seguir é diferente do que ocorre no caso da juglona (KHETAN; COLLINS, 2007).

A juglona pertence à mesma classe química da doxorrubicina (quinonas/antraciclina), também por este motivo seus efeitos foram medidos frente às células T24. Pode-se sugerir que esta incursão pode representar a disponibilidade de um novo medicamento, ou molécula protótipo, de ação semelhante ou superior que, no futuro, poderia ser selecionada uma vez que se trata de uma proposta mais sustentável, uma vez que muitas preocupações associadas com os quimioterápicos estão associadas a sua elevada toxicidade. A demanda por estes produtos

farmacêuticos continua a aumentar e, conseqüentemente a poluição originada por eles pode se constituir numa ameaça ambiental (KHETAN; COLLINS, 2007). É realmente pouco provável que um medicamento seja banido por ser muito tóxico ou não biodegradável, mas é importante o desenvolvimento de soluções tecnológicas atrativas e permitir os investigadores explorá-las na tentativa de se alcançar um futuro mais sustentável. A missão mais importante da indústria farmacêutica é a proteção da saúde, então é concebível que este segmento deva se preocupar com desenvolvimento autossustentável (KHETAN; COLLINS, 2007; CANNON; WARNER, 2011).

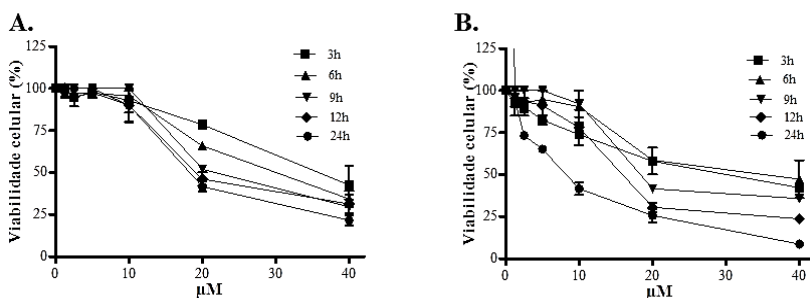
Como explicado na introdução, a juglona primeiramente é extraída de espécies do gênero *Juglans sp.* (AITHAL et al., 2009). Já a juglona comercial é obtida principalmente por oxidação do naftaleno (WILBUR; SUBLETT, 1977). Como também já explicado na seção materiais e métodos, um processo inovador sustentável de fotoquímica verde já foi relatado, sendo aqui utilizado para síntese da juglona (OELGEMÖLLER et al., 2005). Neste processo, a reação clássica de oxidação feita como o emprego de cloreto de cobre e acetonitrila (YAMASHITA et al., 2009) é substituída por foto-oxigenação com os reagentes verdes luz solar e oxigênio atmosférico para render uma juglona com menos resíduos químicos. O método de fotoquímica significa redução em termos de custos e degradação da natureza, enquanto apresenta um bom rendimento. Na possibilidade, na qual os estudos finalmente justificarem o uso da juglona para o tratamento de alguns tipos de câncer, as vantagens também irão estar relacionadas aos padrões de degradação deste princípio ativo.

A juglona é relativamente fotossensível, devendo ser bem protegida para sua utilização farmacológica. Dados disponíveis já demonstraram que esta quinona, extensivamente estudada como uma toxina de origem vegetal com atividade alelopática de amplo espectro, capaz de controlar o desenvolvimento de muitos organismos aquáticos, possui tempo de meia vida relativamente curto em águas salinas ($t_{1/2} < \text{ou} = 30\text{h}$) e apresenta risco baixo de toxicidade residual associado à liberação de água tratada com juglona (WRIGHT et al., 2007). Mais além, dados de experimentos de recuperação da juglona sugerem que ela não pode persistir muito tempo no solo devido à presença de alguns microrganismos parcialmente responsáveis por sua degradação (SCISCIOLO et al., 1990; CURRELI et al., 2004).

4.2.1 Citotoxicidade *in vitro*

A citotoxicidade da juglona sobre as células T24 é apresentada na figura 20 (A). As células tratadas com juglona exibiram uma capacidade diminuída, de maneira dependente da concentração, para reduzir o MTT. Ou seja, a juglona apresenta citotoxicidade dependente da concentração sobre células T24 (Figura 20 A). Consequentemente, o valor de CI_{50} estimado para juglona após 24 h de incubação foi 28,5 μM . Por outro lado, um efeito citotóxico mais acentuado foi observado quando as células foram tratadas com juglona em associação ao ascorbato 1 mM (Figura 20 B). Sob as mesmas condições experimentais, o valor de CI_{50} da juglona diminuiu para 6,3 μM , quando ela foi administrada em associação ao ascorbato 1 mM.

Figura 20 - Viabilidade celular de células T24 incubadas por 3, 6, 9, 12 ou 24h com juglona em diferentes concentrações (0 a 40 μM) (A) ou associada ao ascorbato 1 mM (B). Resultados obtidos pela média de 3 experimentos independentes.

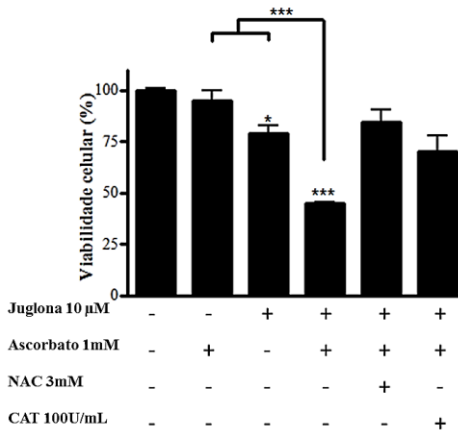


Fonte: Ensaios do MTT de citotoxicidade *in vitro*.

Ainda na figura 21, mais uma vez está ilustrado o efeito citotóxico da juglona 10 μM e ascorbato 1 mM administrados separadamente ou em associação por 24 h sobre células T24. Neste estudo, foi achado que a concentração de 1 mM de ascorbato, embora seja elevada, ainda é inócua para estas células, sob incubação de 24 h (Figura 21). A partir dos dados da figura 21, torna-se claro que existe potencialização em termos de citotoxicidade da juglona devido sua associação com o ascorbato. A citotoxicidade da associação, às 24 h de exposição aos tratamentos, foi encontrada como sendo superior em comparação ao efeito da juglona 10 μM ou ascorbato 1 mM, administrados separadamente.

Na figura 21, estão apresentados também dados que demonstram que a administração concomitante de antioxidantes, como NAC ou CAT, sobre células tratadas por juglona 10 μM em associação ao ascorbato 1 mM resultou em proteção celular, o que coloca em evidência o papel do estresse oxidativo relacionado à citotoxicidade da juglona e ascorbato. Como será explicado nos próximos parágrafos, já existem algumas evidências que indicam que a indução à geração aumentada de EROs intracelulares e o estresse oxidativo são esperados para dar base mecânica à citotoxicidade da juglona.

Figura 21 - A viabilidade de células T24 incubadas por 24 h com juglona 10 μM e ascorbato 1 mM, administrados separadamente ou em associação, e a viabilidade das células quando o meio de cultura com juglona e ascorbato foi suplementado com N-acetilcisteína (NAC) 3 mM ou catalase (CAT) 100 U/mL. Resultados obtidos pela média de 3 experimentos independentes. * e *** representam diferença estatística quando comparado ao controle negativo ou tratamentos indicados, quando $p < 0,05$ e $0,001$, respectivamente.



Fonte: Ensaio do MTT de citotoxicidade *in vitro*.

Embora este trabalho tenha demonstrado pela primeira vez a citotoxicidade *in vitro* da juglona sobre células T24, a citotoxicidade desta quinona já foi relatada sobre um painel representativo de células tumorais humanas incluindo hepatoma HepG2 (BABICH; STERN, 1993), HL-60 (leucemia), MDA-MB-435 (melanoma), SF295 (glioblastoma), HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal) (MONTENEGRO et al., 2010), A2780 (carcinoma ovariano), HeLa (cervical uterino),

SW1573 (tumor de pulmão), T-47D (tumor no epitélio dos ductos de mama) e WiDr (carcinoma de cólon) (BONIFAZI et al., 2010).

Durante as últimas décadas, esforços consideráveis têm sido feitos no sentido de se entender o mecanismo adjacente da toxicidade de compostos derivados de naftquinonas, como é o caso da juglona. Duas características principais são geralmente aceitas como críticas para a citotoxicidade das mesmas: a) a capacidade de gerar EROS e b) a eletrofilicidade apresentada por algumas naftoquinonas, que as capacita a formar adutos junto a alguns constituintes celulares. Öllinger e Brunmark (1991) avaliaram a eletrofilicidade da 1,4-naftoquinona e de alguns derivados hidroxilados, tendo sido detectada baixa eletrofilicidade para juglona. Uma vez que a juglona foi caracterizada como sendo dotada de baixa eletrofilicidade, é de se esperar que seu mecanismo de ação citotóxica esteja mais associado à primeira situação descrita pelos autores citados, ou seja, devido a uma capacidade de gerar EROS, fato confirmado mais tarde por Aithal et al. (2009) que avaliou o efeito da juglona sobre células de melanoma B16F1.

A partir dos trabalhos de Öllinger e Brunmark (1991) e Aithal et al. (2009), a citotoxicidade da juglona passou a ser associada primariamente com sua capacidade de induzir estresse oxidativo celular. Em geral, as células cancerosas, usualmente são deficitárias no que se refere às defesas antioxidantes, assim devem ser preferivelmente induzidas à morte, em detrimento das células normais. Por outro lado, ainda no que se refere à citotoxicidade da juglona, não é possível deixar de mencionar que também já apareceram estudos que demonstraram que é justamente devido à toxicidade que a utilização de juglona para qualquer tratamento irá necessitar de cuidados, como deve ocorrer com qualquer outro fármaco. Assim a juglona também pode apresentar riscos toxicológicos importantes.

Seshadri et al. (2011) já demonstraram que a juglona, a depender da dose, pode atacar linfócitos do sangue periférico, a citotoxicidade da mesma também já foi observada sobre células normais como queratinócitos HaCaT (INBARAJ; CHIGNELL, 2004), fibroblastos de camundongos (BABICH; STERN, 1993) e hepatócitos de rato (d'ARCY DOHERTY et al., 1987; ÖLLINGER; BRUNMARK, 1991). A juglona também pode causar degradação do P53 (PAULSEN; LJUNGMA, 2005). No desenvolvimento desta investigação, estes achados foram motivo de considerações, mas de maneira alguma serviram para desencorajar esta pesquisa. Primeiro porque notavelmente, em princípio, todas estas ações também foram apresentadas por outros fármacos quinóides de sucesso terapêutico, como por exemplo, a doxorubicina,

que hoje é utilizada na clínica para combater uma variedade de tumores maior do que qualquer outro tipo de quimioterápico (WEISS, 1992; MINOTTI et al., 2004). Também porque foi considerado, que mesmo dadas as suas limitações, a juglona ainda apresenta um potencial antitumoral a ser explorado. O entendimento acerca destes efeitos colaterais, na verdade, instigou ainda mais o interesse pelo resultado da associação da juglona e o ascorbato no tratamento do câncer, como será mais bem explicado a partir de agora até o final desta seção.

A juglona empregada neste estudo tem a vantagem de ter sido obtida por química verde. Mais além, a potencialização de seu efeito via associação ao ascorbato representa uma forma de reduzir potencialmente seus efeitos colaterais, lembrando que os resultados deste estudo demonstraram que desta forma, uma citotoxicidade para célula tumoral equivalente pode ser alcançada pelo uso da juglona em doses até 5 vezes menores.

4.2.2 Tipo de morte celular induzida

Considerando as informações já disponíveis na literatura, quanto ao tipo de morte celular induzido pela juglona, o que se pode perceber é que o resultado final do tratamento parece ser dependente da linhagem celular exposta, que varia em termos de sensibilidade, e outros fatores como concentração de fármaco e tempo de exposição. A juglona induziu as seguintes células humanas à apoptose:

- Células de câncer gástrico SGC-7901 tratadas com juglona (5,10, 15 e 20 μM) por 24 h (JI et al., 2011);
- Células de leucemia HL-60 tratadas com juglona (0,5 – 1,5 $\mu\text{g/mL}$, ou ~ 2,5- 8,5 μM) por 24 h (XU et al., 2010);
- Células de adenocarcinoma alveolar A549 tratadas com juglona (2,5 – 35 μM) por 24, 48 e 72 h (ZOU et al., 2010).

Contudo, a indução à necrose foi observada quando a juglona (5 – 10 μM por 12 ou 24 h) foi utilizada no tratamento de células de melanoma B16F1 (AITHAL et al., 2009).

No presente trabalho, o tratamento à base de juglona e juglona em associação ao ascorbato 1 mM sobre células T24 foi examinado avaliando-se dois marcadores de apoptose, a atividade das caspases e a clivagem da proteína PARP, juntamente com a morfologia das células tratadas.

4.2.2.1 Atividade das caspases

Embora já se tenha descrito algum mecanismo de apoptose independente de caspases, no geral, se aceita que a atividade das caspases é uma marca presente em células em processo apoptótico (DEGTEREV; YUAN, 2008). Considerando a ativação das caspases, os resultados obtidos e apresentados na Tabela 2 foram os seguintes: Células T24 tratadas somente com o veículo inerte para o controle negativo apresentaram valores de atividade das caspases equivalentes a 2 ± 1 U/mg, relativo a um nível basal de atividade enzimática. Por outro lado, células tratadas com sanguinarina $5 \mu\text{M}$ (4 h), para o controle positivo, apresentaram atividade de caspases aumentada, cujos valores alcançaram 95 ± 8 U/mg. Agora, considerando os tratamentos-teste, de acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que tanto células tratadas com juglona (0-10 μM) ou ascorbato 1 mM, administrados separadamente ou associados, não apresentaram elevação da atividade das caspases, sendo os valores encontrados resultantes de ambos os tratamentos (6 ou 24 h) equivalentes a 2-3 U/mg, não havendo então diferença estatística quando comparado aos valores do controle negativo. Sendo assim, foi obtido um primeiro indicador sobre o tipo de morte celular induzido pelo tratamento à base de juglona e ascorbato sobre células T24, o qual não envolvia a atividade das caspases (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade das caspases (caspase 3, principalmente) em células T24 tratadas com juglona (0 - 10 μM) ou ascorbato 1 mM, administrados separadamente ou associados por 6 e 24 h. Resultados expressos pela média do resultado de 3 experimentos \pm desvio padrão. (*) representa diferença estatística, comparado ao controle negativo, quando $p < 0,001$.

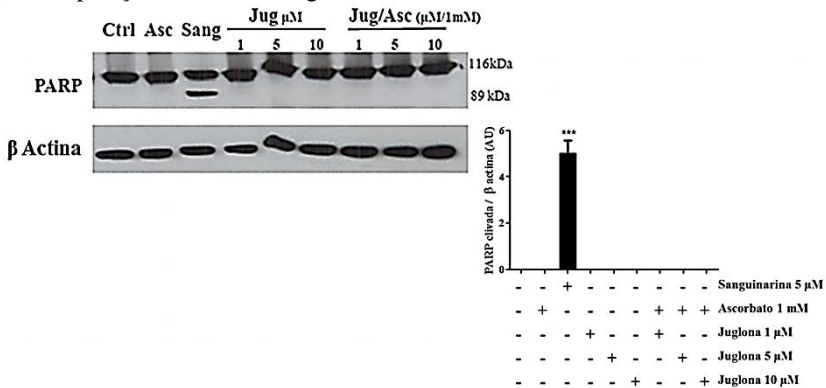
	Tratamento 6 h	Tratamento 24 h
Células não-tratadas	$1,0 \pm 1,0$ U/mg	$2,0 \pm 1,0$ U/mg
Juglona 10 μM	$2,0 \pm 1,0$ U/mg	$2,0 \pm 1,0$ U/mg
Juglona 10 μM + Ascorbato 1 mM	$2,5 \pm 1,0$ U/mg	$3,0 \pm 1,0$ U/mg
	Tratamento 4 h	
Sanguinarina 5 μM	95 ± 8 U/mg***	

Fonte: Ensaio espectrofluorimétrico.

4.2.2.2 Clivagem da PARP

Realizados os devidos tratamentos (veja figura 22), a clivagem da proteína PARP foi avaliada por imunoelectroforese (*Western blot*) e seus resultados estão apresentados na figura 22. A PARP, como explicado na seção de introdução, é uma enzima nuclear de reparo abundante que é ativada por danos nas fitas do DNA. Ocorrido uma quebra, a PARP liga-se rapidamente à fita acometida do DNA pelo seu domínio ligante N-terminal e utiliza NAD^+ para sintetizar poli (ADP-ribose) sobre uma variedade de proteínas nucleares envolvidas no metabolismo e reparo do DNA, como por exemplo, DNA polimerases. Sabe-se que a PARP é clivada pela atividade das caspases durante apoptose (KIM et al., 2000). Considerados os resultados desta avaliação (Figura 22), pode-se perceber que a clivagem da PARP de peso molecular 116 kDa, correspondente a proteína íntegra, para um fragmento clivado de cerca de 89 kDa só foi encontrada em células tratadas com sanguinarina (5 μM por 4 h). A clivagem da PARP não foi observada em células tratadas por juglona com ou sem ascorbato, evidenciando mais uma vez, a inatividade das caspases durante o processo de morte induzido por estes tratamentos (Figura 22).

Figura 22-Imunoelectroforese para detecção da clivagem da proteína PARP em homogenato total de células T24 tratadas por 4 h com juglona (Jug) (1-10 μM) e/ou ascorbato 1 mM (Asc). Sanguinarina (Sang) 5 μM foi utilizada como controle positivo de ativação das caspases. Ilustrações representativas para o resultado de 3 experimentos independentes. (***) denota diferença estatística em comparação ao controle negativo.

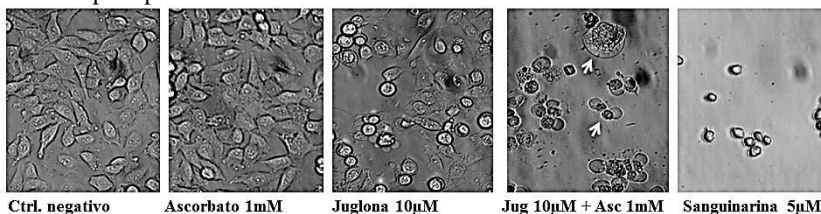


Fonte: Ensaio de imunoelectroforese.

4.2.2.3 Morfologia das células em processo de morte

Em uma instância subsequente, ainda na busca por evidências indicativas do tipo de morte celular induzido pela juglona e ascorbato, a morfologia das células tratadas foi avaliada por microscopia e os resultados deste estudo são apresentados na figura 23.

Figura 23 - Morfologia das células T24 incubadas por 24 h com ascorbato 1 mM ou juglona 10 μ M separadamente ou associados. Aumento de 400x sob o microscópio óptico.



Fonte: Morfologia por microscopia.

As imagens das células tratadas somente com o ascorbato 1 mM revelam uma morfologia não distinta daquela observada nas imagens do controle negativo, evidenciando uma baixa citotoxicidade para o ascorbato 1mM, mesmo após 24 h de incubação. Mais uma vez, as células foram tratadas com sanguinarina 5 μ M (4 h), para o controle positivo de apoptose, sendo que o resultado deste tratamento foram células picnóticas, ou seja, células de tamanho diminuto, com forma diferente daquela observada em células do controle negativo. Células tratadas com juglona 10 μ M por até 24 h exibiram morfologia diferente quando comparada às células do controle negativo. O mesmo acontecendo com a morfologia das células tratadas pela associação juglona 10 μ M e ascorbato 1 mM, além disto, estas células apresentaram forma claramente distinta daquela observada nas células do controle positivo. Os dados apresentados até aqui descartam o envolvimento de um mecanismo putativo causador de morte celular dependente de caspase induzido pela juglona e ascorbato sobre as células T24. Portanto, a participação da apoptose no processo. Ao invés disto, eles levam a sugerir um mecanismo de ação provavelmente associado com a necrose. Desta forma, estes resultados corroboram os achados de Aithal et al. (2009), que demonstraram a necrose induzida pela juglona sobre células de melanoma B16F1. Fila et al. (2008) observaram que o tratamento (3 h) à base de juglona sobre células CHO, feito sob uma

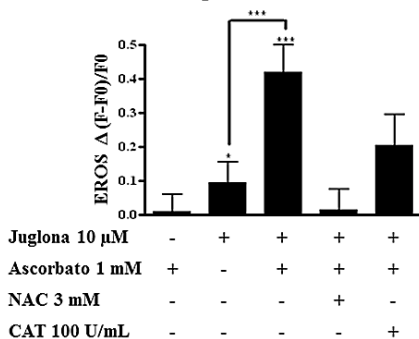
faixa de concentração inferior a 10 μM induz a apoptose, ao passo que concentrações mais altas podem iniciar necrose. As células CHO conformam uma linhagem de células de ovário de *hamster* chinês consideradas equivalentes eucarióticas de *E. coli*.

4.2.3 Participação do estresse oxidativo na citotoxicidade da juglona e sua associação com ascorbato

4.2.3.1 Geração de EROs aumentada

Os dados apresentados na figura 24 referem-se aos efeitos da juglona ou sua associação com ascorbato sobre a geração de radicais livres em células T24 tratadas.

Figura 24 - Conteúdo celular de EROs em células T24 determinado após 2 h de incubação com os referidos produtos. Os dados ilustrados na figura são resultado da média de 3 experimentos independentes. * e *** representam diferença estatística quando comparado ao controle negativo ou tratamentos indicados, quando $p < 0,05$ e $0,001$, respectivamente.



Fonte: Ensaio da diclorofluoresceína.

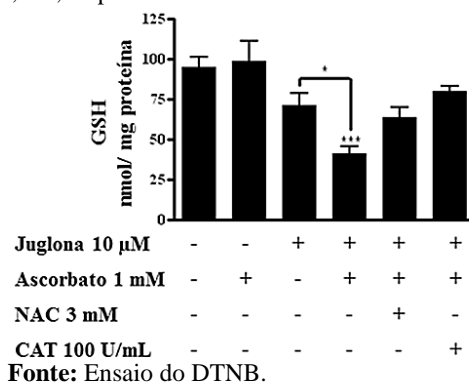
É possível observar que a incubação das células (2 h) em meio contendo somente ascorbato 1 mM não causou uma indução significativa da geração de EROs. Por outro lado, o tratamento feito pelo mesmo período de tempo com juglona 10 μM induziu a um aumento na geração de EROs, cujo conteúdo foi encontrado diferente estatisticamente quando comparado ao controle negativo, sendo aumentado em até 2 vezes. Por outro lado, como está ilustrado na figura

24, a adição de ascorbato 1 mM ao meio das células incubadas com juglona 10 μ M causou um aumento na geração de EROS de cerca de 4 vezes quando comparado ao conteúdo de EROs presente nas células tratadas somente com juglona. Já a adição de antioxidantes como NAC ou CAT restringiu de forma significativa esta hipergeração (Figura 24), sugerindo fortemente o efeito pró-oxidante desta quinona. Aithal et al. (2009) já haviam demonstrado que o tratamento à base de juglona (1 h) induziu a uma maior geração de EROs em células de melanoma B16F1, de maneira concentração-dependente. De forma interessante, esta investigação demonstrou, pela primeira vez, o efeito indutor da geração de EROs ocorrendo de maneira sinérgica devido ao tratamento feito pela associação juglona e o ascorbato.

4.2.3.2 Indução ao consumo de GSH

Como o objetivo de se confirmar a implicação de um estresse oxidativo induzido na citotoxicidade da associação juglona e ascorbato, o conteúdo de GSH foi avaliado em células T24 incubadas por 3 h com os respectivos tratamentos descritos na figura 25.

Figura 25 - Conteúdo de GSH em células T24 após 3 h de incubação com os respectivos tratamentos. Os dados ilustrados na figura são resultado da média de 3 experimentos independentes. * e *** representam diferença estatística, quando comparado ao controle negativo ou tratamentos indicados, quando $p < 0,05$ e $0,001$, respectivamente.



Anteriormente, mais uma vez Aithal et al. (2009) já haviam relatado que o tratamento à base de juglona causa estresse oxidativo em

células B16F1 em cultura, causando uma redução no conteúdo de GSH celular dependente da concentração. De acordo com os dados ilustrados na figura 25, a incubação (3 h) de células T24 em meio contendo somente ascorbato 1 mM ou juglona 10 μ M não foi suficiente para gerar diferenças em termos de conteúdo de GSH, quando comparado ao controle negativo, em células T24. No entanto, de forma distinta, uma diminuição significativa no conteúdo de GSH foi observada quando as células foram tratadas pela associação juglona e ascorbato, cerca de 65% de redução em comparação aos níveis médios encontrados no controle negativo. Mais uma vez, a adição de agentes antioxidantes como NAC ou CAT, concomitante a este tratamento, foi capaz de restringir seus efeitos, resultando em preservação parcial do conteúdo de GSH (Figura 25).

4.2.4 Danos ao DNA causados pela juglona e sua associação com ascorbato

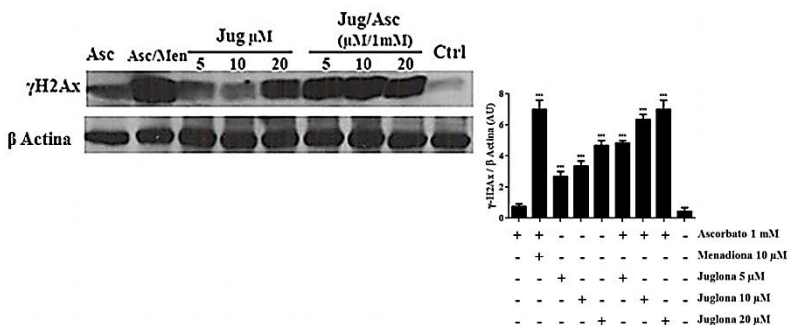
A ocorrência de fosforilação da histona tipo H2Ax na serina 139, nominalmente gama-H2Ax, tem sido amplamente utilizada como um marcador sensível de danos sobre o DNA na forma de quebras duplas de sua fita. A gama-H2Ax é requerida por muitas proteínas de resposta ao dano de DNA que atuam sobre a quebra dupla. Assim, a gama-H2Ax tem sido considerada a principal proteína sinalizadora envolvida na resposta ao dano sobre o DNA e desempenha papel importante no seu reparo (YUAN et al., 2010).

Como ilustrado na figura 26, de acordo com a ocorrência da fosforilação da histona H2Ax, o tratamento de células T24 com juglona resultou em dano sobre o DNA, evento nítido a partir do momento em que as células foram tratadas com juglona 20 μ M por 4 h. O tratamento feito da mesma maneira empregando apenas ascorbato 1 mM, aparentemente não provocou alterações consideráveis em termos de danos ao DNA celular. No entanto, a partir do momento em que o ascorbato 1 mM passou a ser administrado em associação com a juglona, 5 μ M de juglona foram claramente suficientes para causar um dano no DNA equivalente àquele causado pela juglona pura 20 μ M. Ou seja, uma vez associada ao ascorbato 1 mM, o potencial da juglona para causar danos sobre o DNA aumentou em no mínimo 4 vezes (Figura 26).

A associação ascorbato e menadiona (1 mM : 10 μ M) foi utilizada para o tratamento do controle positivo, ela induz à fosforilação

de H2Ax em células T24, assim como também observado em homogenato de células K562 (BECK et al. 2009) e MCF-7 (DEJEANS et al. 2010). A menadiona é uma naftoquinona, como a juglona, quimicamente é a 2 metil 1,4-naftoquinona, sendo denominada vitamina K sintética ou vitamina K3. Também já foi observado que este composto apresenta citotoxicidade sobre células de tumor de mama, estômago, pulmão, cólon, nasofaringe, cérvix, fígado, leucemia e alguns linfomas (NUTTER et al., 1992).

Figura 26 - Fosforilação da histona 2A (γ -H2Ax) em homogenato de células T24 total após tratamento (4 h) com juglona 5-20 μ M (Jug) ou ascorbato 1 mM (Asc), administrados separadamente ou em associação. Figura ilustrativa do resultado de 3 experimentos independentes. (***) denota diferença estatística em comparação ao controle negativo.



Fonte: Ensaio de imunoelctroforese.

O potencial da juglona de induzir danos ao DNA de células tumorais B16F1 já havia sido detectado anteriormente por meio do ensaio de cometa (AITHAL et al., 2009). Paulsen e Ljungman (2005) também já haviam demonstrado que, a depender da concentração, a juglona pode induzir rápida fosforilação de H2Ax, causando a morte celular de fibroblastos humanos. Portanto, tais relatos corroboram os resultados obtidos na presente investigação, observados que estes eventos foram agora detectados em células T24. De acordo com os resultados da figura 26, a citotoxicidade sinérgica da juglona mais ascorbato significa também um dano maior em nível do DNA das células T24.

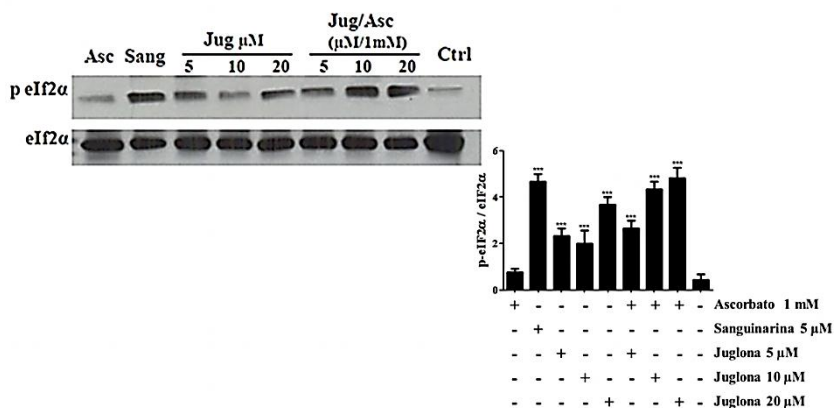
4.2.5 Fosforilação do fator de iniciação eucariótico eIF2 e estresse de retículo endoplasmático

Assim como explicado na seção de introdução, quando as células estão sob uma condição de estresse oxidativo, o que neste caso deve ocorrer devido ao tratamento com juglona e ascorbato, uma resposta celular adaptativa é ativada incluindo uma série de processos celulares bioquímicos, entre eles, processos que conduzem as células à morte (DEJEANS et al., 2010). Um exemplo importante destes processos é denominado estresse de retículo endoplasmático. Trata-se de uma resposta adaptativa que, em princípio, fisiologicamente é ativada em resposta ao acúmulo de proteínas mal dobradas nas células. Mas, o estresse de retículo endoplasmático também pode ser induzido por uma série de outros fatores. Este estresse de retículo pode ser considerado uma parte do sistema celular de “controle de qualidade” que garante, por exemplo, o trânsito correto de proteínas para o complexo de Golgi (ZHANG; KAUFMAN, 2006). O papel principal do estresse de retículo endoplasmático é favorecer a sobrevivência das células por meio do aumento da capacidade para dobrar proteínas ou, facilitando a exportação de proteínas mal dobradas para o citosol, onde deve ocorrer sua degradação subsequente (degradação associada ao estresse de retículo) (ZHANG; KAUFMAN, 2006). Este fenômeno requer um complexo processo regulatório, conhecido por resposta a proteínas mal dobradas que regula a transcrição e a tradução de um grande número de genes (SHRODER, KAUFMAN, 2005). O mais importante neste caso é que, a depender do contexto, o estresse de retículo endoplasmático pode finalmente induzir à morte celular, provavelmente quando a resposta inicial de sobrevivência não pode compensar as modificações sobre as proteínas sujeitas a um estímulo lesivo (ZHANG; KAUFMAN, 2006).

A detecção da fosforilação do fator iniciador eucariótico eIF2 em sua subunidade alfa (p-eIF2 α) tem sido utilizada como marcador da ativação do estresse de retículo endoplasmático (DEJEANS et al., 2010). O eIF2 é um fator requerido no início da tradução na síntese de proteínas. O eIF2 é um heterotrímero de polipeptídeos que consiste de uma subunidade α (ou 1), uma β (2) e uma gama (3). A atividade do eIF2 é regulada por um mecanismo que envolve o intercâmbio de nucleotídeos de guanina e a fosforilação. A fosforilação de eIF2 ocorre em sua subunidade α que é alvo de uma série de serina-cinases que fosforilam a serina 51. Estas cinases atuam como resultado de estresse como: privação de aminoácidos, estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático, presença de RNA de fita dupla ou deficiência de heme.

Uma vez fosforilado, eIF2 não poderá mais retornar ao seu estado ativo ligado a GTP e; conseqüentemente, a tradução de proteínas é interrompida e as células deverão morrer (HERSHEY, 1989; KIMBALL, 1999).

Figura 27 - Fosforilação do fator de iniciação eucariótico eIF2 em sua subunidade α (p-eIF2 α) em homogenato de células T24 total após tratamento (4 h) com juglona 5 - 20 μ M (Jug) ou ascorbato 1 mM (Asc), administrados separadamente ou em associação. Sanguinarina 5 μ M (Sang) foi utilizado para o tratamento do controle positivo. Ilustração representativa do resultado de 3 experimentos independentes.



Fonte: Ensaio de imunoelctroforese.

Na busca por características adicionais acerca da toxicidade da associação de juglona e ascorbato, a fosforilação de eIF2 α foi avaliada em células T24 tratadas respectivamente, como explicado na figura 27, onde também são apresentados os resultados deste estudo. Avaliando estes resultados, é possível afirmar primeiro que em células tratadas somente com ascorbato 1 mM, os níveis de p-eIF2 α não foram diferentes daqueles observado em células tratadas para o controle negativo. Aparentemente, de acordo com os resultados da figura 27, o tratamento com juglona e, de maneira mais evidente, o tratamento realizado com a associação juglona mais ascorbato (a partir de 10 μ M), ambos foram capazes de induzir a fosforilação de eIF2 α . Com estes resultados é tentador especular que o estresse oxidativo causado pela juglona mais ascorbato sobre células T24, via dano ao DNA e uma possível indução de um estado de senescência celular, marcada por danos oxidativos sobre proteínas, possa levar a um acúmulo de proteínas

mal dobradas e ativação de estresse de retículo endoplasmático, tudo isto ocorrendo em uma via induzida verso à morte das células tratadas. Reforçando esta hipótese, existem dados da literatura como aqueles publicados por Dejeans et al. (2010) que demonstram, por exemplo, que o tratamento de células MCF-7 com a associação de menadiona, outra naftoquinona redox ativa, mais ascorbato provocou a morte das células devido a um estresse oxidativo induzido que leva à liberação de cálcio do retículo endoplasmático que potencializa o estresse deste retículo nas células.

4.2.6 Inibição da proliferação

Os resultados apresentados a seguir dizem respeito aos dados obtidos a partir da avaliação do efeito antiproliferativo pelo ensaio de formação de colônias de células T24, novamente tratadas com ascorbato de sódio ou juglona, administrados separadamente ou em associação.

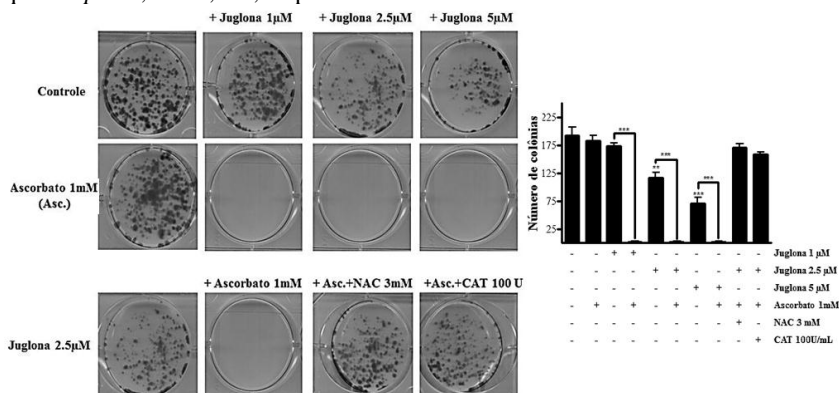
A atividade de uma variedade de agentes antitumorais dá-se graças ao potencial para inibir a proliferação celular. Estes agentes podem, por exemplo, apresentar um potencial alquilante, induzir a formação de aductos e ligações cruzadas no DNA de células, cuja maquinaria enzimática acaba tornando-se incapaz de duplicá-lo (WANG et al., 2005). Um estado de morte celular clonogênica pode ser induzido, ou seja, um estado em que as células podem ainda apresentar algumas características de células viáveis, no entanto, elas perderam a capacidade de divisão, ou seja, um estado de falência reprodutiva (MARSDEN et al., 2006). Outros agentes podem, por exemplo, interagir com receptores da membrana plasmática, atuar como antagonistas, bloqueadores de receptores de fatores de crescimento, podendo interferir com a transdução de sinal mitogênica. Obviamente, a citotoxicidade de alguns agentes também pode inibir diretamente a proliferação celular (GRUNICKE; HOFMANN, 1992).

Neste momento, a citotoxicidade do tratamento à base da associação juglona mais ascorbato já havia sido constatada por ensaios anteriores sob um determinado esquema de tratamento. Para fazer algum avanço, o objetivo a partir desta fase da investigação voltou-se para a verificação de um potencial efeito antiproliferativo da associação, independente de sua citotoxicidade. Por isso, somente os resultados obtidos a partir de tratamentos realizados com baixas concentrações de fármacos, em esquemas comprovadamente subletais, de acordo com os resultados prévios do ensaio de MTT, foram considerados adequados.

Assim, a juglona foi administrada sob uma faixa de concentração de 1-5 μM e o ascorbato de sódio 1 mM e incubados por no máximo 2 h.

Os resultados apresentados na figura 28 demonstram primeiramente que células T24 tratadas somente com juglona apresentaram proliferação reduzida de maneira dependente da concentração. Estes tratamentos levaram à diminuição na contagem das unidades formadoras de colônia (UFCs), de maneira correspondente ao aumento da concentração de juglona, quando comparado ao controle negativo. Aithal et al. (2009), fazendo uso deste mesmo ensaio, já haviam relatado que a juglona apresentou efeito antiproliferativo *in vitro* sobre células de melanoma B16F1.

Figura 28 - Efeito antiproliferativo em células T24 determinado aos 10 dias após um tratamento realizado por 2 h à base de juglona (1 - 5 μM) e de associação juglona mais ascorbato 1 mM. Também, a recuperação da proliferação devido à adição de N-acetilcisteína 3 mM (NAC) ou catalase 100 U/mL (CAT). A ilustração e o gráfico correspondente representam os resultados médios de 3 experimentos independentes. (**) e (***) representam diferença estatística quando comparado ao controle negativo ou tratamentos indicados, quando $p < 0,01$ e 0,001, respectivamente.



Fonte: Ensaio de formação de colônias.

Observando ainda a figura 28, pode-se notar que o tratamento feito somente com ascorbato 1 mM não foi capaz de comprometer a capacidade das células T24 para proliferar, dado que a contagem de UFCs em poços de células tratadas somente com ascorbato 1 mM não foi diferente estatisticamente da contagem de UFCs registrada nos poços do controle negativo. Por outro lado, a partir da ilustração da figura 28, fica fácil perceber que a associação de ascorbato com juglona, mesmo

em doses baixas como 1 μ M, induziu as células T24 a um estado de morte clonogênica, havendo então forte potencialização do efeito antiproliferativo de juglona por parte do ascorbato. De forma interessante, pode-se finalmente perceber na figura 28, que a administração de NAC ou CAT, concomitante aos tratamentos feitos com a associação juglona mais ascorbato, também causou uma recuperação parcial da capacidade proliferativa. Isto evidencia que a indução ao comprometimento celular redox, ou seja, ao estresse oxidativo, por parte da associação juglona e ascorbato desempenha também um papel importante em termos de efeito antiproliferativo (Figura 28).

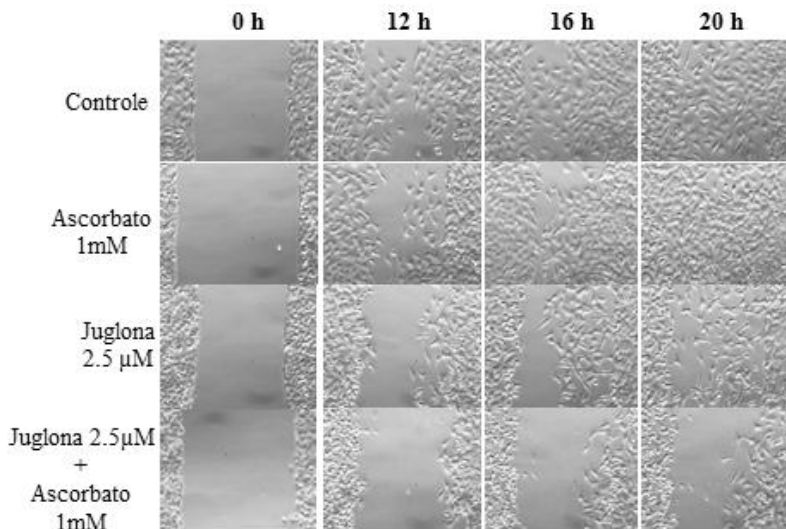
4.2.7 Inibição da motilidade celular

Estudos têm demonstrado que o movimento de células tumorais para os arredores do tumor (invasão), junto com a angiogênese, são os primeiros passos para a disseminação do câncer metastático (SAHAI, 2005). No entanto, sabe-se que existe uma janela de tempo no período de transição que decorre de um estado celular hiperproliferativo para a aquisição da capacidade de invasão e metástase. Assim, terapêuticas antimetastáticas inovadoras, não citotóxicas em princípio, têm sido consideradas especialmente apropriadas para a administração durante este intervalo. As investigações das bases moleculares da invasão têm descoberto estratégias capazes de retardar a progressão dos carcinomas em estágio pré-invasivo e permitir o tratamento dos tumores primários e de metástases já estabelecidas.

Embora, também já se saiba que a taxa de invasão das células de um tumor não necessariamente determina o crescimento das metástases, os agentes anti-invasivos podem, por exemplo, bloquear a angiogênese tumoral e, portanto, podem indiretamente restringir o surgimento de novas metástases. Duas classes de alvos moleculares existem para estes agentes: a) a superfície celular e as proteínas extracelulares que medeiam o sensoriamento, adesão e proteólise e b) as vias de transdução de sinal que regulam a invasão, angiogênese e proliferação das células tumorais. Ambas as categorias de alvos têm rendido abordagens terapêuticas que estão agora sendo testadas na clínica médica (KOHN; LIOTTA, 1995). O bloqueio da invasão, da angiogênese ou das vias de comunicação celular parece gerar mais um efeito citostático, ao invés de um efeito citotóxico.

Pode-se considerar que a terapia citostática (antiproliferativa) constitui um paradigma alternativo de tradução clínica que poderia complementar a convencional terapia citotóxica. Para aqueles pacientes recentemente diagnosticados com tumores sólidos, a terapia antiproliferativa poderia potencialmente criar um estado de “dormência” da metastização ou retardar o tempo de sua reincidência, após a remissão induzida por um agente citotóxico. Os estudos de fase I sobre a toxicidade e a farmacologia dos agentes citostáticos de uso oral, inclusive sob um contexto adjuvante, deverão providenciar as bases para a tradução desta abordagem em termos de terapêutica clínica para os carcinomas diagnosticados em estágio pré-invasivo (KOHN; LIOTTA, 1995; FRIEDL; ALEXANDER, 2011).

Figura 29 - Inibição da motilidade de células T24 por ascorbato de sódio 1 mM, juglona 2,5 μ M e associação juglona 2,5 μ M + ascorbato de sódio 1 mM. Fotos representativas dos resultados do ensaio de migração, repetido 3x de forma independente. Imagens capturadas no tempo inicial 0 h, depois às 12 h, 16 h e 20 h. Aumento de 400 x.



Fonte: Ensaio de migração.

Recentemente, um estudo já demonstrou que algumas quinonas, como a menadiona, podem inibir a motilidade de células tumorais (DELWAR et al., 2012). Mas, no presente trabalho é demonstrado pela primeira vez este efeito da juglona e de sua associação ao ascorbato em células T24, através de um ensaio de migração celular. O ensaio de

migração representa uma abordagem inicial de avaliação da motilidade de células invasivas. No entanto, a progressão dos tumores e metástases são processos de múltiplos passos, que além da migração celular, envolve a ativação de vários receptores de membrana e proteólise celular elevada nas vizinhanças nas matrizes extracelulares (SID et al., 2006). Assim, a avaliação do potencial antimigratório é considerada preliminar, uma vez que somente é avaliada a inibição da motilidade das células, deixando de serem medidos os efeitos em termos de proteólise, o que pode ser feito com o emprego de ensaios mais sofisticados que incluem, por exemplo, matrizes sintéticas. No entanto, o estudo da migração celular, ou seja, o movimento de células de uma área para a outra que normalmente ocorre em resposta a um sinal químico, é fundamental para entender processos como o de cicatrização, diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e desenvolvimento de metástases (ENTSCHLADEN et al., 2004).

A figura 29 ilustra os resultados obtidos nesta investigação pelo ensaio de migração. Como explicado na seção Materiais e Métodos, pode-se dizer que o marco inicial desse ensaio foi a retirada do inserto de separação das duas populações celulares, no momento dado como tempo zero (0 h), quando também o meio de cultura foi substituído por outro contendo os respectivos agentes de tratamento. O primeiro aspecto que deve ser observado na figura 29 refere-se ao padrão de migração das células do controle. A migração das células T24 não tratadas com agentes ativos foi detectável a partir das 12 h após iniciado o ensaio. A partir daí, imagens foram capturadas a cada 4 h, sendo possível perceber uma migração persistente que evoluiu para o total fechamento do espaço intercelular ocorrido às 20 h. Em células tratadas somente com ascorbato 1 mM, um padrão de migração não distinto das condições do controle foi observado, revelando que o tratamento com ascorbato nesta concentração foi inócuo sobre a migração destas células. Uma restrição parcial da motilidade celular foi registrada no tratamento feito somente com juglona (2,5 μ M), tendo ocorrido entre às 12 e 20 h. No entanto, as células T24 perderam notavelmente motilidade quando tratadas com a associação juglona (2,5 μ M) e ascorbato 1 mM, apresentando velocidade de migração reduzida em comparação ao controle (Figura 29).

Os resultados relativos aos tratamentos à base de juglona e de sua associação ao ascorbato apresentados até aqui foram recentemente publicados no periódico *Biochemical and Biophysical Research Communications*, volume 421, páginas 268 a 273 (2012), sob o título *Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from*

ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.150 (Anexo B).

4.2.8 Associação de juglona e ascorbato com doxorrubicina e cisplatina

Como já explicado anteriormente, o tratamento convencional preconizado atualmente para o câncer de células transicionais de bexiga é feito à base de doxorrubicina e seus derivados e/ou cisplatina de acordo com o *National Cancer Institute* (2011). Somente para uma análise preliminar e inédita, a partir do ensaio do MTT, foi testado se a associação de juglona e/ou ascorbato pode potencializar a citotoxicidade da doxorrubicina e da cisplatina.

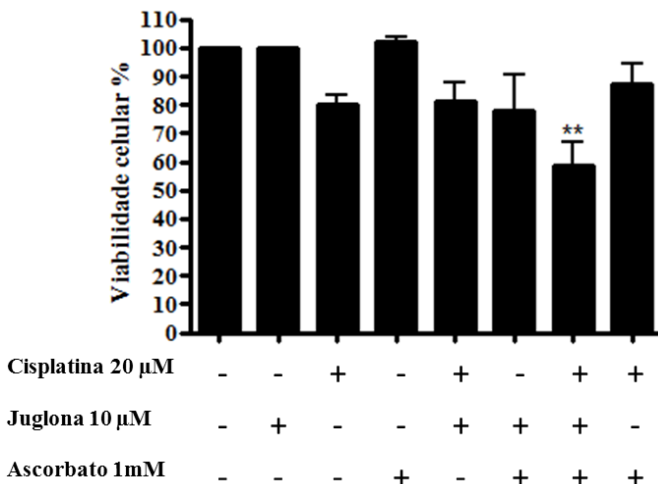
No caso do ascorbato, por exemplo, esta abordagem vem sendo testada, fazendo-se a associação de altas doses de ascorbato, por via parenteral quando *in vivo*, junto com a administração de alguns dos principais quimioterápicos utilizados no tratamento de vários tipos de câncer. Espey et al. (2011) já demonstraram que é possível alcançar efeitos citotóxicos sinérgicos com a administração de gemcitabine e ascorbato no tratamento de câncer pancreático *in vitro* e em modelo de camundongos nus. Estes dados têm providenciado uma base para a investigação do uso farmacológico do ascorbato como um adjuvante na quimioterapia do câncer convencional (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012).

Como já explicado anteriormente, a doxorrubicina é um agente quimioterápico da classe das antraciclinas derivada do tetraceno (Figura 8 D). Este fármaco é muito eficaz como antitumoral, e chega a ser considerado ativo contra uma variedade de tumores maior do que qualquer outro quimioterápico (MINOTTI et al., 2004). No entanto, os resultados confirmados referentes à associação de juglona e/ou ascorbato com doxorrubicina não foram considerados promissores, de maneira que estes dados não são apresentados aqui. O que se pode afirmar como resultado é que os achados desta incursão levam a afirmar que a citotoxicidade *in vitro* da doxorrubicina não foi alterada via associação, seja com o ascorbato 1 mM ou com a juglona, sendo a doxorrubicina administrada em CI_{50} (4 μ M) ou CI_{20} (1,6 μ M) sobre células T24 em uma exposição de 24 h.

A cisplatina é um quimioterápico derivado da platina $PtCl_2(NH_3)_2$ também utilizado no tratamento de muitos tipos de tumor (DJORDJEVITZ, 1995). Os resultados do tratamento das células T24

com juglona e/ou ascorbato mais cisplatina apresentaram resultados diferentes que são apresentados na figura 30. Primeiramente, para fins desta avaliação, a CI_{50} e CI_{20} da cisplatina sobre células T24, expostas por 24 h, foram determinadas, sendo respectivamente 50 e 20 μM . Resultados promissores que demonstram que a citotoxicidade da cisplatina é aumentada via associação com juglona e ascorbato foram obtidos com a administração de cisplatina (20 μM), juglona 5 μM e ascorbato, novamente em excesso, 1 mM (Figura 30). Avaliando esta figura pode-se perceber que a cisplatina administrada em 20 μM por 24 h causou uma redução de cerca de 20% da viabilidade celular em comparação ao controle negativo, como era de se esperar. Por outro lado, o tratamento realizado com ascorbato 1 mM e juglona 5 μM só gerou alguma redução quando estas substâncias foram administradas em associação

Figura 30 – Viabilidade de células T24 tratadas com juglona 5 μM , ascorbato 1 mM ou cisplatina 20 μM , administradas separadamente ou em associação por 24 h. Os resultados são apresentados pela média obtida a partir de 3 experimentos realizados independentemente \pm desvio padrão. (**) representa diferença estatística significativa comparada aos tratamentos feitos somente com cisplatina ou juglona e ascorbato mais cisplatina.



Fonte: Ensaio de MTT

Células T24 apresentaram uma viabilidade reduzida em cerca de 40% em comparação ao controle negativo, quando foram tratadas com juglona e ascorbato mais cisplatina, o que evidencia, mais uma vez,

um efeito sinérgico para a associação, uma vez que este efeito é maior que a soma dos efeitos dos tratamentos feitos à base das substâncias administradas separadamente (Figura 30). Estes resultados foram dados como promissores, uma vez que o tratamento realizado com a associação das três substâncias, se comparado com o tratamento realizado somente com cisplatina, significou dobrar o efeito do quimioterápico convencional (cisplatina) (Figura 30).

4.3 Considerações finais

Para finalizar, cabe mais uma vez ressaltar as contribuições desta investigação, onde um esforço considerável foi dedicado para elucidar novas moléculas protótipos, abordagens terapêuticas particulares, em uma tarefa interdisciplinar apoiada por parceiras fundamentais com o objetivo de avançar no que se refere ao tratamento do câncer. Na primeira fase deste trabalho, a partir de ensaios de atividade biológica e fitoquímica foi possível confirmar que a espécie vegetal *B. pilosa* possui constituintes poliacetilênicos citotóxicos que possuem afinidade com o CO₂ e são extraídos com eficiência por extração com fluido supercrítico. A citotoxicidade deste extrato e sua atividade antitumoral *in vivo* são superiores quando comparado àquelas do extrato obtido por maceração hidroetanólica e está relacionada à indução de danos em nível do DNA. Na segunda fase deste trabalho, foram exploradas potencialidades antitumorais da juglona obtida por química verde, quando foi possível obter achados reforçando várias evidências já existentes e, além disso, o mais importante, foi possível demonstrar que a associação de juglona ao ascorbato é favorável em termos de efeito antitumoral. Desta forma, surgiram evidências de que a juglona assim pode ser empregada em doses menores, com vantagens adicionais relacionadas a efeitos antiproliferativo e inibidores da motilidade de células tumorais. A associação ainda pode potencializar o efeito citotóxico da cisplatina. Com base nestes achados, a seguir são apresentadas as conclusões deste trabalho.

5. CONCLUSÃO

Finalmente, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral de extratos de *B. pilosa* e da associação juglona e ascorbato de sódio. De forma geral, o resultado desta incursão permite

concluir primeiro que a extração supercrítica é uma alternativa para a obtenção de um extrato de *B. pilosa* rico em poliacetilenos citotóxicos com atividade antitumoral superior em comparação ao extrato obtido por maceração hidroetanólica e que esta atividade deve estar associada a danos diretos ao DNA. Por outro lado, os resultados obtidos permitem concluir que o ascorbato potencializa a citotoxicidade, o efeito antiproliferativo e inibidor da motilidade de células T24 *in vitro* da juglona, que assim pode ser administrada em concentrações inferiores. Esta associação merece ser mais bem avaliada *in vivo*, pois poderia servir para reduzir alguns dos efeitos colaterais das quinonas já relatados na literatura.

No geral, a partir dos resultados obtidos, é possível concluir que:

- Os extratos hidroetanólico e supercrítico de *B. pilosa* apresentam citotoxicidade *in vitro*, a depender da concentração e do tempo de exposição, sobre células MCF-7.

-A citotoxicidade para MCF-7 pode ser relacionada a um potencial indutor de dano sobre o DNA causado pelos extratos hidroetanólico e supercrítico de *B. pilosa*;

- A tecnologia de extração com fluido supercrítico rendeu um extrato de *B. pilosa* que, de acordo com ensaios *in vitro*, apresenta toxicidade superior sobre células MCF-7 e DNA plasmidial, quando comparado à toxicidade do extrato obtido por maceração hidroetanólica;

- Os constituintes majoritários do extrato de *B. pilosa* obtido por tecnologia supercrítica apresentaram um espectro com bandas consideradas típicas de poliacetilenos podendo-se sugerir que esta classe de compostos esteja envolvida na atividade citotóxica e antitumoral do extrato supercrítico

- O extrato supercrítico apresentou maior potencial antitumoral no modelo experimental com camundongos Balb-c portadores do tumor ascítico de Ehrlich que o extrato hidroetanólico;

- A juglona apresenta importante citotoxicidade para células T24, a depender da concentração e do tempo de exposição,;

- A citotoxicidade da juglona está relacionada ao seu potencial indutor de estresse oxidativo celular, dano ao DNA e indução de estresse de retículo endoplasmático;
- A juglona quando administrada em associação ao ascorbato, sobre células T24, apresenta efeito sinérgico em termos de citotoxicidade *in vitro*, uma vez que o efeito da associação é superior em comparação ao efeito de ambos os produtos administrados separadamente.
- O tipo principal de morte celular induzida pela juglona e sua associação possivelmente é a necrose;
- A juglona apresentou efeito antiproliferativo e inibiu a motilidade de células T24. Estes efeitos foram fortemente potencializados quando a juglona foi administrada em associação com ascorbato.
- A citotoxicidade da cisplatina sobre células T24 pode ser potencializada via associação com juglona e ascorbato.

6. PERSPECTIVAS

A eficácia dos extratos supercríticos de *B. pilosa* continua a ser avaliada no LABIOEX como parte de projetos de outros alunos de pós-graduação que estão testando variações no método de extração, como condições de pressão e temperatura, na tentativa de obter uma condição otimizada de extração de poliacetilenos citotóxicos.

Como parte do projeto de pós-doutorado de Maicon R. Kwiecinski, a atividade antitumoral e angiogênica da juglona e menadiona *in vivo* deverão ser estudadas, avaliando riscos e benefícios, sobretudo em nível cardiovascular. Deverá também ser avaliado o resultado destes tratamentos associados a doses farmacológicas de ascorbato como uma estratégia para melhorar a eficácia e a segurança dos princípios ativos, usando a doxorrubicina como elemento de comparação.

Ultimamente, uma atenção tem sido dada sobre a interferência do tratamento à base de juglona e/ou ascorbato sobre a expressão de genes e a ativação de intermediários das vias de sinalização das cinases ativadas por mitogênio, fosfoinositol 3 cinase-Akt-mTOR e JAK-STAT. Alguns resultados preliminares já foram obtidos, precisando ainda de confirmação. Pode-se adiantar que aparentemente a via das MAPKs não

é afetada pelo tratamento com juglona e/ou ascorbato, pelo menos em células T24. Entretanto, os resultados relacionados à via JAK-STAT são inconclusivos, havendo a necessidade ainda de aperfeiçoar o fracionamento dos constituintes celulares para uma determinação efetiva. A novidade é que aparentemente a via da PI3K-Akt-mTOR parece ser ativada em células T24. Se isto for confirmado, em se tratando de uma via, em princípio de sobrevivência, este processo poderá significar de alerta para a correta administração de juglona e ascorbato em doses efetivas. Já se sabe, por exemplo, que concentrações subletais de cisplatina podem levar células de câncer de ovário à resistência, devido justamente à ativação desta importante via (PENG et al., 2010). Portanto, considera-se que estudos sobre a resistência celular induzida devido a uma eventual terapia com juglona devem ainda ser realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. C.; FERRAZ, P. A. L.; GOULART, M. O. F. Some applications of electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the correlation of electrochemical and bioactive properties. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 13, n. 1. p. 19-35, 2002.

ADHAMI, V.M. et al. Activation of pro death Bcl-2 family proteins and mitochondrial apoptosis pathway by sanguinarine in immortalized human HaCaT keratinocytes. **Clin. Cancer Res.** v.1, n.9, p. 3176-82, 2003.

AITHAL, B.K. et al. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. **Cell Biol. Int.** v. 33, 1039-49, 2009.

AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Hellinusrimosus* (Berk) Pilat. **J. Ethnopharmacol.** v.84, p.157-162, 2003.

ALBINI, A.; FAGNONI, M. Photochemistry of N-oxides (2004). In: HORSPOOL, W.M.; LENCI, F. (ed.) **CRC Handbook in Organic Photochemistry and Photobiology.** 2.ed. Pisa (Italy): CRC Press, p.99-1-99-21.

AL-HARBI, S. et al. An antiapoptotic BCL-2 family expression index predicts the response of chronic lymphocytic leukemia to ABT-737. **Blood.** v. 118, n.13, p. 3579-89, 2011.

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos.**São Paulo, Brasil: Hemus Editora, 1993.

ALVAREZ, L. et al. Bioactive polyacetylenes from *Bidens pilosa*. **Planta Med.** v.62, n.4, p. 355-357, 1996.

AMARAL, J.D. et al. The role of p53 in apoptosis. **Discov Med.** v.9, n.45, p.145-52, 2010.

AUDIC, Y.; HARTLEY, R.S. Post-transcriptional regulation in cancer – Review. **Biol. Cell.**v.96, p. 479-98, 2004.

BABICH, H.; STERN, A. *In Vitro* cytotoxicities of 1,4-naphthoquinone and hydroxylated 1,4-naphthoquinones to replicating cells. **J. Applied Toxicology**. v.13, p.353-8, 1993.

BECK, R. et al. Menadione reduction by pharmacological doses of ascorbate induces an oxidative stress that kills breast cancer cells. **Int. J. Toxicol.** v.28. p. 33-42, 2009.

BENITES, J. et al. Biological evaluation of donor-acceptor aminonaphthoquinones as antitumor agents. **Eur. J.Med. Chem.** v. 45, p.6052-6057, 2010.

BENITES, J. et al. Part 1: Effect of vitamin C on the biological activity of two euryfurylbenzoquinones on TLT, a murine hepatoma cell line. **Eur. J.Med. Chem.**v.43, 1813-17, 2008.

BENITES, J. et al. Part 2: Influence of 2-euryfuryl-1,4-naphthoquinone and its peri-hydroxy derivatives on both cell death and metabolism of TLT cells, a murine hepatoma cell line. modulation of cytotoxicity by vitamin C. **Chem. Pharm. Bull.**v.57, n.6, p. 615-619, 2009.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**.5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. 1059 p.

BERTRAM, J.S. The molecular biology of cancer. **Mol. Aspects Med.** v.21, p.167-223, 2001.

BOGUSKI, M. S.; MCCORNIMICK, F. Protein regulating Ras and its relatives. **Nature**. v.366, p.643-654, 1993.

BONIFAZI, E.L. et al. Antiproliferative activity of synthetic naphthoquinones related to lapachol. First synthesis of 5-hydroxylapachol. **Bioorg. Med. Chem.** v. 18, p. 2621-30, 2010.

BORMAN, S. Target-promoted DNA alkylation. New technique may be applicable to many other reagents and targets in addition to DNA. **Chem. Eng. News**. v.82, n.5, p.25, 2004.

BOYD, M. et al. New drug development. In: ROTH, J.; RUCKDESCEL, J.; WEISBERGER, T. (editors). **Thoracic oncology**. Philadelphia: Saunders, 1989.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidenspilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. **J.Ethnopharmacol.** n.57, p.131-138, 1997.

BRANDÃO, M. J. L. et al. Two methoxylated flavone glycosides from *Bidenspilosa*. **Phytochem.** v.48, n.22, p. 397-399, 1998.

BROWN, R. The Bcl-2 family of proteins. **British Med. Bull.**v.53, p.466-77, 1996.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc.Cult.** v.55, n.3, 2003.

CANNON, A. S.; WARNER, J. C. The science of green chemistry and its role in chemicals policy and educational reform. **New Solut.** v.21, n.3, p.499-517, 2011.

CARR, A.; FREI, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? **FASEB J.** v.13, p.1007-24, 1999.

CASAS, L. et al. Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. **J. Supercrit. Fluids.** v. 41, p.43-49, 2007.

CATZAVELLOS, C. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: Prognostic implications in primary breast cancer. **Nature Med.** v.3, n.2, p.227-30, 1997.

CHIANG, Y. M. et al. Cytopiloyne, a novel polyacetylenic glucoside from *Bidenspilosa*, functions as a T helper cell modulator. **J.Ethnopharmacol.** v.110, p.532-538, 2007.

CHIANG, Y.M. et al. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. **J. Ethnopharmacol.**, v.95, p.409-419, 2004.

CHIEN, S.C. et al. Anti-diabetic properties of three common *Bidens pilosa* variants in Taiwan. **Phytochemistry**. v.70,, p.1246-54, 2009.

CHO, S.-H.; NA, Y.-E.; AHN, Y.-J. Growth-inhibiting effects of seco-tanaparthalides identified in *Artemisia princeps* var. *orientalis* whole plant on human intestinal bacteria. **J.A.Microbiol. Korea**, v. 95, n. 1, p. 7, 2003.

CLARKSON, B.D.; BURCHENAL, J.H. Preliminary screening of antineoplastic drugs. **Prog.Clin.Cancer**. v.1, p.625-629,1965.

CLEARY, M. L.; SMITH, S.D.; SKLAR, J. Cloning and structural analysis of cDNAs for Bcl-2 and a hybrid Bcl-2 immunoglobulin transcript resulting from the T (14; 18) translocation. **Cell**. v.47, p.19-28, 1986.

COIMBRA, R. **Manual de Fitoterapia**. 2.ed. Belém: Editora Cejup, 1994.

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

COOPER, J.R.; PIROS, K. The effect of juglone on cholinergic mechanisms in rat brain synaptosomes. **Neurochem. Res**. v.2, p.259-264, 1977.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil – e das exóticas cultivadas**. Brasil: Instituto Brasileira de desenvolvimento florestal (Ministério da Agricultura): 1984, v.II, p.459-460.

COZZI, P. The discovery of a new potential anticancer drug: a case history. **Il Farmaco**.v.58, n.3, p. 213-220, 2003.

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

CRANE, E. L.; BÖTTGER, M. Plasma membrane redox systems. **Protoplasma**. v.217, p.1-2, 2001.

CURRELI, N. et al. Degradation of juglone by *Pleurotussajor-caju*. **Mycol. Res.** v.108, n.8, p.913-18, 2004.

D'ARCY DOHERTY, M.; RODGERS, A.; COHEN, G. M. Mechanisms of toxicity of 2- and 5- hydroxyl 1,4-naphthoquinone; absence of a role for redox cycling in the toxicity of 2-hydroxy 1,4-naphthoquinone to isolated hepatocytes. **J.Appl. Toxicol.** v.7, n.2,p.123-9, 1987.

DANTAS, F. J. S. et al. Stannous chloride mediates single strand breaks in plasmid DNA through reactive oxygen species formation. **Toxicol. Lett.** v. 110, p. 129–136, 1999.

DE LAURENZI, V. et al. Cell death by oxidative stress and ascorbic acid regeneration in human neuroectodermal cell lines. **Eur. J. Cancer.** v. 31, p. 463–466, 1995.

DE VITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: principles and practice of oncology.** 5.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1998.

DEGTEREV, A.; YUAN, J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v.9, n.5, p.378-90, 2008.

DEJEANS, N. et al. Endoplasmic reticulum calcium release potentiates the ER stress and cell death caused by an oxidative stress in MCF-7 cells. **BiochemPharmacol.** v.79, n.9, 1221-30, 2010.

DELWAR, Z. M. Menadione: sodium orthovanadate combination eliminates and inhibits migration of detached cancer cells. **ISRN Pharmacol.** p. 1-10, 2012.

DICKANCAITÉ, E. et al. Toxicity of Daunorubicin and naphthoquinones to HL-60 cells: an involvement of oxidative stress. **Biochem. Mol. Biol. Int.** v.41, n.5, p. 987-994, 1997.

DJORDJEVITZ, C. Antitumor activity of vanadium compounds. In: SIEGEL, H.;SIEGEL, A.(editors). **Metal ions in biological systems.** New York: Marcel-Decker, 1995, p.595–616.

DONEHOWER, L. A.; HARVEY, M.; SLAGLE, B. L. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature**. v.356, p.215-221, 1992.

DU, J.; CULLEN, J. J.; BUETTNER, G. R. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochem. Biophys. Acta**. v. 1826, n.2, p.443-57, 2012.

DUESBERG, P.; RASNICK, D. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. **Cell Motil. Cytoskeleton**. v.47, p.81-107, 2000.

DUKE, J.A. Handbook of medicinal herbs. Boca Raton:CRC, 1985.

DULIC, V. et al. P53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. **Cell**. v.76, p.1013-1023, 1994.

EBERSTADT, M. et al. "NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain". **Nature**. v.392, n. 6679, p. 941–5, 1998.

EFFERTH, T. et al. Detection of apoptosis in KG-1a leukemic cells treated with investigational drugs. **Arzneimittelforschung**. v.46, n.1, p.196-200, 1996.

EISINGER, F. et al. Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited. **Cancer Res**. v. 58, p.1588-1592, 1998.

ELISABETSKY, E. From indigenous disease concepts to laboratory working hypothesis: the case of “Nerve Tonics” from the Brazilian Amazon. **Intern. Found. Sci. Prov. Rep. series**. GrevTuregatan, Stockholm, Sweden, v.19, p. S-11438, 1987.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol. Pathol**. v. 35, p. 495-516, 2007.

ENGERS, R.; GABBERT, H. E. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. **J.CancerRes.Clin.Oncol**. v.126, p.682-692, 2000.

ENTSCHLADEN, F. et al. Tumour-cell migration, invasion, and metastasis:navigation by neurotransmitters. **LacetOncol.** v. 5, p.254- 8, 2004.

ESPEY, M. G. et al. Pharmacologic ascorbate synergizes with gemcitabine in preclinical models of pancreatic models of pancreatic cancer. **Free Radic. Biol. Med.** v.50, p. 1610-19, 2011.

FALKENBERG, M. B. Quinonas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 1999. cap. 25, p. 545-570.

FIDLER, I.J. Critical determinants of metastasis. **Semin. Cancer Biol.** v.12, p.89–96, 2002.

FILA, C.; METZ, C.; VAN DER SLUIJS, P. Juglone inactivates cysteine-rich proteins required for progression through mitosis. **J. Biol. Chem.** v.283, n.31, p.21714-24, 2008.

FRANCO, I. J.; FONTANA,V. L. **Ervas e plantas: a medicina dos simples.** 9.ed. Erechim, RS, Brasil: Editora Livraria Vida, 2004.

FRESHNEY, R. I. **Freshney'sCultureof animal cell** – a multimediaguide. New York, CD-ROM, 1999.

FRIEDL, P.; ALEXANDER, S. Cancer invasion and the microenvironment:plasticity and reciprocity. **Cell.** v. 147, p. 992-1009, 2011.

GEISSBERGER, P.; SEQUIN, U. Constituents of *Bidenspilosa* L.: Do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine?**Acta Trop.** v.48, n.4, p. 251-61, 1991.

GHOBRIAL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEL, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer J. Clin.** v.55, p. 178-194, 2005.

GIRARD, M. et al. Naphtoquinone constituents of *Tabebuia* spp. **J. Nat. prod.** v.51, p.1023-1024, 1988.

GLORIEUX, C. et al. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. **Biochem. Pharmacol.** v.15, 1384-90, 2011.

GOLLNICK, K. Photooxygenation and its application in industry. **La Chimica e l'Industria** (Milan), v.64, p. 156–166, 1982.

GORCZYCA, W.; GONG, J.; ARDELT, B. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. **Cancer Res.** v.73, p.3186-3192, 1999.

GRETARSDOTTIR, S. et al. BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability. **Cancer Res.** v. 58, p.859-862, 1998.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal. Biochem.** v.106, p.207-12, 1980.

GRUNICKE, H.; HOFMANN, J. Cytotoxic and cytostatic effects of antitumor agents induced at the plasma membrane level. **Pharmacol. Ther.** v.55, p.1-30, 1992.

GUPTA, S. et al. Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 164, p.82–90, 2000.

GUTIERREZ, P. L. The metabolism of quinone-containing alkylating agents: free radical production and measurement. **Front. Biosci.** v.5, p.629-638, 2000.

HAKANSSON, S. **Weeds and weed management on arable land: an ecological approach.** Cambridge, MA, USA: CABI Publishing, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** 3.ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HANAHAH, D.; WEINBERG R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell.** v.100, p.57-70, 2000.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 3. ed. London: Chapman & Hall, 1998. 302p.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mutat. Res.** v. 275, p. 257-266, 1992.

HAUNSTETTER, A.; IZUMO, S. Apoptosis – basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. **Circulation Res.** v.82, p.1111-29, 1998.

HAZRA, B.; PAL, S.; BANERJEE, A. New diospyrin derivatives with improved tumour inhibitory activity towards Ehrlich ascites carcinoma. **Med. Sci. Res.** v.22, p.351-353, 1994.

HERCEG, Z.; WANG, Z. Q. Failure of poly (ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases. **Mol. Cell Biol.** v.19, n.7, p. 5124-33, 1999.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, L.S. et al. Towards a molecular-level understanding of the reactivity differences for radical anions of juglone and plumbagin: an electrochemical and spectroelectrochemical approach. **Org. Biomol. Chem.** v.7, p.1896-1903, 2009.

HERSHEY, J. W. Protein phosphorylation controls translation rates. **J. Biol. Chem.** v.264, n.35, p.20823-6, 1989.

HOCKENBERY, D. et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell.** v.75, p.241-251, 1993.

HOFFER, L. J. et al. Phase I clinical trial of I.V. ascorbic acid in advanced malignancy. **Ann. Oncol.**v.14, 2008.

HUANG, B. et al. "NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain". **Nature.** v.384, n.6610, p. 638–41, 1996.

IARC – International Agency for Researchon Cancer – Disponível em: <<http://www.iarc.fr/>> Acesso em 12 de janeiro de 2011.

IARC – InternationalAgency for Researchon Câncer – Disponível em:<<http://www.iarc.fr/>> Acesso em 12 de janeiro de 2011.

IBIDI@Cells in focus. Disponível em: <<http://www.ibidiusa.com/product/culture-insert/>> Acesso em: 10 de janeiro de 2011.

INBARAJ, J.J.; CHIGNELL, C.F. Cytotoxic action of juglone and plumbagina: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. **Chem. Res. Toxicol.** v.17, p.55-62, 2004.

INCA-Ministério da Saúde. Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>> Acesso em 04 janeiro 2012.

JAMISON, J.M. et al. Cell cycle arrest and autoschizis in a human bladder carcinoma cell line following vitamin C and vitamin K3 treatment. **Biochem. Pharmacol.** v.67, p.337-51, 2004.

JEMAL, A. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin.** v.61, p. 69-90, 2011.

JENDIROBA, D. B. et al. Effective cytotoxicity against human leukemias and chemotherapy-resistant leukemia cell lines by N-N-dimethylsphingosine. **LeukemiaRes.**v. 26, p.301-310, 2002.

JI, Y.B.; QU, Z.Y.; ZOU, X. Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway. **Exp. Toxicol. Pathol.** v.63, 69-78, 2011.

KAM, P.C. A.; FERCH, N. I. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. **Cancer.** v.73, p.2013-2026, 2000.

KAMB, A. Cell-cycle regulators and cancer. *Anaesthesia*, v.55, p.1081-1093, 2000.

KAPPUS, H. Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. **Biochem. Pharmacol.**v.35, p.1-6, 1986.

KERR, J.; WITERFORD, C.; HARMON, B. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer.** v.73, p.2013-2026, 1994.

KHETAN, S. K.; COLLINS, T. J. Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. **Chem. Rev.** v.107, p.2319-2364, 2007.

KHLEIF, S. N.; CURT, G. A. 2000. Animal models in developmental therapeutics. In: BAST, R.C. et al. (editors). **Cancer Medicine**. 5.ed. NY: Decker. p. 573-584.

KIM, J. W. et al. DNA-binding activity of the N-terminal cleavage product of poly(ADP-ribose)polymerase is required for UV mediated apoptosis. **J. Cell Sci.** v.113, p.955-61, 2000.

KIM, Y. S. et al. Studies on the mechanism of cytotoxicities of polyacetylenes against L1210 cell. **Arch. Pharm. Res.** v.12, n.3, p.207-13, 1989.

KIMBALL, S. R. Eukaryotic initiation factor eIF2. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v.31, n.1, p.25-9, 1999.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. **"Introduction". The genetic basis of human cancer**. 2.ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division., 2002, p.5.

KITZBERGER, A. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **J. Food Engineering**. v.80, p.603-38, 2007.

KOHN, E.C.; LIOTTA, L.A. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. **Cancer Res.** v.55, p. 1856-62, 1995.

KONG, Y. et al. Natural product juglone targets three key enzymes from *Helicobacter pylori*: inhibition assay with crystal structure characterization. **Acta Pharmacol. Sin.** v. 29, n.7, p. 870-76, 2008.

KVIECINSKI et al. Brazilian *Bidens pilosa* Linné yields fraction containing quercetin-derived flavonoid with free radical scavenger activity and hepatoprotective effects. **Libyan J. Med.** v.18, n.6, p.1-7, 2011a.

KVIECINSKI, M.R. et al. SFE from *Bidenspilosa*Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity. **J Supercrit. Fluids.** v.56, p. 243–248, 2011b.

KVIECINSKI, M.R. et al. Study of the antitumor potential of *Bidenspilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **J. Ethnopharmacol.** v.117, p. 69–75, 2008.

LEHNINGER, Albert L; NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger principles of biochemistry**.5. ed. New York: W. H. Freeman, 2008. p. 1119.

LENARDÃO, E.J. et al. “Green chemistry” – Os 12 Princípios da Química Verde e sua Inserção nas Atividades de Ensino e Pesquisa. **Quim. Nova.**v. 26, n.1, p.123-129, 2003.

LINDSLEY, C.W. et al., The PI3K/Akt pathway: recent progress in the development of ATP-competitive and allosteric Akt kinase inhibitors. **Curr. Cancer Drug Targets.** v.8, p.7-18, 2008.

LOMBARDO, M.; TROMBINI, C. Catalysis in non-conventional reaction media. In: BALLINI, R. (ed). **Eco-Friendly Synthesis of Fine Chemicals**, RSC Publishing, Cambridge, 2009, p. 2 -3.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin reagent. **J. Biol. Chem.** v.193, p. 268-75, 1951.

MACHMUDAH, S. et al. Supercritical CO2 extraction of nutmeg oil: Experiments and modeling. **J. Supercrit. Fluids.** v. 39, p. 30-39, 2006.

MACRAE, W. D. Examination of naturally occurring polyacetylenes and α -terthienyl for their ability to induce cytogenetic damage. **Experientia.** v.36, n.9, p.1096-97, 1980.

MANCIN, F. et al. Artificial metallonucleases. **ChemComm.** v.20, p.2540-2548, 2005.

MARSDEN, V. S. et al. Apaf-1 and caspase-9 are required for cytokine withdrawal-induced apoptosis of mast cells but dispensable for their functional and clonogenic death. **Blood.** v.107, n. 5, 2006.

MAŚLIŃSKA, D. Apoptosis: physiological cell death and its role in pathogenesis of diseases. **Neurol. Neurochir. Pol.** v.37, n.2, p. 315-26, 2003.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 5, n.2, p.185-200, 1996.

MAZZOCCA A. et al. A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor–stromal interactions. **Cancer Res.** v.65, p.4728–38, 2005.

MCDONALD, E. R., EL-DEIRY, W.S. Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review). **Int. J. Oncol.** v.16, n.5, p.871-886, 2000.

MEDEMA, R.H.; BOS, J.L. The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signalling. **Crit. Rev. Oncog.** v.4, p.615-661, 1993.

MEDEMA, R.H.; BOS, J.L. The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signalling. **Crit. Rev. Oncog.** v.4, p.615-661, 1993.

MENEGATTI, R.; MANSSOUR FRAGA, C.A.; BARREIRO, E.J.A importância da síntese de fármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola.** Brasil: QNEsc, n. 3, 2001.

MERLO, L.M. et al. "Cancer as an evolutionary and ecological process". **Nat. Rev. Cancer.** v.6, n.12, p. 924–35, 2006.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordiaverbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresour.Technol.** v.100, p.6615–6623, 2009.

MINOTTI, G. et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol. Rev.** v.56, n. 2, p.185–229, 2004.

MIYASHITA, T.; REED, J. C. Tumour suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human baxgene. **Cell.** v.80, p.293-299, 1995.

MOFFATT, J. et al. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3 activation. **Carcinogenesis**. v.21, n.12, p.2151-2157, 2000.

MOFFATT, J. et al. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3 activation. **Carcinogenesis**. v.21, n.12, p.2151-2157, 2000.

MONKS, T. J. et al. Quinone chemistry and toxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.112, n.1, p.2-16, 1992.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim.Nova**. v.24, n.1, p.105-111, 2001.

MONTENEGRO, R.C.; ARAÚJO, M.T.; MOLINAB, M.T. et al. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on Juglone and its 5-o-methyl derivative. **Chem. Biol. Interact.** v.184, p. 439-48, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J.Immunol. Methods**. v. 16, p. 55-63, 1983.

MRAZ, M. et al. MiR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. **Leukemia**. v.23, n.6, p.1159-63, 2009.

NAHTA, R. New developments in the treatment of HER2-positive breast cancer. **BreastCancer(London)**. v.4, p.53-64, 2012.

NAKAGAWA, W.T.; LOPES, A. **Conceitos Básicos em Oncologia**. In: AYOUB, A. et al. Bases da Enfermagem em Quimioterapia, São Paulo: LEMAR, 2000, p.1-19.

NCBI – National Center for Biotechnology Information – Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em 12 de janeiro de 2011.

NICHOLSON, D. W. et al. Identification and inhibition of theICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. **Nature**. v.376, p. 37-43, 2002.

NUTTER, L. M. et al. Menadione: spectrum of anticancer activity and effects on nucleotide metabolism in human neoplastic cell lines. **Biochem. Pharmacol.** v. 41, p. 1283-92, 1991.

NUTTER, L. M. et al. DNA strand scission and free radical production in menadione treated cells. Correlation with cytotoxicity and role of NADPH quinone acceptor oxidoreductase. **J. Biol. Chem.** v.267, n.4, p.2474-2479, 1992.

O'BRIEN, P. J. Molecular mechanism of quinone cytotoxicity. **Chem. Biol. Interact.** v.80, n.1, p.1-41, 1991. Erratum in **Chem. Biol. Interact.** v.81, n.1-2, p.219, 1992.

OCTAVIA Y.; TOCCHETTI C.G.; GABRIELSON, K.L. ET AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. **J. Mol. Cell. Cardiol.** v. 52, 1213–1225, 2012.

OELGEMÖLLER, M. et al. “Green photochemistry” with moderately concentrated sunlight. **The Spectrum.** v.18, n.1, p.28-33, 2005.

ÖLLINGER, K.; BRUNMARK, A. Effect of hydroxy substituent position on 1,4-naphthoquinone toxicity to rat hepatocytes. **J. Biol. Chem.** 266, n.32, 21496-21503, 1991.

OPPENHEIMER, S.B. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. **ActaHistochem.** v.108, p. 327—334, 2006.

PAI, S.I. et al. Prospects of RNA interference therapy for cancer. **Gene Therapy.** v.13, p.464-77, 2006.

PAPAVRAMIDOU, N.; PAPAVRAMIDIS, T.; DEMETRIOU, T. Ancient Greek and Greco–Roman Methods in Modern Surgical Treatment of Cancer. **Ann. Surg. Oncol.** v.17, p.665–667, 2010.

PATEL et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.** v.12, n.366, p.1079-89, 2012.

PAULSEN, M.T.; LJUNGMAN, M. The natural toxin juglone causes degradation of p53 and induce rapid H2AX phosphorylation and cell

death in human fibroblast. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.209, p.1-9, 2005.

PENG, D. J. Role of the Akt/mTOR survival pathway in cisplatin resistance in ovarian cancer cells. **Biochem. Bioph. Res. Comm.**v.394, p.600-5, 2010.

PENG, X. et al. "The cardiotoxicology of anthracycline chemotherapeutics: translating molecular mechanism into preventative medicine". **Mol. Interv.** v. 5, n. 3, p. 163-71, 2005.

PEPPERCORN, J. et al. Rationing in urologic oncology: lessons from sipuleucel-T for advanced prostate cancer. **UrolOncol.** Epubaheadofprint, 2012.

PEREIRA, A. **Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa spp*)**. 156 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

PEREIRA, R. L. C. et al. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L. **Immunopharmacology.** v.43, p.31-37, 1999.

PRASAD, S. B.; GIRI, A. Antitumor effect of cisplatin against murine ascites Dalton's lymphoma. **Indian J. Exp. Biol.** v.32, p.155-162, 1994.

QURESHI, S. O. A. et al. Boric acid enhances in vivo Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. **Toxicology.** v. 165, p. 1-11, 2001.

RABE, T. Antibacterial activity of south african plants used for medicinal purposes. **J Ethnopharmacol.** v.56, p. 81-87, 1997.

RAK, J. et al. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. **Cancer Metastasis Rev.** v.14, p. 263-277, 1995.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

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

REY, N.A. et al. A synthetic dinuclear copper (II) hydrolase and its potential as antitumoral: Cytotoxicity, cellular uptake, and DNA cleavage. **J. Inorg. Biochem.** 103, 1323-30, 2009.

ROGINSKY, V.A.; BARSUKOVA, T.K.; STEGMANN, H.B. Kinetics of redox interaction between substituted quinones and ascorbate under aerobic conditions. **Chem. Biol. Interac.** v. 121, p. 177-197, 1999.

RUSTIGI, A. K.; PODOLSKY, D. K. The molecular basis of colon cancer. **Annual Rev. Med.** v.43, p.61-68, 1996.

RUTTER, R.A. **Catálogo de plantas útiles de la Amazonia Peruana.** Yarinacocha, Peru: Instituto Lingüístico de Verano, 1990.

SAHAI, E. Mechanisms of cancer cell invasion. **Curr. Opin. Genet. Dev.** v.15, p.87-96, 2005.

SÁNCHEZ-VIESCA, F.; ROMO, J. Estafiatin, a new sesquiterpene lactone isolated from *Artemisia mexicana* (Willd). **Tetrahedron.** v.19, n.8, p.1285-291, 1963.

SANTA CRUZ Biotechnology Inc. Disponível em: <<http://www.scbt.com/>> Acesso em: 10 de janeiro de 2011.

SAVITZ, S. I.; DANIEL, B. A.; ROSENBAUM, M. D. Apoptosis in neurological disease. **Neurosurgery.** v.42, p.555-572, 1998.

SCHNERCH, D. et al. Cell cycle control in acute myeloid leukemia. **Am. J. Cancer Res.** v.2, n.5, 508-28, 2012.

SCHRODER, M.; KAUFMAN, R. J. The mammalian unfolded protein response. **Annu. Rev. Biochem.** v.74, p. 739-89, 2005.

SCISCIOLO, B.; LEOPOLD, D. J.; WALTON, D. C. Seasonal patterns of juglone in soil beneath *Juglans nigra* (black walnut) and influence of *J. nigra* on understory vegetation. **J. Chem. Ecol.** v.16, n.4, p. 1111-30, 1990.

SERPI, R. UNIVERSITY OF OULU. Faculty of Medicine. Department of Pharmacology and Toxicology. **Mechanism of benzo(a)pyreneinduced accumulation of p53 tumour suppressor protein in mouse.**Oulunyluopisto (Finland), 2003. 62f. Dissertação – University of Oulu. Faculty of Medicine. Department of Pharmacology and Toxicology. Oulu (Finland), 2003.

SERRANO, M.; HANNON, G. J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature.** v.366, p.704-707, 1993.

SESHADRI, P.; RAJARAM, A.; RAJARAM, R. Plumbagin and juglone induce caspase-3-dependent apoptosis involving the mitochondria through ROS generation in human peripheral blood lymphocytes. **Free.Radic. Biol. Med.** v.51, p. 2090-2107, 2011.

SHINTANI, T.; KLIONSKY, D.J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science.** v.306, p.990-5, 2004.

SHOJI, T. **Extraction of polyacetylene compounds.**PCC Technology group, Inc. Japan..JP 02172926. 26 dez. 1988, 04 jul. 1990.

SID, B. et al. Human thyroid carcinoma cell invasion is controlled by the low density lipoprotein receptor-related protein-mediated clearance of urokinase plasminogen activator. **Int J BiochemCellBiol.** v. 38, p. 1729-40, 2006.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.** v. 215, p. 213-219, 1993.

SIQUEIRA JUNIOR, J.M. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. **Atividade antitumoral de dihidrocucurbitacina B, um composto isolado de *Wilbrandiaebracteata*Cign: estudos *in vitro* e *in vivo*.** Florianópolis, 2007. 88f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2007.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J.Ethnopharmacol.** v.51, p.1-15,1996.

SOTO, A.M.; SONNENSCHNEIN, C. The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm? **Bioassays**. v.26, p.1097-1107, 2004.

SUN, X. et al. Selective induction of necrotic cell death in cancer cells by beta-lapachone through activation of DNA damage response pathway. **Cell Cycle**. v.5, n.17, p.2029-35, 2006.

TAN, M.L. et al. Programmed cell death pathways and current antitumor targets. **Pharmaceutical Res.** v. 26, n. 7, 2009.

TAPER, H.S. Reversibility of acid and alkaline deoxyribonuclease deficiency in malignant tumor cells. **J. Histochem. Cytochem.**v.29, p.1053-1060, 1981.

TAPER, H.S., KEYEUX, A.; ROBERFROID, M. Potentiation of radiotherapy by non-toxic pretreatment with combined vitamins C and K3 in mice bearing solid transplantable tumor. **Anticancer Res.**v.96, p.499-503, 1996.

TAPER, H.S.; BRUCHER, J.M.; FORT, L. Alkaline and acid nucleases activity in the tumors of the human central nervous system (histochemical study). **Cancer**. v.28, p.482-90, 1971.

TAPER, H.S.; DECKERS, C.O.; DECKERS-PASSAU, L.O. Increase in nuclease activity as a possible means for detecting tumor cell sensitivity to anticancer agents. **Cancer**.v.47, p.523-29, 1981.

TEDESCHI, G.; CHEN, S.; MASSEY, V. DT-diaphorase: redox potential, steady-state, and rapid reaction studies. **J. Biol. Chem.** v.270, p.1198-1204, 1995.

THATTE, U.; DAHANUKAR, S. Apoptosis – clinical relevance and pharmacological manipulation. **Drugs**. v.54, p.511-32, 1997.

TONG, W.M. et al. DNA strand break-sensing molecule poly (ADP-ribose) polymerase cooperates with p53 in telomere function, chromosome stability, and tumor suppression. **Mol. Cell. Biol.** v.21, p.4046-4054, 2001.

TRACHOOTHAM, D. et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenyl ethyl isothiocyanate. **Cancer Cell**. v.10, p. 241-52, 2006.

TSUJIMOTO, Y. et al. Involvement of Bcl-2 gene in human follicular lymphoma. **Science**. v.288, p.1440-3,1985.

TUNDO, P. et al. Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview. **Pure Appl. Chem**.v.72, n.7, p. 1207-1228, 2000.

VALDÉS, H. A. L.; REGO, H. P. L. *Bidenspilosa*Linné. **Rev. Cubana Plant. Med**.v. 1, p.28-33, 2001.

VAN DEN BERG, A. J. J.; LABADIE, R. P. Quinones. In: HARBORNE, J.B. (ed.). **Methods in plant biochemistry**. v.1. London: Academic, 1989. cap. 13, p. 451-491.

VASQUEZ, M. R. **Useful plants of Amazonian Peru**. Second Draft. Filed with USDA's National Agricultural Library. USA: 1990.

VAUX, D. Apoptogenic factors released from mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1813, p.546-50, 2011.

VAUX, D. L.; WEISSMAN, I. L.; KIM, S. K. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditiselegans*by human Bcl-2. **Science**. v.258, p.1955-7, 1992.

VENOGUPAL, M.et al. Synergistic antitumor activity of vitamins C and K3 on human urologic tumor cell lines. **Life Sci**. v.59, n.17, p. 1389-1400, 1996.

VERRAX, J. et al. Ascorbate potentiates the cytotoxicity of menadione leading to an oxidative stress that kills cancer cells by a non-apoptotic caspase-3 independent form of cell death. **Apoptosis**. v. 9, p. 223-233, 2004.

VERRAX, J. et al. In situ modulation of oxidative stress: a novel and efficient strategy to kill cancer cells.**Curr. Med. Chem**. v.16 , p. 1821-1830, 2009.

VERRAX, J. et al. New insights about the potential application of the association of vitamins C (sodium ascorbate) and K3 (menadione) as auxiliary therapy in cancer treatment. **Med. Chem. Rev.** v. 2, p. 277-282, 2005.

VERRAX, J. et al. Oxidative stress by ascorbate/menadione association kills K562 human chronic myelogenousleukaemia cells and inhibits its tumour growth in nude mice. **Biochem. Pharmacol.**v.72, p. 671-80, 2006.

VERRAX, J. et al. Redox-active quinones and ascorbate: an innovative cancer therapy that exploits the vulnerability of cancer cells to oxidative stress. **AnticancerAgents Med Chem.** v.11, p.213-21, 2011.

VERRAX, J.; CALDERON, P. B. Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects.**Free Radic. Biol. Med.** v.47, p. 32–40, 2009.

VERRAX, J.et al. The association of vitamins C and K3 kills cancer cells mainly by autschizis, a novel form of cell death. Basis for their potential use as coadjuvants in anticancer therapy. **Eur. J. Med. Chem.** v. 38, p. 451-457, 2003.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna.**Quím. Nova.** v. 29, n.2, p.326-337, 2006.

WAJANT, H. "The Fas signaling pathway: more than a paradigm." **Science.** v.296, n. 5573, p. 1635–6, 2002.

WANG, P. et al Quinone methide derivatives: important intermediates to DNA alkylating and DNA cross-linking actions. **Curr Med Chem.**v. 12, n.24, p. 2893-913, 2005.

WAT, C. K.; JOHNS, T.; TOWERS, G. H. N. Phototoxic and antibiotic activities of plants of the Asteraceae used in folk medicine. **J. Ethnopharmacol.** v.2, n.3, p.279-290, 1980.

WEISS, R. B. "The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?" **Semin. Oncol.** v.19, n.6, p.670-86, 1992.

WESTFALL, B.A.; RUSSELL, R.L.; AUYONG, T.K. Depressant agents from walnut hulls. **Science**. v. 17, p. 134 (3490):1617, 1961.

WILBUR, J.M.; SUBLETT, K.L. Juglone: a comparison of natural and synthetic products. **J. Chem. Educ.** v.54, n.3, p.156, 1977.

WILSON, S. et al. The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells. **Biochem. J.** v.388, p.967-72, 2005.

WOLF, J.K.; RAMIREZ, P.T. The molecular biology of cervical cancer. **Cancer Invest.** v.19, p.621-29, 2001.

WRIGHT, D. A. et al. The influence of water quality on the toxicity and degradation of juglone (5-hydroxy 1,4-naphthoquinone). **Environ. Technol.** v.28, n. 10, p. 1091-101, 2007.

WYLLIE, A. H. Apoptosis: an overview. **British Med. Bull.** v.53, p.451-65, 1997.

XU, H.L.; YU, X.F.; QU, S.C. et al. Anti-proliferative effect of Juglone from *Juglans mandshurica* Maxim on human leukemia cell HL-60 by inducing apoptosis through the mitochondria-dependent pathway. **Eur. J. Pharmacol.** v. 645, 14-22, 2010.

YAMASHITA, M. et al. Synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellanedae*. **Bioorg. Med. Chem.** v.17, p. 6286-91, 2009.

YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked. **Science**. v.275, p.1129-32, 1997.

YODER, J. I. Host-plant recognition by parasitic *Scrophulariaceae*. **Curr. Opin. Plant Biol.** v.4, n. 4, p.359-65, 2001.

YORIMITSU, T.; KLIONSKY, D.J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. **Cell Death Differ.** v.12, suppl. 2, p.1542-52, 2005.

YUAN, J. ; ADAMSKI, R.; CHEN, J. Focus on histone variant H2AX: to be or not to be. **FEBS Lett.** v. 584, p.3717-24, 2010.

YUAN, L.P. et al. Protect effects of total flavonoids of *Bidenspilosa* L. (TFB) on animal liver injury and liver fibrosis. **J.Ethnopharmacol.** v. 116, p.539 – 546, 2008.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna.**Chapecó: ARGOS, 2001, 523p.

ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. **Handb. Exp. Pharmacol.**, P.69-91, 2006.

ZHONG, X. et al. Silymarin causes caspases activation and apoptosis in K562 leukemia cells through inactivation of Akt pathway. **Toxicology.** v. 227, 211–216, 2006.

ZOU, X.; JI, Y.B.; GAO, S.Y. Effect of Juglone in Qinglongyi on cell cycle status and apoptosis in A-549 cells. **ESIAT Intern. Conf.** 736-738, 2010.

ANEXO A – primeira página do artigo publicado no periódico *The Journal of Supercritical Fluids*, volume 56, páginas 243 a 248 (2011), sob o título *SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity*. DOI: 10.1016/j.supflu.2010.12.011

J. of Supercritical Fluids 56(2011)243–248



Contents lists available at ScienceDirect

The Journal of Supercritical Fluids

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/supflu



SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity

M.R. Kviecinski^a, P. Benelli^b, K.B. Felipe^a, J.F.G. Correia^a, C.T. Pich^a, S.R.S. Ferreira^b, R.C. Pedrosa^{a,*}

^a Department of Biochemistry, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, CEP, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil

^b Department of Chemical and Food Engineering, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, CEP, 88040-970 Florianópolis, SC, Brazil

^c Technology Center, Universidade Federal de Santa Catarina, Araranguá, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2010

Received in revised form

18 December 2010

Accepted 19 December 2010

Keywords:

Bidens pilosa

Polyacetylenes

Antitumor

Supercritical fluid extraction

ABSTRACT

Bidens pilosa L. is a plant considered medicinal by some South American cultures. It contains polyacetylenes which may be the constituents responsible for its antitumor activity. Extracts obtained by hydroethanol maceration (HCE) and supercritical fluid extraction (SFE) were monitored for antitumor activity and the presence of polyacetylenes in the constitution. Both extracts killed concentration-dependently the MCF-7 cells in culture, although the SFE extract presented superior cytotoxic activity. The SFE presented $IC_{50} = 437$ (428–446) μ g/mL in 24 h of incubation, decreasing to $IC_{50} = 291$ (282–299) μ g/mL at 48 h. The HCE started causing DNA cleavage at 160 μ g/mL, while the SFE extract started at 40 μ g/mL, a concentration enough to initiate the *in vitro* cleavage. The presence of polyacetylenes as the major compounds in SFE was confirmed by TLC chromatography combined with UV–vis analyses. Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice were used for the antitumor study. Animals were divided in five groups: normal, negative control, positive control (Doxorubicin 0.05 mg/kg), test group HCE and test group SFE (100 mg/kg b.w. per day). After 9 days of treatment, 50% of randomly chosen animals from each group were sacrificed for the study. The parameters evaluated were: body weight, abdominal circumference, volume of ascitic fluid and tumor cells, viable and nonviable tumor cell count, determination of mean survival time and increased life span. Both extracts presented antitumor activity, but SFE reduced more the volumes of ascites fluid and the tumor cells (4 \pm 1 and 1 \pm 0.4 mL, respectively), while caused higher mean survival time (17 days) and increased life span (\sim 31%). The results suggest the importance of the polyacetylenes from *B. pilosa* as leader molecules to contribute to a new anticancer drug by using the supercritical technology.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Since the ancient times, the plants have been used for medicinal purposes. The plant kingdom is indeed responsible for the largest share of chemical diversity known and recorded in the literature [1]. Actually, chemical and pharmacological studies involving isolated compounds and other plant derived ones, they have appeared in the scientific set for therapeutic activities despite the high costs of the researches and the synthetic drug development [2]. *Bidens pilosa* Linné (Asteraceae) is a medicinal plant with a wide occurrence in the tropical regions. It has a long history of popular use by Amazonian Indians, Caribbean, Cuban folk and Chinese medicine for several reasons including the treatment of tumors, malaria and liver diseases. The hydroethanol crude extract and particularly its chloroform fraction already demonstrated to inhibit the Ehrlich

ascites carcinoma *in vitro* and in mice [3–5]. Previous studies have revealed that the plant presents a broad phytochemical constitution with little peculiarities according to the place where it is harvested. The major compounds already identified are flavonoids and polyacetylenes [6].

Taking *B. pilosa* as a potential source for a novel useful drug to treat cancer, a special interest arose for its polyacetylenic compounds. The polyacetylenes comprise a relative rare class of long chain acetylene-derived compounds. They are often unstable hydrocarbons that strongly absorb long-wave UV radiation; their activities may be altered upon exposure to light (photoactivation). Considering acetylenes are often very reactive gases, it is interesting to realize how polyacetylenes may be sufficiently stable to be extracted, isolated and characterized through phytochemical standard techniques. Actually, nowadays more than 1000 polyacetylenes are now known as plant products [7,8]. They contain unique carbon–carbon triple bond functionality, which is intriguing for their wide variety of activities and economic potential. Most polyacetylenes are poisonous and they have been considered phy-

* Corresponding author. Tel.: +55 48 37215048.
E-mail address: rcped@ctc.ufsc.br (R.C. Pedrosa).

ANEXO B – primeira página do artigo publicado no periódico *Biochemical and Biophysical Research Communications*, volume 421, páginas 268 a 273 (2012), sob o título *Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells*. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.150

Biochemical and Biophysical Research Communications 421 (2012) 268–273



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells

M.R. Kwiecinski^a, R.C. Pedrosa^a, K.B. Felipe^a, M.S. Farias^a, C. Glorieux^b, M. Valenzuela^b, B. Sid^b, J. Benites^{c,d}, J.A. Valderrama^{d,e}, J. Verrax^d, P. Buc Calderon^{b,c,d,e,*}

^a Laboratório de Regeneração Experimental, Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Carlos, Fernandópolis, Brazil

^b Toxicology and Cancer Biology Research Group, Louvain Drug Research Institute, Université Catholique de Louvain, 73 Avenue E. Mounier, CITEC 7309, 1200 Brussels, Belgium

^c Departamento de Ciencias Químicas y Farmacológicas, Universidad Arturo Prat, 2120 Avenida Arturo Prat, Iquique, Chile

^d Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 306, Santiago, Chile

^e Instituto de Ecofarmacología (ICE), Universidad Arturo Prat, Casilla 2020, Iquique, Chile

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 March 2012
Available online 6 April 2012

Keywords:
Ascorbate
Cell migration
Juglone
Proliferation
Redox impairment
T24 cells

ABSTRACT

The effects of juglone on T24 cells were assessed in the presence and absence of ascorbate. The EC₅₀ value for juglone at 24 h decreased from 285 μM to 8.3 μM in the presence of ascorbate. In juglone-treated cells, ascorbate increased ROS formation (4-fold) and depleted GSH (68%). N-acetylcysteine or catalase mitigated the juglone/ascorbate-mediated effects, highlighting the role of oxidative stress in juglone cytotoxicity. Juglone alone or associated with ascorbate did not cause caspase-3 activation or PARP cleavage, suggesting necrosis-like cell death. DNA damage and the mild ER stress caused by juglone were both enhanced by ascorbate. In cells treated with juglone (1–5 μM), a concentration-dependent decrease in cell proliferation was observed. Ascorbate did not impair cell proliferation but its association with juglone led to a clonogenic death state. The motility of ascorbate-treated cells was not affected. Juglone slightly affected motility, but cells lost their ability to migrate most notably when treated with juglone plus ascorbate. We postulate that juglone kills cells by a necrosis-like mechanism inhibiting cell proliferation and the motility of T24 cells. These effects are enhanced in the presence of ascorbate.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) is a pigment found in the roots, wood, bark, leaves and nuts of *Juglans* sp. (*Juglandaceae*) walnut trees [1]. In its natural environment, juglone has a critical ecological function, acting as an allelopathic compound, very effective in the plant competition fight [2]. Several studies have shown potential anticancer activity of juglone against a representative panel of human tumor cell lines [3–5]. Moreover, juglone had *in vivo* anticancer and antidiabetic activities against an experimental chemically resistant melanoma, B16F1, in C57BL/6J mice [6]. When considering the type of cell death induced by juglone, the final outcome seems to be dependent on the exposed cell lines, which

may vary in terms of sensitivity: juglone triggered apoptosis in SGC-7901 gastric cancer cells [7], HL-60 leukemia cells [8] and A549 adenocarcinomic alveolar basal epithelial cells [9]; however, necrosis was observed in B16F1 melanoma cells exposed to juglone [1].

In the search for new redox active chemotherapeutic agents, we decided to explore a particular vulnerability of cancer cells by impairing their redox status. Indeed, as a result of metabolic alterations and the activity of oncogenes, cancer cells often exhibit high levels of reactive oxygen species (ROS), which can stimulate cell proliferation and promote genetic instability [10]. In addition, cancer cells have low antioxidant defense activity [11]. These biochemical differences between normal and cancer cells represent a specific vulnerability that can be selectively targeted for cancer therapy. In this context, previous studies have shown that redox active quinones associated with pharmacological doses of ascorbate generate redox cycling that potentiates, both *in vivo* and *in vitro*, the anti-tumor effects of quinone [12–15]. It should be noted that because of an over-expression of GLUT1 glucose transporters, cancer cells may increase the uptake of vitamin C and accumulate ascorbate [16,17].

Because the cytotoxicity of juglone has been associated with the ability to induce oxidative stress [8], we hypothesized that ascorbate may enhance the redox cycling of this quinone-bearing

* Corresponding author at: Toxicology and Cancer Biology Research Group, Louvain Drug Research Institute, Université Catholique de Louvain, 73 Avenue E. Mounier, CITEC 7309, 1200 Brussels, Belgium. Tel.: +32 2 7647259.

E-mail addresses: mkwiec@in.sci.uoi.br (M.R. Kwiecinski), rcpedrosa@uoi.br (R.C. Pedrosa), kafelab@uoi.br (K.B. Felipe), mstfarias@uoi.br (M.S. Farias), christophe.glorieux@uclouvain.be (C. Glorieux), mvalenzuela@uclouvain.be (M. Valenzuela), benites@uclouvain.be (B. Sid), jbenites@uclouvain.be, jbenites@uclouvain.be (J.A. Valderrama), jvalderrama@uclouvain.be (J.A. Valderrama), jverrax@uclouvain.be (J. Verrax), pedrosabuc@uclouvain.be (P. Buc Calderon).