

GABRIELA MENEZES MARCHETTI

**“ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ARUCANOLÍDEO,
GERMACRANOLÍDEO ISOLADO DE *CALEA*
PINNATIFIDA.”**

Campinas, 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

GABRIELA MENEZES MARCHETTI

**“ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ARUCANOLÍDEO,
GERMACRANOLÍDEO ISOLADO DE
CALEA PINNATIFIDA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Gabriela Menezes Marchetti
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutora em
Biologia Celular e Estrutural, na área de
Biologia Celular.

Orientador: Dr. João Ernesto de Carvalho
Co-Orientadora: Dra. Mary Ann Foglio

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M332a	<p>Marchetti, Gabriela Menezes, 1983- Atividade antitumoral do Arucanolídeo, germacranolídeo isolado de <i>Calea pinnatifida</i> / Gabriela Menezes Marchetti. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: João Ernesto de Carvalho. Coorientador: Mary Ann Foglio. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Arucanolídeo. 2. Câncer. 3. <i>Calea pinnatifida</i>. 4. Melanoma. 5. Germacranolídeo. 6. Agentes antineoplásicos. I. Carvalho, João Ernesto de. II. Foglio, Mary Ann. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Antitumor activity of Arucanolide, germacranolide isolated from
Calea pinnatifida

Palavras-chave em Inglês:

Arucanolide

Cancer

Calea pinnatifida

Melanoma

Germacranolide

Antineoplastic agents

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

João Ernesto de Carvalho [Orientador]

Durvanei Augusto Maria

Patrícia da Luz Moreira

Cristina Pontes Vicente

Carina Denny

Data da defesa: 31-08-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 31 de Agosto de 2012

BANCA EXAMINADORA

Dr. João Ernesto de Carvalho (Orientador)



Assinatura

Dr. Durvanei Augusto Maria



Assinatura

Dra. Patrícia da Luz Moreira



Assinatura

Dra. Cristina Pontes Vicente



Assinatura

Dra. Carina Denny



Assinatura

Dra. Patrícia Correa Dias

Assinatura

Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder

Assinatura

Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes

Assinatura

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo
menos outros dez”
(George Bernard Shaw)*

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei
para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus, não sou o que era antes”
(Martin Luther King)*

Agradecimentos

Primeiramente à minha Mãe, pelo apoio e amor incondicional. À minha irmã de sangue, Fabi, por ter dito sempre as verdades que eu precisava ouvir e aos meus Avós, Tios, Tias e primos por estarem sempre presente na vida.

À minha irmã de coração, Pepe, por ter me apoiado, me escutado, e por estar sempre presente.

Às minhas grandes amigas, Ana Paula, Karen e Mari que mesmo não estando geograficamente perto, estiveram comigo sempre que eu precisei, mas principalmente quando eu não precisei.

Às queridas Stefanie e Tânia, por estarem perto, longe, junto, separado, enfim por tudo!

Aos meus amigos de São Paulo, Carla, Marcela, Tábita, Laura, Alvinho e Ex-piga, por entender que a amizade suporta distâncias.

Aos amigos Digão e Goiaba, com que eu sempre pude e poderei contar.

Ao pessoal do laboratório pelas conversas na cozinha e ajuda nos experimentos, com destaque para a Sirlene, sempre disposta a ajudar e a Vanessa, Michelle, Viviane, Débora, Fioritinho, Leilaniinha e Humberto por serem amigos e por me ensinarem que também existe amizade verdadeira no laboratório.

Ao pessoal da Dfito pelas conversas e ajuda, em especial à Karina, pela ajuda no isolamento do Arucanolídeo.

Aos chicos de Salamanca, principalmente a Sara, Ana e Ale, por todas as ajudas no laboratório e por me fazerem me sentir em casa.

Aos amigos que não foram citados, mas que fizeram parte da minha vida sempre.

Ao Prof. Dr. Faustino Mollinedo, por abrir as portas de seu laboratório, e me orientar nas etapas de avaliação de mecanismo de morte celular do arucanolídeo.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho pela orientação prestada, pelo apoio, pela amizade e por acreditar sempre no meu potencial, mesmo com a minha teimosia.

E à Profa. Dra. Mary Ann Foglio, pelas conversas na cozinha, amizade, viagens e co-orientação, importante para o desenvolvimento desse projeto.

À Capes e a Fapesp pela bolsa fornecida nesses anos de trabalho.

À UNICAMP e à Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural por possibilitar o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Resumo

A pesquisa fitoquímica de espécies vegetais tem originado um grande número de novas substâncias e trabalha em conjunto com a pesquisa farmacológica que é responsável por apontar o potencial terapêutico dessas moléculas e ou de seus derivados. Trabalhos anteriores revelaram que o extrato bruto diclorometânico das folhas de *Calea pinnatifida* (Asteraceae) apresenta atividade antiproliferativa, em cultura de células tumorais humanas e antitumoral em modelos *in vivo* de Tumor Ascítico e Sólido de Ehrlich. Os estudos fitoquímicos revelaram a presença de germacranolídeos (lactonas sesquiterpênicas) entre os princípios ativos responsáveis pela atividade antitumoral. Este trabalho teve como objetivo isolar e determinar o mecanismo de ação do arucanolídeo. Primeiramente o arucanolídeo foi obtido através do fracionamento do extrato bruto diclorometânico e precipitação de graxas e clorofila com o uso de uma solução de acetato básico de chumbo. Em cultura de células tumorais humanas de diferentes origens o arucanolídeo apresentou atividade citocida para todas, com seletividade para melanoma e rim. Os estudos sobre o tipo de morte celular revelaram que o arucanolídeo é capaz de induzir apoptose, pela via intrínseca, através da ativação de caspases, com geração de radicais livres em células de glioblastoma U-118 MG e de melanoma SK-MEL-2. Já nas células HeLa (adenocarcinoma de cervix) o mecanismo pelo qual o arucanolídeo atua pode ser diferente, pois a via intrínseca não é tão importante, nem a geração de radicais livres, sugerindo o envolvimento da via extrínseca de apoptose. O uso de células HeLa transfectadas com o gene de Bcl-xl, não interferiu na indução de apoptose pelo arucanolídeo, comprovando a pouca importância da mitocôndria no processo apoptótico nessa linhagem, enquanto nas células SK-MEL-2 Bcl-xL a indução de apoptose foi significativamente reduzida. Nas células melanoma murino B16-F10, o arucanolídeo induziu apoptose através da ativação das caspases. No entanto, em modelo animal utilizando essa linhagem, a redução do desenvolvimento tumoral não foi dependente do processo apoptótico, sugerindo que outro mecanismo de ação está envolvido na atividade *in vivo*. No modelo de metástase onde as células de melanoma B16-F10 foram inoculadas diretamente na corrente sanguínea, foi observada uma tendência na redução das metástases pulmonares no grupo tratado com arucanolídeo, com poucos sinais de toxicidade hepática. Com tudo isso, pode-se concluir que o arucanolídeo é capaz de induzir apoptose em células tumorais humanas e murinas, podendo atuar pela via intrínseca e ou extrínseca de apoptose, dependendo do tipo celular avaliado. A atividade antitumoral *in vitro* foi confirmada com a redução do crescimento tumoral *in vivo*, comprovando o potencial farmacológico desse composto.

Abstract

Plants have provided a large number of new substances and many drugs have based for the synthesis of them. The dichloromethane crude extract presented antiproliferative activity in human tumor cell culture and *in vivo* antitumor activity against ascitic and solid Ehrlich tumor models. The results obtained with *Calea pinnatifida*, species from Asteraceae family, may result in the development of new chemotherapeutic agents by the presence of germacranolides (sesquiterpene lactones) in their chemical composition. The arucanolide was obtained by the fractionation of crude dichloromethane extract after the precipitation of chlorophyll and graxes using a lead acetate basic solution. Arucanolide shows antiproliferative activity *in vitro* against human tumor cells lines with selectivity for melanoma and kidney. It was proved that the arucanolide is capable of inducing apoptosis, by the intrinsic pathway, through caspase activation, generating free radicals in U-118 MG glioblastoma and SK-MEL-2 melanoma cells. At the adenocarcinoma of cervix cells HeLa the mechanism by which arucanolide acts may be different, because the intrinsic pathway seems to be not as important as in the others cells, suggesting the involvement of the extrinsic pathway of apoptosis. The use of HeLa cells transfected with the gene of Bcl-xl, has not hindered the induction of apoptosis in these cells, showing the lack of importance of mitochondria in this apoptotic process, while in SK-MEL-2 Bcl-xL cells, the arucanolide treatment significantly reduced the apoptosis induction. In the B16-F10 cells, the arucanolide induces caspase-dependent apoptosis *in vitro* and has antitumor activity *in vivo* against the same cell line, in a subcutaneous melanoma model. The apoptosis induction was not detected *in vivo*, suggesting that arucanolide could act by preventing the tumor cell proliferation *in vivo*. At the model of experimental metastasis with the melanoma cell line B16-F10 there is a tendency to reduce lung metastasis in mice treated with arucanolide, showing few signs of liver toxicity. With all this results, we conclude that the arucanolídeo is able to induce apoptosis in human and murine tumor cells lines, and its death pathway, depends on the cell type evaluated. This compound may act by intrinsic or extrinsic apoptosis pathways. The arucanolide also reduces tumor growth *in vivo* and it is a promising new chemotherapeutic for clinical research.

Lista de Abreviaturas

- 5-FU: 5-Fluorouracil
- 7-AAD: *7-Amino-actinomycin D*
- 786-0: linhagem celular de adenocarcinoma de rim
- Akt: *Protein Kinase B (PKB)*
- Apaf-1: *Apoptotic Protease Activating Factor 1*
- ARU: Arucanolídeo
- ATP: Adenosina Trifosfato
- B16-F10: linhagem celular de melanoma murino
- Bad: *Bcl-2-associated death promoter*
- Bak: *Bcl-2 homologous-Antagonist-killer*
- Bax: *Bcl-2-associated X protein*
- Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*
- Bcl-XL: *B-cell Lymphoma-extra Large*
- BID: *BH3 Interacting Domain Death Agonist*
- CCD: Cromatografia de camada delgada
- CCCP: *Carbonyl cyanide m-chlorophenyl*
- CDKs: Ciclinas dependentes de quinases
- CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
- Cis-38: Cisteína na posição 38
- c-Met: *MET Transforming gene*
- COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- COX-2: Ciclo-oxigenase-2
- CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
- DAP3: proteína associada a morte 3
- DFT: Divisão de Farmacologia e Toxicologia
- DHE : dihidroetidina
- DI: densidade de inoculação
- DISCO: complexo de sinalização indutor de morte
- DMEN: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DiOC₆: 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodido

DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
DTT: Ditioneitol
EBD: Extrato Bruto Diclorometânico
EDTA: Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
EMT: *Epithelial to Mesenchymal Transition*
FA: Fosfatase Alcalina
FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Fas: *TNF receptor superfamily, member 6*
Fr. Act: Fração Acetato obtida do EBD
GADD153: *oxidative stress or anticancer agent inducible gene*
GSH: Glutathione
HE: Hematoxilina Eosina
HeLa: linhagem celular de adenocarcinoma de cervix
HeLa Bcl-xL: linhagem celular de adenocarcinoma de cervix transfectada com o gene de Bcl-xL
HGF: *Hepatocyte growth factor*
HT-29: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal
IκB: Inibidor do fator de transcrição NF-κB
IKK: Quinase de IκB
INCA: Instituto Nacional do Câncer
IP: Iodeto de Propídio
IPS-1: estimulador promotor de interferon-β 1
JNK: Jun-quinase N-terminal
LC-3: *Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A*
M14: linhagem celular de melanoma
mAb: Anticorpo monoclonal
NAC: N-acetil-cisteína
MALME-3: linhagem celular de melanoma
MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MCF-7: linhagem celular de adenocarcinoma de mama

NCI: *National Cancer Institute*

NCI-ADR/RES: linhagem celular de adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas

NCI-H460: linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão tipo não pequenas células

NF- κ B: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NO: Óxido Nítrico

OMS: Organização Mundial da Saúde

OVCAR-3: linhagem celular de adneocarcinoma de ovário

p53: proteína 53 (53 kDa)

PA: Persulfato de amônia

PARP: *Poly (ADP-ribose) polymerase*

PBS: tampão fosfato-salina

PC-3 linhagem celular de adenocarcinoma de próstata

PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PMSF: *Phenylmethanesulfonyl fluoride*

PVDF: *Polyvinylidene fluoride*

RE: Retículo Endoplasmático

RMN: ressonância magnética nuclear

RNS: Espécies reativas de nitrogênio

RNA: Ácido Ribonucleico

ROS: *Reactive Oxygen Species*

RPMI: meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SFB: Soro Fetal Bovino

Smac: Pequeno ativador de caspases derivado da mitocôndria

SK-MEL-2: linhagem celular de melanoma

SK-MEL-2 Bcl-xL: linhagem celular de melanoma transfectada com o gene de Bcl-xL

SK-MEL-5: linhagem celular de melanoma

SK-MEL-28: linhagem celular de melanoma

SNC: Sistema Nervoso Central

SRB: Sulforrodamina B

SR-VAD-FMK: *Sulforhodamine Derivative of Valylalanyl aspartic Acid Fluoromethyl Ketone*

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*

T: média das absorbâncias das células tratadas

T0 : média das absorbâncias das células controle

TBS: Tampão Tris Salina

TCA: Ácido Tricloroacético

TEMED: *Tetramethylethylenediamine*

TGI: *Total Growth Inhibition*

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

TRAIL: *TNF-related Apoptosis-inducing Ligand*

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

U-118 MG: linhagem celular de glioblastoma

U-251: linhagem celular de glioblastoma

UACC-62: linhagem celular de melanoma

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

Vero: linhagem celular de fibroblasto normal de rim de macaco verde

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

Índice de Figuras

Figura 1. Alvos terapêuticos dos Hallmarks do Câncer	4
Figura 2. Foto de um espécime de <i>Calea pinnatifida</i> no campo experimental CPQBA.	14
Figura 3. Atividade antiproliferativa do Extrato Bruto Diclorometânico de <i>C. pinnatifida</i>	15
Figura 4. Atividade antitumoral do EBD de <i>Calea pinnatifida</i> em tumor ascítico de Ehrlich.	16
Figura 5. Atividade antitumoral do EBD de <i>Calea pinnatifida</i> em tumor sólido de Ehrlich	16
Figura 6. Estrutura química de um germacranolídeo	18
Figura 7. Estrutura química do Partenolídeo.	18
Figura 8. Estrutura de um grupo α-metileno-γ-lactona.	18
Figura 9. Estrutura química do Arucanolídeo	20
Figura 10: Placa de 96 compartimentos usados no ensaio da SRB	32
Figura 11. Cromatografia em camada delgada (CCD) do EBD e da fração acetato (FrAct).	45
Figura 12. Atividade antiproliferativa das amostras A: EBD e B: FrAct.	45
Figura 13. Fragmentograma (espectrômetro de massas) do Arucanolídeo.	47
Figura 14. Espectro de RMN¹H(499,88 MHz) em CDCl₃ para o composto Arucanolídeo.	48
Figura 15. Espectro de RMN¹³C (125,69 MHz) em CDCl₃ para o composto Arucanolídeo.	48
Figura 16. Espectro de RMN¹³C (125,69 MHz) em CDCl₃ obtido na sequência de pulso DEPT para o composto Arucanolídeo.	49
Figura 17. Espectro de RMN¹H (499,88 MHz) x ¹³C (125,69 MHz) em CDCl₃ obtido na sequência de pulso HSQC para o composto Arucanolídeo.	49
Figura 18. Espectro de RMN¹H (499,88 MHz) x ¹³C (125,69 MHz) em CDCl₃ obtido na sequência de pulso HMBC para o composto Arucanolídeo.	50

Figura 19. Espectro de RMN¹ H x ¹H (499,88 MHz) em CDCl₃ obtido na sequência de pulso COSY para o composto Arucanolídeo.	50
Figura 20. Curva de diferentes concentrações do arucanolídeo.	52
Figura 21. Atividade antiproliferativa do Arucanolídeo e Partenolídeo	53
Figura 22. Mecanismos de atividade pró-apoptóticas do Partenolídeo	54
Figura 23. Ciclo celular das células U-118	56
Figura 24. Exposição de fosfatidilserina e permeabilização da membrana plasmática das células U-118	57
Figura 25. Western Blotting nas células U-118 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL em diversos tempos	58
Figura 26. Western Blotting para subunidade p65 do NF-κB e β-actina nas células U-118 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL em diversos tempos.	59
Figura 27. Geração de ROS e avaliação do potencial de membrana mitocondrial das células U-118	60
Figura 28. Geração de ROS e avaliação do potencial de membrana mitocondrial das células U-118 tratadas com CCCP 100µM durante 24h.	61
Figura 29. Geração de radicais livres, avaliação do potencial de membrana mitocondrial e ciclo celular das células U-118	62
Figura 30. Western Blotting caspase-4 e β-actina nas células U-118 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL em diversos tempos.	64
Figura 31. Western Blotting LC-3B e β-actina nas células U-118 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL em diversos tempos.	64
Figura 32. Fotomicrografia nas células U-118	65
Figura 33. Fotomicrografia nas células U-118 tratadas com Z-VAD-FMK	66
Figura 34. Ciclo celular das células HeLa	68

Figura 35. Exposição de fosfatidilserina e permeabilização da membrana plasmática das células HeLa	69
Figura 36. Western Blotting nas células HeLa tratadas com arucanolideo 5µg/mL em diversos tempos	70
Figura 37. Western Blotting para LC-3B e β-actina nas células HeLa tratadas com arucanolideo 5µg/mL em diversos tempos	70
Figura 38. Geração de radicais livres, avaliação do potencial de membrana mitocondrial e ciclo celular das células HeLa	72
Figura 39. Vias Pró- e Anti-Apoptóticas das proteínas da família BCL-2.	74
Figura 40. Ciclo celular das células HeLa Bcl-xL	75
Figura 41. Exposição de fosfatidilserina e permeabilização da membrana plasmática das células HeLa Bcl-xL	76
Figura 42. Western Blotting nas células HeLa Bcl-xL tratadas com arucanolideo 5µg/mL em diversos tempos	77
Figura 43. Atividade antiproliferativa do Partenolídeo e Cisplatina	78
Figura 44. Atividade antiproliferativa do Arucanolídeo	79
Figura 45. Ciclo celular das células SK-MEL-2	80
Figura 46. Exposição de fosfatidilserina e permeabilização da membrana plasmática das células SK-MEL-2	81
Figura 47. Western Blotting nas células SK-MEL-2 tratadas com arucanolideo 5µg/mL em diversos tempos	82
Figura 48. Geração de radicais livres, avaliação do potencial de membrana mitocondrial e ciclo celular das células SK-MEL-2	84
Figura 49. Western Blotting LC-3 e β-actina nas células SK-MEL-2 tratadas com arucanolideo 5µg/mL em diversos tempos.	85
Figura 50. Fotomicrografia nas células SK-MEL-2	86

Figura 51. Ciclo celular das células SK-MEL-2 Bcl-xL	87
Figura 52. Ciclo celular das células SK-MEL-2 Bcl-xL	88
Figura 53. Ativação de multicaspases das células SK-MEL-2 Bcl-xL	89
Figura 54. Sugestão de Via apoptótica nas células HeLa	92
Figura 55. Sugestão de via apoptótica nas células SK-MEL-2 e U-118	93
Figura 56. Ciclo celular das células B16-F10	94
Figura 57. Ativação de multicaspases das células B16-F10	95
Figura 58. Peso Relativo do Tumor subcutâneo tratado com o arucanolídeo	96
Figura 59. Fotomicrografia do tumor subcutâneo de B16-F10 do controle negativo	97
Figura 60. Fotomicrografia do tumor subcutâneo de B16-F10 do controle positivo	98
Figura 61. Fotomicrografia do tumor subcutâneo de B16-F10 tratado com arucanolídeo 15mg/Kg	99
Figura 62. Fotografias de metástases pulmonares causadas pelas células B16-F10.	101
Figura 63. Dosagem da melanina extraída dos pulmões	102
Figura 64. Ganho de peso dos animais tratados com arucanolídeo após 18 dias	103
Figura 64. Peso Relativo dos Órgãos (%)	106

Índice de Tabelas

Tabela 1. Linhagens Celulares Tumorais utilizadas nos Ensaio<i>s</i> in vitro. _____	10
Tabela 2. Valores de TGI (inibição de crescimento total) do extrato bruto de <i>C. pinnatifida</i> _____	15
Tabela 3: Linhagens celulares utilizadas nos testes de atividade anticâncer. _____	30
Tabela 4: Quantidade de Acrilamida e Água Deionizada necessário para cada porcentagem de gel. _____	37
Tabela 5. Valores de TGI (Total Growth Inhibition) das amostras obtidas no fracionamento da Fração Acetato (FrAct). _____	46
Tabela 6. Dados espectrais de RMN¹H e ¹³C do Arucanolídeo (C₂₁H₂₆O₈) (11 Tesla, CDCl₃). _____	51
Tabela 7. Valores de TGI (Total Growth Inhibition) do Arucanolídeo e do Partenolídeo. _____	53
Tabela 8: Porcentagem das fases do ciclo celular das células U118 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, em diversos tempos. _____	57
Tabela 9. Porcentagem de células U118 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com Anexina-V e Iodeto de Propídio. _____	58
Tabela 10. Porcentagem de células U118 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com DHE (ROS) e Dioc₆ ($\Delta\Psi_m$ - Potencial membrana mitocondrial). _____	61
Tabela 11: Porcentagem de células U118 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com DHE (ROS) e Dioc₆ ($\Delta\Psi_m$ - Potencial membrana mitocondrial). _____	63
Tabela 12: Valores das fases do ciclo celular das células U118 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL. _____	63
Tabela 13. Porcentagem das diversas fases do ciclo celular das células HeLa tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, em diversos tempos. _____	69
Tabela 14. Porcentagem de células HeLa tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com Anexina-V e Iodeto de Propídio. _____	70

<i>Tabela 15. Porcentagem de células HeLa tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com DHE (ROS) e Dioc₆ ($\Delta\Psi_m$ - Potencial membrana mitocondrial).</i>	71
<i>Tabela 16. Valores das fases do ciclo celular das células HeLa tratadas com arucanolídeo 5µg/mL.</i>	71
<i>Tabela 17. Porcentagem das diversas fases do ciclo celular das células HeLa Bcl-xL tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, em diversos tempos.</i>	74
<i>Tabela 18. Porcentagem de células HeLa Bcl-xL tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com Anexina-V e Iodeto de Propídio.</i>	76
<i>Tabela 19. Valores de TGI (Total Growth Inhibition) nas linhagens de melanoma.</i>	79
<i>Tabela 20. Valores das fases do ciclo celular das células SK-MEL-2 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, em diversos tempos.</i>	80
<i>Tabela 21. Porcentagem de células SK-MEL-2 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com Anexina-V e Iodeto de Propídio.</i>	81
<i>Tabela 22. Porcentagem de células SK-MEL-2 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com DHE (ROS) e Dioc₆ ($\Delta\Psi_m$ - Potencial membrana mitocondrial).</i>	85
<i>Tabela 23. Valores das fases do ciclo celular das células SK-MEL-2 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL.</i>	85
<i>Tabela 24. Valores das fases do ciclo celular das células SK-MEL-2 Bcl-xL tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, em diversos tempos.</i>	88
<i>Tabela 25. Valores das fases do ciclo celular das células SK-MEL-2 Bcl-xL tratadas com arucanolídeo 10µg/mL, em diversos tempos.</i>	89
<i>Tabela 26. Porcentagem de células SK-MEL-2 Bcl-xL tratadas com arucanolídeo 10µg/mL marcadas com SR-VAD-FMK e 7-AAD</i>	89
<i>Tabela 27. Valores das fases do ciclo celular das células B16-F10 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, em diversos tempos.</i>	94
<i>Tabela 28. Porcentagem de células B16-F10 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL marcadas com SR-VAD-FMK e 7-AAD</i>	95

Tabela 29. Número Total de Leucócitos ($10^9/L$) dos animais tratados com arucanolídeo	104
Tabela 30. Contagem de Eritrócitos ($10^{12}/L$) dos animais tratados com arucanolídeo	105
Tabela 31. Contagem de Plaquetas ($10^9/L$) dos animais tratados com arucanolídeo	105
Tabela 32. Valores de transaminase glutâmica oxalacética (TGO) dos animais (IU/l)	107
Tabela 33. Valores de transaminase glutâmica pirúvica (TGP) dos animais (IU/L)	108
Tabela 34. Valores de uréia dos animais (mg/dL)	108

Sumário

Introdução	1
Câncer e mecanismos de morte celular	3
Modelos de Estudo de Câncer In vitro e In vivo	8
Descoberta de Fármacos Anticâncer	11
O gênero <i>Calea</i> e seu potencial farmacológico	13
Atividade anticâncer de <i>Calea pinnatifida</i>	14
Germacranolídeos e seu potencial anticâncer	17
Objetivos	21
Objetivo geral	23
Objetivos Específicos	23
Metodologia	25
Fracionamento e isolamento do arucanolídeo	27
Material Vegetal	27
Obtenção do extrato bruto	27
Limpeza com Acetato de Chumbo	27
Fracionamento por Cromatografia de Coluna Clássica	27
Análise Qualitativa e Quantitativa por Cromatografia Gasosa	28
Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	28
Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	28
Ensaio Farmacológicos “in vitro”	29
Cultivo celular	29
Descongelamento das células	29
Congelamento das células	30
Atividade antiproliferativa em cultura de células	31
Inóculo das células	31
Preparo e aplicação das amostras – Ensaio da Sulforradamina B (SRB)	31
Análise dos resultados	33
Citometria de Fluxo	33
Análise do Ciclo Celular	34
Avaliação da externalização de fosfatidilserina e permeabilização da membrana celular.	34
Análise de Multicaspases	35

Análise da geração de ROS e perda de potencial mitocondrial por citometria de fluxo. _____	35
Western Blotting _____	36
Extração de Proteínas _____	36
Dosagem de Proteínas _____	37
Preparação de géis _____	37
Preparação da amostras (proteínas) _____	38
Transferência à membrana _____	38
Imunoblotting _____	39
Revelação da membrana _____	39
Microscopia dos cultivos celulares _____	39
Ensaio Farmacológico “in vivo” _____	40
Animais _____	40
Avaliação da Atividade Anticâncer em Modelo Murino: Melanoma B16F10 _____	40
Modelo de Tumor sólido _____	40
Modelo experimental de metástase no pulmão _____	40
Dosagem de Melanina _____	41
Avaliação dos parâmetros sanguíneos e bioquímicos dos animais _____	41
Resultados e Discussão _____	43
Isolamento do Arucanolídeo _____	45
Precipitação com acetato de chumbo _____	45
Purificação da Fração Acetato (FrAct) _____	46
Dosagem do Arucanolídeo _____	52
Atividade do Arucanolídeo em células de glioblastoma U-118 MG _____	56
Atividade do Arucanolídeo nas células de adenocarcinoma de cervix HeLa e HeLa transfectadas com BCL-XL _____	68
Atividade do arucanolídeo em células de melanoma _____	78
Atividade do arucanolídeo na linhagem de melanoma SK-MEL-2 e SK-MEL-2 transfectadas com BCL-XL _____	80
Indução de Apoptose pelo arucanolídeo _____	90
Atividade antitumoral do arucanolídeo nas células de melanoma murino B16-F10 _____	94
Conclusões _____	111
Referências Bibliográficas _____	115

Anexos _____ **127**

Aprovação do Comitê de Ética Animal – CEEA _____ **129**

Aprovação do Comitê de Ética Animal – CEEA _____ **130**

Introdução

Câncer e mecanismos de morte celular

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) o câncer é a segunda causa de morte dos países desenvolvidos e se tornou uma das mais importantes patologias do mundo por apresentar mais de 10 milhões de novos casos por ano. É o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células com capacidade de invadir tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (Weinberg, 2008; INCA, 2012).

No Brasil, as estimativas, para o ano de 2013 apontam para a ocorrência de aproximadamente 520.000 novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão para o sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero para o sexo feminino. Estendendo-se as previsões para o mundo todo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que para o ano de 2030 podem se esperar 27 milhões de casos de câncer (INCA, 2012).

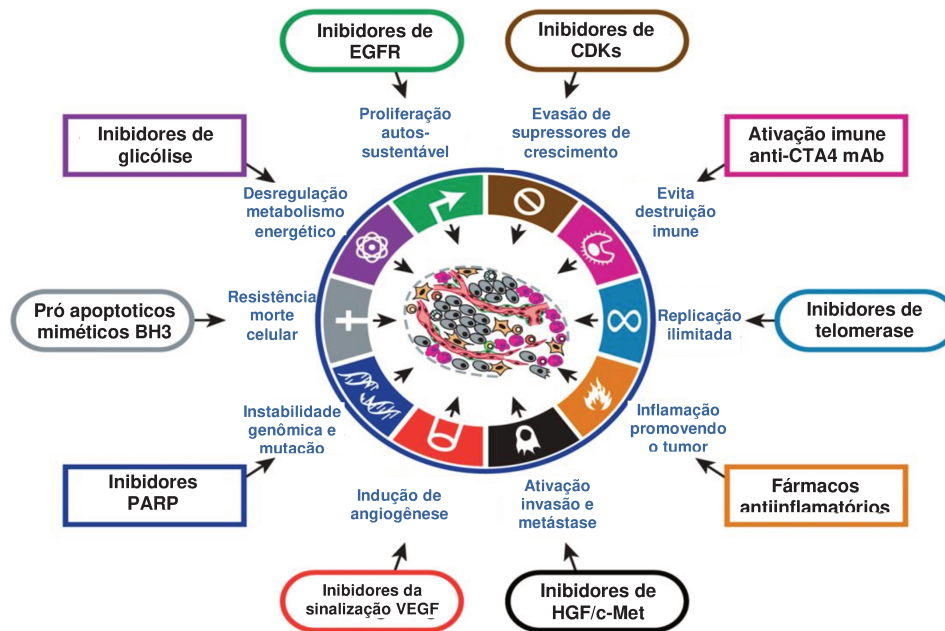
A célula cancerígena se caracteriza por ignorar sinais que regulam a sua proliferação, tendem a evitar o processo de apoptose e contornam os limites definidos para a proliferação, escapando da senescência programada e evitando a diferenciação. Além disso, o ambiente tumoral é composto por células instáveis, que podem apresentar capacidade invasiva e que sobrevivem e proliferam em novos ambientes, produzindo metástases (Alberts *et al*, 2002).

A formação de um tumor é um processo que frequentemente se estende por décadas onde células consideradas normais evoluem para células com fenótipos denominados neoplásicos por um processo chamado de progressão tumoral. A progressão tumoral é dirigida por uma sequência de mutações que ocorrem aleatoriamente e alterações epigenéticas do DNA que afetam genes de proliferação, sobrevivência celular e outras características associadas ao fenótipo celular maligno (Weinberg, 2008).

Essas características presentes nas células tumorais conferem vantagens, que ficaram conhecidas como os *hallmarks* do câncer. Como o próprio nome afirma, *hallmarks* são as características necessárias para o desenvolvimento e manutenção tumoral. Dentre essas capacidades adquiridas estão: a proliferação autossustentável, evasão de sinais supressores de crescimento, resistência à morte celular, replicação ilimitada, indução de angiogênese, ativação de invasão e metástase, reprogramação do metabolismo energético, instabilidade genômica, evasão da destruição pelo sistema imune e inflamação associada ao tumor. Cada característica

possui alvos para o desenvolvimento de novos quimioterápicos (Fig. 1) (Hanahan & Weinberg, 2011).

Figura 1. Alvos terapêuticos dos *Hallmarks* do Câncer



Alvos terapêuticos dos *Hallmarks* do Câncer. Drogas que interferem com cada um dos recursos necessários para o crescimento e progressão tumoral. Os medicamentos listados são apenas alguns exemplos, estão em ensaios clínicos ou, em alguns casos aprovados para uso clínico no tratamento de certas formas de câncer humano. (Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011)

A sobrevivência de uma célula depende de múltiplas moléculas sinalizadoras como fatores de crescimento, nutrientes e adesão às células adjacentes e aos componentes da matriz extracelular. As células tumorais desenvolveram um efetivo mecanismo de ignorar sinais externos e ativar mecanismos intracelulares que escapam do controle do crescimento normal (Hehlhans *et al*, 2007). Essas moléculas sinalizadoras representam pontos críticos no processo de formação e progressão tumoral, sendo amplamente estudadas como alvo terapêutico em potencial (Bianco *et al*, 2006).

A falta de sinais para a sobrevivência da célula, aliada aos sinais de degeneração, podem levá-la à morte celular programada, que é um evento natural, discreto e prevalente nos organismos multicelulares. A morte celular programada é essencial para o desenvolvimento e a manutenção de organismos multicelulares (Plas & Thompson, 2002).

O clássico processo apoptótico é definido por alterações morfológicas, evidente especialmente na compactação da cromatina, exposição da fosfatidilserina na membrana plasmática, arredondamento celular, retração dos pseudópodes, formação de “bolhas” na

membrana plasmática e a formação de corpos apoptóticos com fragmentos nucleares. Bioquimicamente se caracteriza pela ativação de caspases, em particular a caspase-3 (Leist *et al*, 2001; Kroemer *et al*, 2009).

O processo apoptótico é uma forma controlada de morte celular e pode ser iniciada por dois processos diferentes: sinais de estresse intracelular ou ligantes extracelulares. Sinais de estresse intracelulares, tais como falta de fatores de crescimento, danos no DNA, estresse oxidativo ou a ativação de oncogenes, levam a permeabilização da membrana externa da mitocôndria. Como consequência ocorre a liberação do citocromo c e outras proteínas pró-apoptóticas propagando o sinal apoptótico. Embora seja discutível a forma como o citocromo c é libertado a partir da mitocôndria, esse processo é regulado por proteínas da família Bcl-2, que é composta de proteínas pró e anti-apoptóticas.

Os multidomínios pró-apoptóticos Bax e Bak são essenciais para esse processo, pois promovem a permeabilização da membrana mitocondrial com a formação de poros através de oligomerização. Os membros pró-apoptóticos da família BH3-*only* como Bid, Bim, Bad, Noxa e Puma ativam Bax e/ou Bak. A liberação do citocromo c leva a formação de um complexo – o apoptossomo – composto pelo citocromo c, APAF-1 e pró-caspase-9. A caspase-9 ativa cliva e então ativa as subsequentes caspases efetoras (Bruin & Medema, 2008).

Quando ligantes extracelulares, tais como Fas, TNF α ou TRAIL (Ligante indutor de TNF-relacionado a apoptose) se ligam aos seus receptores, os domínios intracelulares de morte destes receptores recrutam proteínas adaptadoras (tais como FADD e TRADD) e iniciadores das caspases-8 e -10. Juntos eles compõem o complexo de sinalização indutor de morte (DISCO). Uma vez que ativa a caspase-8, ela propaga a apoptose através da clivagem direta de caspases efetoras. No entanto, as vias intrínsecas e extrínsecas de apoptose podem se cruzar na mitocôndria, pois a caspase-8 pode clivar também a proteína Bid na sua forma ativa tBid. Sendo um membro pró-apoptótico da família de proteínas Bcl-2, tBid induz a permeabilização da membrana externa da mitocôndria dependente de Bax/Bak e liberação do citocromo c. Ambas as vias apoptóticas levam a ativação das caspases efetoras, caspase-3, -6 e -7, que são as principais proteases responsáveis pela degradação celular (Bruin & Medema, 2008).

Outros tipos de morte celular programada podem ser induzidos por fármacos, como a apoptosis-like que também apresenta condensação da cromatina e exposição de

marcadores de fagocitose antes da lise da membrana plasmática. Qualquer grau e combinação de outras características apoptóticas podem ser encontrados, incluindo a ausência de caspases (Leist *et al*, 2001).

O fato das leveduras, aparentemente não possuírem uma via de apoptose clássica, suas células podem adquirir uma morfologia apoptótica em resposta a estímulos letais, aponta para a possibilidade de que as células de mamíferos podem similarmente sucumbir a uma morte celular apoptótica, sem efetores clássicos de apoptose. Por exemplo, na via independente de caspases, o efetor de morte filogeneticamente conservado AIF (fator de indução de apoptose) é responsável pela condensação da cromatina e a indução da exposição de fosfatidilserina como um mecanismo de backup em células humanas quando a ativação de caspases está inibida. Em alguns paradigmas de morte celular em leveduras, bem como em neurônios de mamíferos, o AIF é importante para a indução de morte celular, sugerindo que a apoptose independente de caspases pode ser mediada, pelo menos em alguns casos, por AIF (Yuan & Kroemer, 2010).

A denominação necrosis-like é usada para definir um tipo de morte celular programada com ausência de condensação da cromatina. Podem apresentar diversas características apoptóticas incluindo a exposição de fosfatidilserina anterior à lise da membrana. Geralmente apresentam vias independentes de ativação de caspases e em algumas vezes podem ser chamadas de apoptose interrompidas, onde a apoptose é iniciada e então bloqueada no nível de ativação de caspases, terminando como uma morte alternativa (Leist *et al*, 2001).

Em contraste com a apoptose, a necrose tem sido considerada como uma forma descontrolada de morte celular. Morfologicamente, a necrose é caracterizada pela vacuolização do citoplasma, perda da integridade da membrana e aumento no volume celular. A consequente liberação de componentes intracelulares no microambiente pode provocar uma resposta inflamatória. Embora a necrose seja, geralmente, uma consequência de traumas patológicos tais como infecção ou isquemia, também pode ser induzida pela ligação de TNF α ou Fas nos seus respectivos receptores de morte (Bruin & Medema, 2008).

Nesse processo, a produção de ROS parece desempenhar um papel central, uma vez que captadores de ROS eficientemente previnem a necrose induzida por vários fármacos. No entanto, pesquisas recentes estabeleceram que pelo menos parte do processo necrótico

pode ser executado através de um mecanismo programado denominado “necroptosis” (Bruin & Medema, 2008; Yuan & Kroemer, 2010).

O termo necroptosis, que compartilha características com a necrose e a apoptose, provoca um interesse considerável, particularmente no que diz respeito às condições clínicas, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (Smith & Yellon, 2011). Ainda se sabe muito pouco sobre o mecanismo de regulação da necroptosis. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) tem sido proposta como um mecanismo de regulação deste processo em certos tipos celulares. Células de fibrossarcoma (L929) e fibroblastos embrionários (MEFs) produziram ROS em resposta à estimulação com TNF α . O tratamento prévio com um antioxidante, como hidroxianisol butilado (BHA), bloqueia a produção de ROS e previne a morte celular em alguns tipos de células. No entanto, o tratamento antioxidante é incapaz de impedir a necroptose em todas as linhagens celulares, sugerindo que o envolvimento do ROS seja dependente do tipo celular para a execução desta modalidade de morte celular (Yuan & Kroemer, 2010).

Autofagia é definida como um processo em que as proteínas e organelas são degradadas por proteases lisossomais. A formação de autofagossomos – vesículas de membrana dupla contendo organelas citosólicas - que se fundem com os lisossomos é uma característica importante da autofagia. Ao contrário da apoptose e da necrose, a autofagia é essencialmente um mecanismo de sobrevivência que é ativado em resposta ao estresse, tais como fome, hipóxia, disfunção mitocondrial e infecção (Smith & Yellon, 2011).

O processo autofágico promove a sobrevivência de tecido gerando aminoácidos e ácidos graxos necessários para manter a função celular normal durante períodos de deficiência nutricional, ou através da remoção de organelas danificadas e agentes patogênicos intracelulares. Autofagia pode, no entanto, promover a morte celular descontrolada conduzindo à degradação excessiva de componentes celulares e ao desenvolvimento de condições patológicas (Smith & Yellon, 2011).

Autofagia também tem a capacidade de prevenir uma célula normal de se tornar maligna através da degradação organelas danificadas e, assim, reduzir o estresse celular, pela degradação de proteínas específicas que participam do desenvolvimento tumoral. É composta por processos de regulação complexos envolvendo diversas etapas. Muitas destas etapas parecem ser moduladas por espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) ou seus metabólitos, incluindo os produtos de peroxidação lipídica (Lee *et al*, 2012).

O papel da autofagia no câncer, no entanto, é mais complexo. Há evidências de que a autofagia pode ser oncogênica em alguns contextos, enquanto que em outros, contribui claramente para a supressão tumoral. Como frequentemente é ativada para a manutenção da sobrevivência celular pode aumentar, em muitas situações, a viabilidade das células tumorais. Entretanto em outros casos, os sinais de morte são tão fortes que não são capazes de conter este efeito e, portanto, a célula tumoral morre, levando a uma supressão do crescimento tumoral (Rosenfeldt & Ryan, 2011). Uma das formas de detecção do processo autofágico é a transformação de LC3-I em LC3-II (Kroemer *et al*, 2009).

O fato de a apoptose não ser a forma de morte celular mais predominante nos tumores sólidos pode ser consequência das ações das terapias convencionais, tais como a radioterapia, que não são especificamente delineados para induzir a apoptose. Estas terapias podem resultar em apoptose como um efeito secundário, devido aos danos celulares induzidos. Melhorar o potencial apoptótico das terapias pode aumentar, em geral, a quantidade de morte celular no tumor. Uma vez que a apoptose é uma forma eficaz e “limpa” de eliminar células tumorais, a indução direta de apoptose pode ter grande potencial terapêutico (Bruin & Medema, 2008).

Modelos de Estudo de Câncer *In vitro* e *In vivo*

Para a descoberta de quimioterápicos, tanto os testes *in vitro* quanto os *in vivo* são amplamente utilizados. Os testes de citotoxicidade *in vitro*, os quais direcionam a pesquisa para moléculas com potencial de matar células neoplásicas em cultura são os mais amplamente utilizados. (Holbeck, 2004; Skehan *et al*, 1990). Esse tipo de análise, por ter condições de avaliar grande número de substâncias em pouco tempo, aumenta a possibilidade para descoberta de novas drogas anticâncer. Além disso, o teste de citotoxicidade *in vitro* é uma técnica relativamente simples, barata, reproduzível e, ainda, providencia um provável mecanismo de ação da droga (Suggitt *et al*, 2005).

Porém a atividade citocida seletiva sobre células cancerosas observada em modelos *in vitro* pode não se refletir necessariamente numa atividade *in vivo*. Nesse último modelo, as informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica da droga em estudo são obtidas, enquanto em testes *in vitro* esses dados não podem ser obtidos. Portanto, o estudo

combinado desses dois modelos é muito indicado para uma conclusão apropriada a respeito da atividade de uma nova substância com potencial anticâncer (Smith *et al*, 2005).

Para os testes anticâncer *in vitro*, geralmente são utilizadas várias linhagens celulares tumorais com o intuito de se obter uma visão ampliada dos efeitos das drogas. Essas linhagens devem ser de cânceres originados de diferentes tecidos com diferentes origens embrionárias e com características morfológicas e fisiológicas distintas. Por isso, o painel escolhido pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/ UNICAMP, possui dez linhagens com células de diferentes tecidos humanos, cedidas pelo National Cancer Institute – EUA (Tabela 1).

Há uma série de fatores que podem explicar o fato de que a pesquisa de novos fármacos ou tratamentos anticâncer apresentem potentes efeitos antitumorais em estudos pré-clínicos em animais de laboratórios que não se reproduzem em estudos clínicos e, portanto sem benefícios clínicos em pacientes com câncer. Dentre eles estão a variação no metabolismo de drogas e farmacocinética, o uso frequente de tumores de crescimento rápido, o uso de “endpoints” diversos. Entretanto, é provável que uma das razões mais importantes para as discrepâncias entre os resultados pré-clínicos e clínicos é o impacto da metástase avançada (Man *et al*, 2007).

Diversos modelos *in vivo* de estudo do câncer são realizados atualmente, através do uso de animais de laboratório, dentre eles a linhagem de melanoma B16-F10, que provoca metástase no pulmão quando injetada diretamente na corrente sanguínea do animal ou se desenvolve na forma sólida quando inoculado no subcutâneo (Yao *et al*, 2007; Teng *et al*, 2011).

Tabela 1. Linhagens Celulares Tumorais utilizadas nos Ensaios *in vitro*.

Sigla	Tecido	Características
U-251	Glioblastoma	Astrocitoma. Expressa GFAP e vimentina ¹
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	Produz proteínas insulina like (liga fatores de crescimento) ¹ ; e superexpressa gene P2P-R ² ; TNF- α inibe seu crescimento ¹
NCI-ADR/RES	Adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas	Perdeu o receptor de estrógeno ¹ ; expressa altos níveis do gene resistência multidroga (MDR1) ³ traduzindo para glicoproteína-P que confere essa capacidade ⁴ ; proto-oncogene Raf-1 pode estar envolvido na regulação da resistência a drogas ⁵
OVCAR-3	Adenocarcinoma de ovário	Possui receptores de estrógeno, andrógeno e progesterona e poucos cromossomos normais representados; adequada em estudos de câncer ovariano e avaliação da terapia hormonal ¹ ; alta produção da enzima 24-OHase e baixa de 1- α OHase ⁶
PC-3	Adenocarcinoma de próstata	Baixa atividade de fosfatase ácida e 5- α redutase; sem cromossomo Y normal detectado ¹ ; é uma das 3 linhagens clássicas de tumores prostáticos ⁷
786-O	Adenocarcinoma de rim	Produz peptídeo semelhante em forma e ação ao hormônio paratireoidiano ⁸ ; mutações no gene HVL ⁹ e da prolina oxidase ¹⁰ propiciam a formação do tumor
K-562*	Leucemia Mielóide Crônica	Células altamente indiferenciadas (blastos multipotentes) que podem se diferenciar em progenitores das séries eritrócítica, granulocítica e monocítica ¹ ; há o gene fusionado Bcr-abl impedindo sua apoptose ¹¹
UACC-62	Melanoma	Originária de melanócitos ¹
HT-29	Adenocarcinoma colorretal	Possui microvilos, microfilamentos, mitocôndrias vacuolizadas e densas, alta expressão de receptores de uroquinase e antígenos p53, mutações pró-tumorais no gene APC (adenomatous polyposis coli) e COX-2 ¹²
NCI-H460	Adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células	Expressa altos níveis COX-2 que se associam ao fenótipo invasivo e metastático ¹³ ; com características de células endócrinas pulmonares altamente diferenciadas ¹⁴ ; é deficiente em fator-1 de ativação da protease do citocromo c apoptótico ¹⁵
HeLa	Adenocarcinoma de Cervix.	Células positivas para queratina; Contém sequencias do papilomavirus humano; Baixa expressão de p53 e expressão normal de pRB (supressor do retinoblastoma) ¹
SK-MEL-2	Melanoma	Proveniente de melanoma metastático na pele ¹
U-118 MG	Glioblastoma	Astrocitoma grau IV de morfologia mista ¹

*Células em suspensão. ¹Disponível online no site do ATCC: www.atcc.org/SearchCatalogs Consultado dia 18/07/2012. ²Gao & Scott, 2003; ³Yang *et al*, 2003A; ⁴Xu *et al*, 2002; ⁵Weinstein-Oppenheimer *et al*, 2002; ⁶Miettinen *et al*, 2004; ⁷van Bokhoven *et al*, 2003; ⁸Thiede *et al*, 1988; ⁹Iliopoulos *et al*, 1995; ¹⁰Maxwell & Riviera, 2003; ¹¹Cen *et al*, 2002; ¹²His *et al*, 2000; ¹³Takahashi *et al*, 2002; ¹⁴Schüller *et al*, 1987; ¹⁵Yang *et al*, 2003B; ¹⁶Liscovich & Ravid, 2007.

Descoberta de Fármacos Anticâncer

O câncer continua sendo amplamente estudado e uma de seus principais linhas de pesquisa é o desenvolvimento de novos quimioterápicos, que podem ser de origem natural, sintética ou até mesmo biológica, como anticorpos monoclonais (Slamon *et al*, 2001; Czuczman *et al*, 1999).

Novos tratamentos para o câncer surgem diariamente e biofármacos e vacinas já somam 15% dos quimioterápicos existentes. Além disso, grande parte dos novos medicamentos é obtida através de: semi-síntese (moléculas sintéticas contendo grupo farmacofórico derivado diretamente de produtos naturais), modelagem a partir de um uma substância ativa, produto natural, de um alvo molecular de interesse, ou mimetizam o substrato endógeno do sítio ativo. Portanto, somente 40% dos novos fármacos podem ser considerados totalmente sintéticos em sua origem. Na área do tratamento de câncer, cerca de 55% dos quimioterápicos são derivados ou inspirados em produtos naturais. (Newman & Cragg, 2012)

Vários tumores humanos compartilham uma série de alterações fisiológicas relacionadas ao crescimento maligno como autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais de inibição de crescimento, resistência a apoptose, potencial de replicação ilimitado, angiogênese autossustentada, invasão tissular e metástase (Brown & Attardi, 2005; Fadeel & Orrenius, 2005).

Os agentes terapêuticos hoje conhecidos são de dois tipos: os agentes bloqueadores (quimiopreventivos), que inibem a iniciação do processo carcinogênico e os agentes supressores, que inibem a proliferação de células malignas durante as fases de promoção e progressão tumoral. A maior parte dos bloqueadores é encontrada nos alimentos, como os diterpenos do café e os ácidos sulfídicos do alho. Estudos epidemiológicos demonstraram a relação entre consumo de frutas e vegetais e uma menor incidência de câncer, fato que reforça a procura de agentes quimiopreventivos em alimentos (Seeram *et al*, 2005). Apesar da comprovada ação preventiva dos alimentos, os agentes supressores são os mais procurados para o desenvolvimento de novos fármacos, pois agem após a instalação da doença (Duvoix *et al*, 2005).

Grande número de fitofármacos tem demonstrado ação anticâncer em diversos modelos experimentais através de alterações nas vias de transdução de sinais que modulam

a expressão gênica, a progressão do ciclo celular, a proliferação, a morte celular, o metabolismo e a apoptose (HemaIswarya & Doble, 2006). Como exemplos podem ser citados a camptotecina e seus derivados (topotecan e irinotecan) extraídos da árvore ornamental chinesa *Camptotheca acuminata*, que atua na inibição da topoisomerase I e atualmente é utilizada no tratamento de câncer de ovário e cólon. Semelhante à camptotecina, as epipodofilotoxinas (etoposida e teniposida), isoladas de *Podophyllum peltatum*, são substâncias inibidoras da topoisomerase II. As topoisomerase I e II são responsáveis por facilitar o descondensamento da dupla fita de DNA durante a divisão celular (Srivastava *et al*, 2005; Takimoto, 1997).

O paclitaxel, também conhecido como taxol, foi originalmente isolado da planta *Taxus brevifolia* e atualmente existem mais de 300 taxóides isolados e caracterizados de diferentes espécies do gênero *Taxus*. Enquanto os outros agentes anticâncer desestabilizam o fuso mitótico, o taxol possui um mecanismo de ação único agindo na estabilidade da microtubulina, impedindo a separação do fuso na anáfase. O taxol mostra-se eficiente contra câncer de pulmão, ovário e mama (Srivastava *et al*, 2005, Rowinsky *et al*, 1997).

Os alcalóides da vinca, vinblastina, vincristina e vinorelbina, foram isolados da planta *Catharanthus roseus* e agem inibindo a formação dos heterodímeros de alfa e beta tubulina que formam as fibras do fuso mitótico. Dessa forma, essas substâncias impedem a migração de cada um dos cromossomos homólogos para os polos opostos da célula, impedindo a conclusão da metáfase celular (Rowinsky *et al*, 1997).

Diversos agentes anticâncer provenientes de organismos marinhos foram isolados, porém nenhum produto de origem marinha foi licenciado para o uso clínico como quimioterápico. Existem alguns agentes promissores como a Salinosporamida A, Apratoxina A e a Briostatina (Vignesh *et al*, 2011). A briostatina 1, por exemplo, é isolada do briozoário *Bugula neritina*, e apresenta atividade em diferentes tipos de câncer. Essa substância estimula o sistema imune, aumenta a expressão da proteína p53 e induz apoptose em células cancerígenas. Essas atividades estão associadas com a sua interação com várias proteínas quinases C (Mann, 2002).

É importante salientar a expansão no número absoluto de medicamentos provenientes e baseados em produtos naturais, mesmo com o aprimoramento de novas tecnologias de síntese e produção de biofármacos e vacinas (Newman & Cragg, 2012). Por

todos esses motivos, os produtos naturais ainda são e continuarão por um bom tempo, sendo uma excelente fonte de novos medicamentos.

O gênero *Calea* e seu potencial farmacológico

Durante muitos séculos, as plantas originaram grande número de agentes terapêuticos, cujos compostos deram origem a medicamentos ou serviram de base para a síntese dos mesmos (Rates, 2001). O Brasil é um país que possui imensa biodiversidade, com mais de 10% de todos os organismos descritos na Terra, sendo a flora medicinal particularmente rica. Apesar disso, existe enorme número de plantas brasileiras, que permanecem sem quaisquer estudos químicos ou biológicos e que apresentam um enorme potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (Bolzani *et al*, 1999; Alves *et al*, 2000).

O Cerrado apresenta um tipo de vegetação brasileira genuína presente em diferentes regiões do Brasil, dentre elas o Estado de São Paulo. Sabe-se que plantas crescidas em ambientes áridos ou semiáridos mostram elevada capacidade fotossintética, que pode ser associada com o seu metabolismo e à produção de uma variedade de metabólitos secundários, geralmente em grande quantidade, tornando-se fonte importante para o desenvolvimento de fármacos (Alves *et al*, 2000).

O gênero *Calea* é constituído por aproximadamente 110 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais, cuja presença de germacranolídeos aparece como característica comum (Pruski & Urbatsch, 1988; Ferreira *et al* 1980; Yamada *et al* 2004). Muitas atividades biológicas foram descritas para os princípios ativos encontrados nesse gênero. A espécie *Calea zacatechichi* apresenta princípios com atividade anti-inflamatória e antileishmanial, a *Calea glomerata* vasodilatadora, a *Calea platylepis* antimicrobiana, a *Calea uniflora* antiparasitária e antifúngica, a *Calea serrata* acaricida e a *Calea urticifolia* citotóxica *in vitro* com indução de apoptose (Venegas-Flores *et al*, 2002; Nascimento *et al*, 2004a,b; Yamada *et al*, 2004; Nakagawa *et al*, 2005; Ribeiro *et al*, 2011; Wu *et al*, 2011).

Além das atividades descritas para as diferentes espécies do gênero *Calea*, os germacranolídeos também apresentam diversas atividades como indução de apoptose em cultura de células tumorais, citotoxicidade, atividade antifúngica e atividade inibitória do fator NF- κ B, tornando-se a substância mais promissora para o desenvolvimento de drogas

anticâncer, dentre as descritas para a *Calea pinnatifida* (Matsuura *et al*, 2005; Yamada *et al*, 2004; Bork *et al*, 1997; Rivero *et al*, 2003; Nakagawa *et al*, 2005).

Atividade anticâncer de *Calea pinnatifida*

Calea pinnatifida, conhecida popularmente como cipó cruz do norte ou aruca, é encontrada na região do cerrado brasileiro e tem seu emprego popular como estomacal e para o tratamento da disenteria amebiana. Pertencente à família Asteraceae em suas folhas foi encontrado os compostos: poliacetileno, ácido anísico, glicosídeo do ácido p-hidroxibenzóico, sitosterol e germacranolídeos (Ferreira *et al*, 1980). Cultivada no campo experimental do CPQBA as propriedades farmacológicas dos extratos e princípios ativos vêm sendo estudadas há alguns anos.

Figura 2. Foto de um espécime de *Calea pinnatifida* no campo experimental CPQBA.



O extrato bruto diclorometânico (EBD) de suas partes aéreas apresenta atividade antiproliferativa contra linhagens tumorais de diversas origens (Fig. 3 e Tabela 2) com seletividade para a linhagem de melanoma (UACC-62) e atividade antitumoral em modelos de câncer murino (Marchetti, 2008).

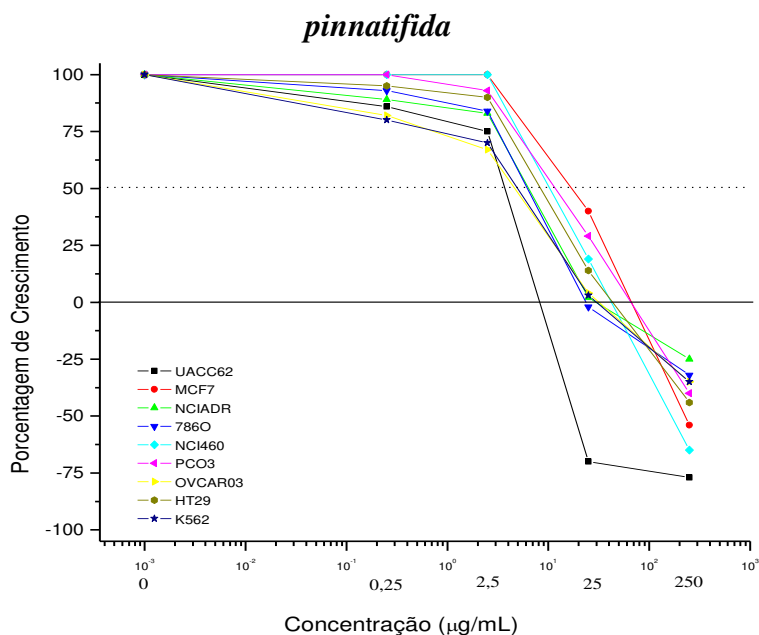
Figura 3. Atividade antiproliferativa do Extrato Bruto Diclorometânico de *C.*

Gráfico da atividade antiproliferativa do Extrato Bruto Diclorometânico (EBD) de *C. pinnatifida* em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato (Marchetti, 2008).

Tabela 2. Valores de TGI (inibição de crescimento total) do extrato bruto de *C.**pinnatifida*

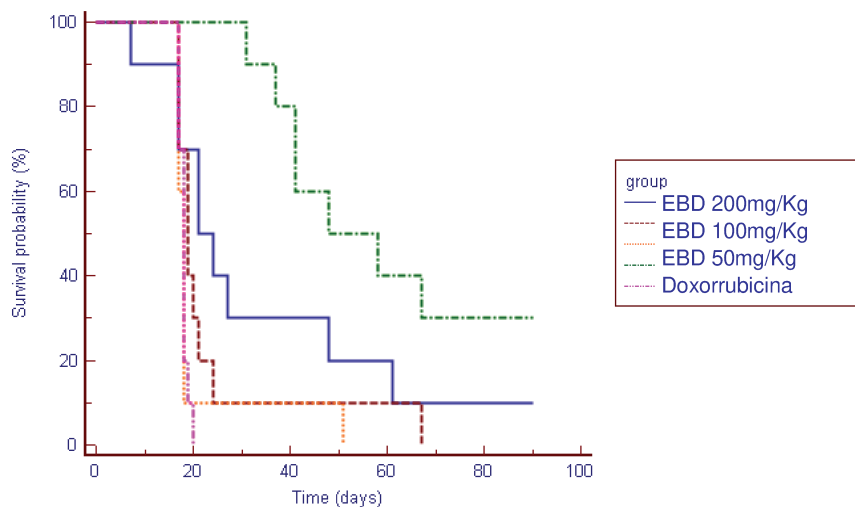
Linhagem	TGI (µg/mL)
UACC-62 (Melanoma)	8,46
MCF-7 (Mama)	66,27
NCI-ADR/RES (Ovário Resistente)	58,25
786-O (Rim)	46,81
NCI-H460 (Pulmão)	41,89
PC-03 (Próstata)	69,46
OVCAR-03 (Ovário)	42,81
HT-29 (Cólon)	50,67
K562 (Leucemia)	42,91

Retirado de Marchetti, 2008.

No tumor ascítico de Ehrlich (TAE) o EBD aumentou a sobrevivência dos animais tratados uma vez por semana, com a dose de 200mg/Kg (fig). Já no tumor sólido de Ehrlich (TSE), um tumor menos agressivo, que dificilmente leva os animais a óbito, o EBD

apresentou atividade antitumoral na dose de 100mg/Kg, com tratamentos a cada dois dias (Fig. 4 e Fig. 5) (Marchetti, 2008).

Figura 4. Atividade antitumoral do EBD de *Calea pinnatifida* em tumor ascítico de Ehrlich.



Curvas de sobrevivência do teste de Kaplan-Meier. Doxorubicina $p < 0,001$; EBD *C. pinnatifida* 50mg/Kg $p = 0,973$; EBD *C. pinnatifida* 100mg/Kg $p = 0,202$; EBD *C. pinnatifida* 200mg/Kg $p = 0,009$ (Marchetti, 2008).

Figura 5. Atividade antitumoral do EBD de *Calea pinnatifida* em tumor sólido de Ehrlich

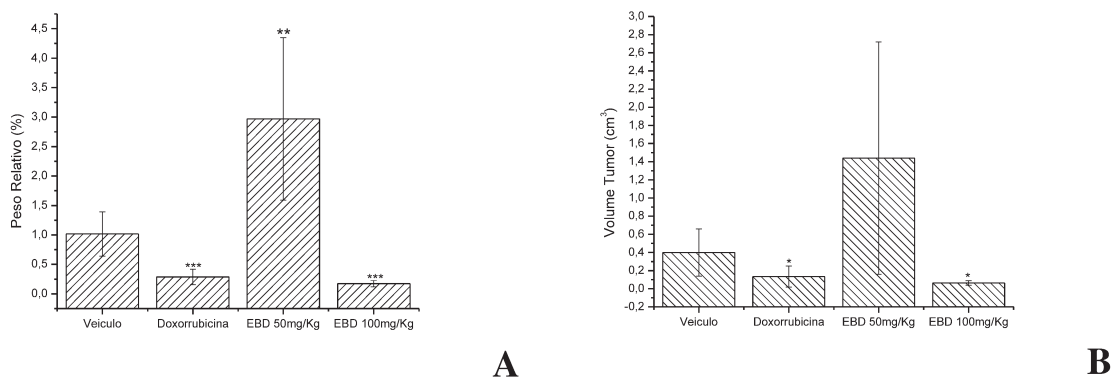


Grafico de barras da atividade antitumoral do EBD em tumor sólido de Ehrlich. Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão. A: Peso Relativo do Tumor; B: Volume do Tumor. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Marchetti, 2008).

Germacranolídeos e seu potencial anticâncer

Os terpenos formam uma grande família de compostos estruturalmente distintos derivados de unidades de isopreno (C5). As unidades de isopreno são originadas do colesterol, compartilhando a mesma via biossintética dos esteróides (Dewick, 2006). Diversos terpenóides são conhecidos por sua atividade anticâncer, sendo os taxóides os mais famosos. Extraídos das espécies do gênero *Taxus*, são diterpenos (C20) usados no tratamento de câncer de mama, pulmão, ovário e próstata, que agem nos microtúbulos, impedindo a proliferação celular (Montero *et al*, 2005).

Mais de 200 fármacos derivados de produtos naturais estão em desenvolvimento pré-clínico ou clínico. Pesquisas sobre lactonas sesquiterpênicas de compostos naturais (SLs) começaram há alguns anos no programa de triagem do NCI/EUA. Até o momento cerca de 1500 publicações têm relatado as propriedades anticancerígenas e antiinflamatórias das SLs, sendo que mais de 90% foram publicadas a partir de 1990 (Ghantous *et al*, 2010).

Lactonas sesquiterpênicas são incolores, amargas e de uma estável subfamília de terpenóides, classe de metabolitos secundários de plantas com carácter lipofílico. Eles são quase exclusivamente provenientes da família Asteraceae, mas são também encontrados em Umbelliferae e Magnoliaceae em concentrações frequentemente superiores a 1% da massa seca da planta. SLs são compostos com 15 carbonos (15-C) consistindo de três unidades de isopreno (5-C) e um grupo lactona (éster cíclico). Eles podem ser categorizados, em relação ao seu esqueleto carbocíclico, nos seguintes grupos principais: germacranolídeos (Fig. 6) (10-membros no anel); eudesmanolídeos, eremofilanolídeos, guaianolidos, pseudoguaianolidos e hipocretenolidos. Muitos membros desses grupos também têm estruturas de anel aberto, como iso-seco-tanapartolídeos. Alguns fármacos derivados de SLs como a tapsigargina, a artemisinina e o partenolídeo (Fig. 7) já estão em fase de ensaios clínicos para o câncer (Ghantous *et al*, 2010).

Em 1969, Hartwell e Abbott revisaram mais de 50 SLs conhecidas por serem citotóxicas para tumores e forneceram provas indiretas que ligam sua atividade biológica ao radical (Fig. 8). A porção α -metileno- γ -lactona reage na presença de biomoléculas contendo aminoácidos nucleofílicos ou resíduos de guanina, pois atuam como um aceptor de Michael, formando assim adutos estáveis (Barcelos *et al*, 2012; Ghantous *et al*, 2010).

Figura 6. Estrutura química de um germacranolídeo

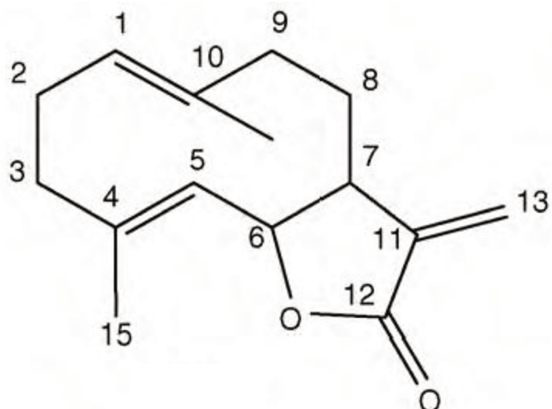


Figura 7. Estrutura química do Partenolídeo.

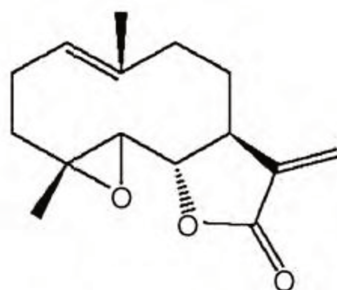
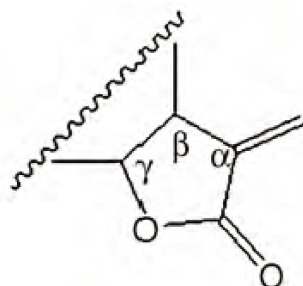


Figura 8. Estrutura de um grupo α -metileno- γ -lactona.



O partenolídeo (Fig. 7), uma lactona sesquiterpênica classificada de germacranolídeo devido a presença de um grupo germacril, inibe o fator nuclear κ B, importante na indução da apoptose (Dewick, 2006, Bork *et al*, 1997). A ligação obrigatória do DNA com o complexo NF- κ B é dependente dos resíduos de cisteína das subunidades p50 e p65. Vários estudos têm demonstrado que especialmente o resíduo Cis-38 na

subunidade p65 é um alvo sensível à alquilação pelo partenólídeo, proveniente da planta *Tanacetum parthenium* (Garcia-Pineros *et al*, 2001).

Estudos tem demonstrado as propriedades anticancer do partenólídeo através da indução de morte celular por apoptose em células tumorais humanas. Múltiplas vias podem estar envolvidas na indução de apoptose pelo partenólídeo, incluindo o estresse oxidativo, o estresse do retículo endoplasmático (RE), a depleção intracelular de grupos thiol, a ativação de caspase, e disfunção mitocondrial. Partenólídeo ativa a cascata das caspases através de dano mitocondrial, liberando citocromo c, sem afetar os membros antiapoptóticos da família Bcl-2 (Bcl-2 e Bcl-XL) (Zhang *et al*, 2004).

Verificou-se que após ativação da caspase-8, o partenólídeo desencadeia uma série de alterações dos membros proapoptóticos da família de proteínas Bcl-2, incluindo clivagem proteolítica do Bid, a transformação e translocação de Bax e oligomerização de Bak, que eventualmente leva à perda de potencial membrana mitocondrial e a liberação de citocromo c e Smac (pequeno ativador de caspases derivado de mitocôndria) (Zhang *et al*, 2004).

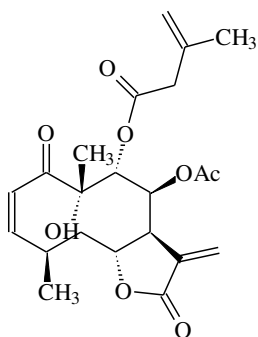
Existe uma vasta literatura indicando que terpenos podem inibir a sinalização através do sistema de NF- κ B e, portanto, possuem efeitos terapêuticos benéficos contra as doenças inflamatórias e câncer. Contudo, devemos ser prudentes e conscientes de que as plantas não sintetizam terpenos para o benefício humano, mas sim para seu próprio benefício, através da defesa contra insetos e ameaças ambientais (Maggi *et al*, 2005).

Alguns terpenos são pesticidas agrícolas, e muitos deles podem ter efeitos colaterais tóxicos, como as lactonas sesquiterpênicas. Uma questão interessante é a razão pela qual as plantas poderiam ter concebido terpenos, e acabaram suprimindo a sinalização do NF- κ B, como uma forma de combater insetos predadores. Uma hipótese plausível é que esses terpenos estão destinados a destruir o sistema imune dos invasores, e provavelmente também perturbar a morfogênese mediada pelo NF- κ B. A via do NF- κ B age na sinalização anti-apoptótica e no desenvolvimento da resistência celular contra apoptose. Além disso, o NF- κ B é essencial para o desenvolvimento e função de linfócito B e T (Salminen *et al*, 2008).

Os germacranolídeos de *Calea zacatechichi* agem, em células HeLa, como inibidor do fator nuclear κ B (NF- κ B), como já salientado, um importante mediador da resposta imune e inflamatória (Bork *et al*, 1997). Na espécie *Calea urtisifolia*, um germacranolídeo

chamado de arucanolídeo (Fig. 9) é responsável pela indução de apoptose, em células de leucemia HL-60, através da perda de potencial da membrana mitocondrial e da ativação do fator indutor de apoptose (AIF) (Nakagawa *et al*, 2005). Devido às características químicas e biológicas (ação no metabolismo celular) dos germacranolídeos, sugere-se que estes podem estar envolvidos na atividade anticâncer de *C. pinnatifida*.

Figura 9. Estrutura química do Arucanolídeo



2-Ácido Propenoico, 2-metil-, (3a*S*,4*S*,5*R*,6*R*,8*Z*,10*R*,11a*R*)-4-(acetiloxi)-2,3,3a,4,5,6,7,10,11,11a-decahidro-6-hidroxi-6,10-dimetil-3-metilene-2,7-dioxociclodeca[*b*]furan-5-il ester.

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a atividade anticâncer do Arucanolídeo, germacranolídeo isolados de *Calea pinnatifida* Banks.

Objetivos Específicos

1. Isolar e identificar princípios ativos do extrato bruto diclorometânico de *Calea pinnatifida*;
2. Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* do arucanolídeo;
3. Avaliar a atividade anticâncer *in vivo* do arucanolídeo;
4. Avaliar o mecanismo de morte celular envolvido na atividade antiproliferativa.

Metodologia

Fracionamento e isolamento do arucanolídeo

Material Vegetal

Foram utilizadas partes aéreas (folhas) da espécie vegetal *Calea pinnatifida* Banks de espécime cultivada pertencente à coleção de plantas medicinais do CPQBA/UNICAMP, depósito n^o: 107. Após secagem à baixa temperatura as folhas foram moídas com uso de moinho de facas.

Obtenção do extrato bruto

O material vegetal (425g) foi extraído a quente, com diclorometano em aparelho de soxhlet. Após esgotamento o solvente foi evaporado com uso de rotaevaporador à 30°C, dando origem ao extrato bruto diclorometânico (EBD).

Limpeza com Acetato de Chumbo

O EBD (m=4g) de *C. pinnatifida* foi dissolvido em 160mL de etanol P.A. (Merck[®], Darnstadt, Germany) com ajuda do ultrassom. Em seguida, adicionou-se 800mL de solução básica de acetato de chumbo a 10% (80g de acetato de Pb em 800 ml de água). A mistura foi deixada na geladeira (4° C) durante 24h e em seguida foi filtrada a vácuo em funil de placa porosa preenchido com 160g de celite. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila por 3x (V:V), dando origem à fração acetato.

Fracionamento por Cromatografia de Coluna Clássica

Nesta metodologia foi usada uma coluna de vidro (diâmetro dependente da massa), sendo a fase estacionária silicagel G60 (60x massa extrato), onde no seu topo foi aplicado o extrato (Fr. Acetato CN= 260mg). A coluna foi eluída com um gradiente de eluentes iniciando-se em hexano 100%, hexano/diclorometano, diclorometano/metanol até terminar com metanol puro. Foram recolhidas duas frações de cada eluente, monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) sendo o solvente evaporado a vácuo.

Análise Qualitativa e Quantitativa por Cromatografia Gasosa

As frações e substâncias puras foram diluídas em acetato de etila ou metanol e analisadas por cromatografia gasosa capilar acoplada a um detector de massas (CG Hewlett Packard 6890, série II, diretamente acoplado a um detector seletivo de massa Hewlett Packard 5975, equipado com uma coluna de sílica fundida WCOT, 30m x 0.25 mm x 0.25 µm). Temperatura: 60°C (3°C/min) – 240°C (60 min), injetor 220°C, detector 250°C. Gás hélio foi usado como gás carreador (0,7 bar, 1mL/min). O detector de massas foi usado à 70 eV. A velocidade de digitalização foi 0,84 scans/s, de 40 à 550. O volume de amostra foi 1 µL. Split: 1: 40.

A concentração do arucanolídeo no EBD e na Fração Acetato foi determinada através de Cromatografia gasosa – espectrometria de massa utilizando o dibutilfitalato (DBF) na concentração de 260µg/mL, como padrão interno. A concentração final foi calculada através de regressão linear utilizando o programa excel.

Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Foram utilizadas cromatoplasmas de Silicagel 60 F254. Uma pequena fração da amostra foi aplicada na base da placa e eluída com uma mistura de Metanol:Diclorometano (2:98). A visualização dos resultados foi feita utilizando-se lâmpada UV e anisaldeído.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (¹H, ¹³C e DEPT) e 2D (COSY, HSQC, HMQC) foram obtidos em espectrômetro Inova 500, operando a 500 MHz na frequência do hidrogênio e a 125 MHz na frequência do carbono-13. O sinal residual do solvente ou do TMS foi usado como referência interna. O solvente utilizado na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃, Isotec - INC). Os resultados foram comparados com dados espectrais descritos para compostos isolados de *Calea pinnatifida* (Ferreira *et al.*, 1980).

Ensaio Farmacológicos “*in vitro*”

Cultivo celular

A maior parte das linhagens celulares (Tabela 3) foi mantida em meio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB – Gibco®), a linhagem U-118 MG e HeLa foram mantidas em meio DMEN (Gibco®) com 10% SFB, 2mM L-glutamina, 100U/mL penicilina e 100µg/mL streptomina e as células SK-MEL-2 em RPMI (Gibco®) com 10% SFB, 2mM L-glutamina, 1mM piruvato de sódio, 1% aminoácidos não essenciais, 100U/mL penicilina e 100µg/mL streptomina à 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂. Quando a monocamada celular atingia cerca de 80% de confluência, as linhagens foram subcultivadas, o que ocorreu geralmente uma vez por semana.

Para linhagens aderidas, o desprendimento celular foi realizado mediante ação enzimática da tripsina. Para tanto, o meio de cultura foi aspirado, o frasco lavado com 500 µL de tampão de Hank's (Sigma®) para eliminar resíduos de meio de cultura e após aspiração do tampão, foram adicionados 500 µL de tripsina-EDTA 2,5 g/L (Vitrocell®) a 37°C até que as células se soltassem totalmente. A ação da tripsina foi bloqueada com RPMI + SFB 5% e uma alíquota dessa suspensão foi transferida aos novos frascos, completando-se o volume para 5 mL.

Descongelamento das células

O descongelamento das células foi realizado sempre que houve necessidade de renovação ou obtenção de células em passagem adequada para os experimentos. Para tanto, o criotubos foram descongelados à temperatura ambiente, seu conteúdo transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL e, para lavagem do glicerol utilizado no congelamento, teve o seu volume completado para 10 mL com meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®) contendo 5% SFB (Gibco®). O tubo foi centrifugado a 2000 rpm por 4 minutos a 4°C, o sobrenadante foi aspirado e descartado e o precipitado de células foi ressuscitado cuidadosamente em 5 mL do meio de cultura descrito. A suspensão foi então transferida para frascos de manutenção de T25 e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

Tabela 3: Linhagens celulares utilizadas nos testes de atividade anticâncer.

Tecido Origem	Nome	Origem Embriológica	Densidade de Inoculação (x10⁴ células/ mL)*
Pulmão	NCI-H460	Endoderme	4,0
Mama	MCF-7	Ectoderme	6,0
Ovário Resistente	NCI-ADR/ RES	Ectoderme	5,0
Cólon	HT-29	Endoderme	4,0
Próstata	PC-3	Mesoderme	5,0
Melanoma	UACC-62	Ectoderme	5,0
Ovário	OVCAR-3	Mesoderme	7,0
Renal	786-O	Mesoderme	4,5
Leucemia	K-562	Mesênquima	5,0
Glioma	U251	Ectoderme	4,0
Epitélio	VERO	Ectoderme	5,0
Melanoma	UACC-257	Ectoderme	4,0
Melanoma	M14	Ectoderme	4,0
Melanoma	SKMEL-28	Ectoderme	4,0
Melanoma	SKMEL-2	Ectoderme	4,0
Melanoma	MALME-3	Ectoderme	4,0
Melanoma Murino	B16-F10	Ectoderme	4,0

*Densidade de Inoculação usada para o ensaio da sulforrodamina B em placas de 96 compartimentos.

Congelamento das células

Para sua expansão as células foram cultivadas em frascos de 75cm² (T75) e o volume final de suspensão celular a ser congelado foi sempre de 1x10⁶ cel/mL. Para células aderidas, após tripsinização com tripsina/EDTA (Sigma®), as células foram ressuspensas em 10 mL de meio suplementado com 30% de SFB, procedido pela contagem do número de células em câmara de Neubauer. A solução celular foi centrifugada a 2000rpm, por 4 minutos à 4°C, o sobrenadante foi aspirado e, a seguir, foi adicionado meio RPMI com 30% de SFB e 20% de glicerol em volume calculado para obtenção de uma concentração final de 1x10⁶ cel/mL. Cada criotubo contendo 1 mL da solução celular foi colocado na fase gasosa do nitrogênio líquido por 24 horas, para depois serem imersos na fase líquida.

Atividade antiproliferativa em cultura de células

Inóculo das células

No primeiro dia de experimento, a suspensão celular foi preparada com meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2mg/L) e ajustada em sua respectiva densidade de inoculação (Tabela 3). Foram inoculados 100µl de suspensão celular em placas de 96 compartimentos, que foram encubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Da mesma forma, foi também preparada uma placa controle (placa T0), que continha todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

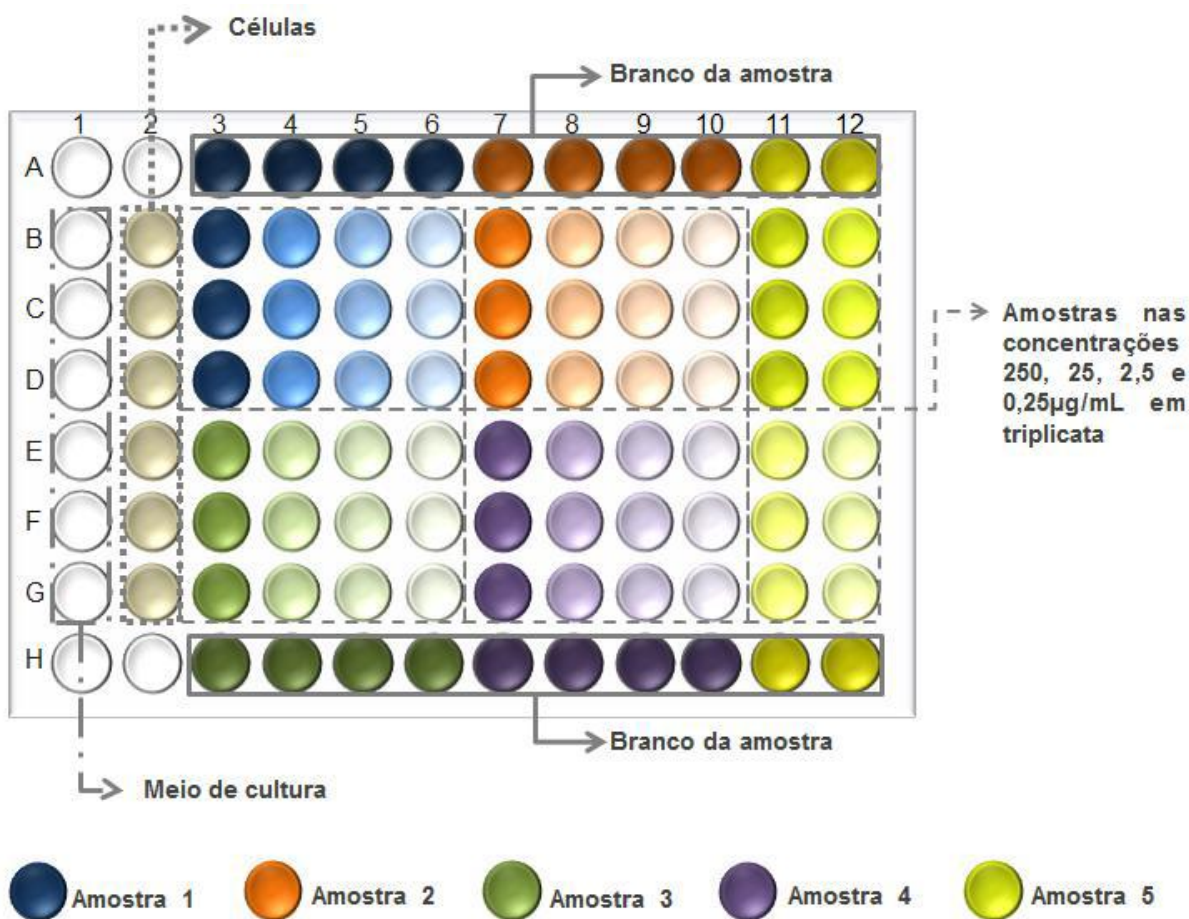
Preparo e aplicação das amostras – Ensaio da Sulforradamina B (SRB)

As amostras foram diluídas em solução estoque de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®) na concentração de 0,1g/mL. Para a adição à cultura de células, estas soluções foram diluídas em pelo menos 400 vezes em RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2mg/L), o que evita a toxicidade do DMSO. As amostras foram adicionadas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL, (100 µL/compartimento) em triplicata, e a seguir foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido (Figura 10). Como controle positivo utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL (100 µL/compartimento) em triplicata.

No momento de adição das amostras, as células inoculadas em uma placa controle T0 foram fixadas com a adição de 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (Sigma®) para determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas, sendo este o valor basal 0.

Após 48 horas de tratamento as células foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético a 50% (TCA) e incubadas por 1 hora a 4°C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Após isso foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Figura 10: Placa de 96 compartimentos usados no ensaio da SRB



Placa de 96 poços usada nos testes de atividade antiproliferativa mostrando a disposição e concentrações das amostras, o branco das amostras, das células e do meio de cultura.

Após a secagem, foram adicionados 50µL/compartimento do corante protéico sulforrodamina B (SRB) (Sigma®) a 0,4 % (peso/volume) dissolvido em ácido acético a 1 % e a seguir as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. As placas foram então lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% e após secagem completa à temperatura ambiente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150µL/compartimento de Trizma Base (10µM, pH 10,5) (Sigma®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540nm (Molecular Devices®, modelo VersaMax).

A sulforrodamina B é um corante protéico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Portanto, quanto maior a

quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade antiproliferativa da amostra em teste (Skehan *et al*, 1990; Rubistein *et al*, 1990; Monks *et al*, 1991).

Análise dos resultados

As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e através das fórmulas a seguir, foi determinada a porcentagem de crescimento de cada amostra testada.

Se $T > C$ a amostra estimulou o crescimento.

Se $T \geq T_0$ e $< C$, a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$.

Se $T < T_0$ a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T - T_0) / (T_0)]$.

Sendo T a média da absorbância da célula tratada, C o controle de célula e T₀ o controle das células no dia da adição das amostras, o resultado obtido foi subtraído de 100%, obtendo-se então a porcentagem de crescimento. Os dados de absorbância foram analisados e compilados na elaboração de gráficos relacionando a porcentagem de inibição ou morte celular com a concentração da amostra. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50%.

Através do *software* Origin®, foi feita regressão linear das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento e foi calculado o TGI (*total growth inhibition*): a concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular ($T=T_0$). Esse parâmetro é utilizado para comparar a potência das amostras e evidenciar a seletividade.

Citometria de Fluxo

Os estudos acerca do tipo de morte celular produzido pelo arucanolídeo foram realizados no citômetro de fluxo Guava EasyCiteTMMiniSystem Millipore® (FAPESP 09/51602-5) e no citômetro de fluxo Becton Dickinson (San Jose, CA) FACSCalibur (CIC – Salamanca). As linhagens tumorais avaliadas foram U-118 MG (glioblastoma), HeLa (adenocarcinoma de cervix), HeLa transfectada com Bcl-XL, SK-MEL-2 (melanoma) e SK-MEL-2 transfectada com Bcl-XL. O veículo utilizado foi o DMSO, sendo que os controles negativos receberam esse diluente no volume máximo correspondente ao usado para as células tratadas (0,1% de DMSO).

Análise do Ciclo Celular

Este teste quantifica o conteúdo de DNA, marcado com iodeto de propídio ou 7-amino-actinomicina D (7-AAD) com a finalidade de avaliar em que fase do ciclo celular as células se encontram (G0/G1, S, G2). Essa análise só é permitida após a permeabilização da membrana com o etanol 70% à 4° C. Quando há fragmentação de DNA, característico de processos apoptóticos, há a presença da fase sub-G1 (antes do pico de G1).

Células (1×10^6 /compartimento) foram plaqueadas em placas de 6 compartimentos e tratadas com arucanolídeo 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ durante 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. As células foram ressuspensas e centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Lavadas com PBS e fixadas com etanol 70% overnight a 4°C. A seguir foram centrifugadas e lavadas com PBS para retirada do etanol e tratadas com 500 μL de PBS com 2,5 μL de RNase (solução de 1mg/mL) e 2,5 μL de Iodeto de Propídio (solução de 1mg/mL) mantidas em agitação durante 1 hora no escuro. A análise foi realizada em citômetro de fluxo Becton Dickinson (San Jose, CA) FACSCalibur. Ou as amostras fixadas foram marcadas com 200 μL do Guava cell cycle reagente (Millipore®). Foram coletados pelo menos 5.000 eventos de cada amostra e analisados com auxílio do programa WinMID versão 2.9.

Avaliação da externalização de fosfatidilserina e permeabilização da membrana celular.

Este teste utiliza marcação dupla por anexina V e Iodeto de Propídio (IP). A anexina V é uma proteína ligante de fosfolipídio com elevada afinidade por fosfatidilserina que se localiza na face interna da membrana plasmática de células viáveis. Na fase inicial do processo apoptótico, as moléculas de fosfatidilserina são translocadas para a face externa e ficam disponíveis para a ligação com anexina V, marcando, portanto as células em apoptose. O 7-AAD liga-se ao DNA da célula e atua como um indicador de integridade estrutural de membrana já que não é capaz de marcar células viáveis e em apoptose inicial.

Células (1×10^6 /compartimento) foram inoculadas em placas de 6 compartimentos numa meio RPMI correspondente, mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após 24h de estabilização, as células foram tratadas com arucanolídeo 5 $\mu\text{g/ml}$ durante 12 e 24 horas e a seguir ressuspensas e centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente foram lavadas com PBS e marcadas com Annexin V- FITC e

iodeto de propídio (IP) 5µg/mL durante 15 minutos no escuro. As amostras foram lidas em um citômetro de fluxo Becton Dickinson (San Jose, CA) FACSCalibur. Foram coletados 10.000 eventos de cada amostra e analisados com auxílio do programa WinMID versão 2.9.

Análise de Multicaspases

Este teste utiliza um inibidor de caspases conjugado a fluorocromo, o *sulforhodamine-valyl-analyl-aspartyl-fluoromethylketone* (SR-VAD-FMK), que é permeável à célula e não citotóxico. Uma vez no interior celular, o SR-VAD-FMK se liga covalentemente às múltiplas caspases, ficando retido na célula. O sinal vermelho-fluorescente é proporcional ao número de caspases ativas presentes nessa célula, ou seja, células acometidas pela via apoptótica. Nesse teste também se utiliza o 7-AAD, como controle da integridade de membrana. Se há marcação com 7-AAD, as células já estão em estágio de apoptose tardia ou até mesmo morte.

Células (1×10^6 cel/compartimento) foram inoculadas em placas de 6 compartimentos meio correspondente, mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Após 24h de estabilização, as células foram tratadas com arucanolídeo nas concentrações de 5, 10 e 15µg/mL, em duplicata ou triplicata. As leituras foram feitas após 6, 12 e 24 horas de tratamento.

Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e em 100µL da suspensão celular foram adicionados 5µL do reagente SR-VAD-FMK 20X. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C, em estufa de CO₂ e protegidas da luz. Após três lavagens com tampão de lavagem (solução estoque disponível no *kit*) seguidas de centrifugação, o *pellet* celular foi ressuspendido em 100µL de tampão de lavagem e então se adicionou 5µL 7-AAD, encubando-se por 20 minutos a temperatura ambiente, sob proteção da luz. Foram coletados 5.000 eventos de cada amostra cujos resultados foram analisados com auxílio do programa WinMID versão 2.9.

Análise da geração de ROS e perda de potencial mitocondrial por citometria de fluxo.

Esse teste avalia a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) através da marcação com o dihidroetidina (DHE) e também da perda do potencial da membrana mitocondrial com 3,3'-dihexyloxacarboyanine iodido (DiOC₆).

Células (1×10^6 cel/compartimento) foram plaqueadas em placas de 6 compartimentos e tratadas com arucanolídeo $5 \mu\text{g/ml}$ durante 12 e 24 horas. A seguir foram ressuspendidas, centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos e lavadas com PBS para marcação com 20 nM DiOC_6 e $2 \mu\text{M DHE}$. A seguir foram incubadas à 37°C durante 15 minutos (U118) e 45 minutos (HeLa e SK-MEL-2). O desacoplante CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) foi usado como controle positivo para a perda de potencial mitocondrial e o NAC (N-acetil-cisteína) foi usado como inibidor de ROS. As amostras foram lidas em um citômetro de fluxo Becton Dickinson (San Jose, CA) FACSCalibur. Foram coletados 10.000 eventos de cada amostra cujos resultados foram analisados com auxílio do programa WinMID versão 2.9.

Western Blotting

As linhagens tumorais avaliadas foram U-118 MG (glioblastoma), HeLa (adenocarcinoma de cervix), HeLa transfectada com Bcl-XL e SK-MEL-2 (melanoma). O veículo utilizado foi o DMSO, sendo que os controles negativos receberam esse diluente no volume máximo correspondente ao usado para as células tratadas (0,1% de DMSO).

Extração de Proteínas

As células foram plaqueadas em placas de petri de 10cm e tratadas com arucanolídeo $5 \mu\text{g/mL}$ durante 1, 6, 12 e 24 horas. Após o tratamento, o meio foi recolhido, as células ressuspendidas e a placa lavada com PBS. Foram centrifugados à 1500 rpm durante 5 minutos e lavados com PBS. Após nova centrifugação às mesmas condições foram ressuspendidas em 1mL de PBS e passadas para um eppendorf. Após centrifugação a 14000 rpm durante 30 segundos, o sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado $60 \mu\text{L}$ de Solução de Lise* com $1,2 \mu\text{L}$ de aprotinina (1mg/mL), $1,2 \mu\text{L}$ de leucopectina (1mg/mL) e $0,6 \mu\text{L}$ de PMSF (100mM). A amostra com a solução de lise foi mantida, em gelo, por 20-30 minutos, e armazenadas à -20°C .

*Solução de Lise:

- 5mL HEPES pH7,5 200mM
- 1mL EDTA 500mM
- 2mL β -glicerofosfato 1M
- 0,5mL 1% NP-40

- 125 μ L Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) 25mM
- 200 μ L ortovanadato 1M
- DTT 1M
- Água deionizada q.s.p 50mL

Dosagem de Proteínas

As amostras foram centrifugadas à 14000 rpm por 30 minutos à 4°C e o sobrenadante, rico em proteínas, foi colocado em outro eppendorf previamente identificado e o pellet desprezado. Quando armazenadas, às proteínas são sempre mantidas à -20°C, e quando retiradas para serem utilizadas, sempre são mantidas em gelo. Para a dosagem de proteína foi utilizado o ensaio colorimétrico de Bradford, um ensaio colorimétrico, lido em um espectrofotômetro. Em uma cubeta foram colocados 798 μ L de água MilliQ, 2 μ L de amostra e 200 μ L de Bio-rad[®] protéin assay. O Branco é lido sem amostra. A curva de padronização já estava feita e o resultado foi expresso em μ g de proteína a cada 2 μ g de amostra.

Preparação de géis

Para a preparação do gel separador a quantidade de acrilamida e água milliQ varia de acordo com a concentração do gel desejado. Além disso, são usados 4,48 mL/gel Tris HCl 1,5M pH8,8, 120 μ L/gel de SDS 10%, 20 μ L/gel de TEMED e 50 μ L/gel de Persulfato de amônia (PA – catalisa a polimerização do gel, portanto é o ultimo a ser adicionado).

Tabela 4: Quantidade de Acrilamida e Água Deionizada necessário para cada porcentagem de gel.

	Acrilamida	Água Deionizada
Gel 8%	3,2 mL/gel	4,13 mL/gel
Gel 10%	4,0 mL/gel	3,33 mL/gel
Gel 12%	4,8 mL/gel	2,53 mL/gel
Gel 15%	6,0 mL/gel	1,33 mL/gel

Todo o volume foi homogeneizado e aplicado rapidamente entre os vidros até 4/5 do volume. Depois de solidificado o gel concentrador foi aplicado. O gel concentrador foi

produzido com 0,47 mL de Tris HCl 0,5M pH6,8, 37 μ L de SDS 10%, 10 μ L de TEMED, 0,75 mL de acrilamida, 2,47 mL de água deionizada e 25 μ L de PA. Esse gel concentrador foi aplicado após a total polimerização do gel separador até transbordar e o pente enterrado lentamente. Enquanto o gel concentrador solidificava, as amostras foram preparadas.

Preparação da amostras (proteínas)

A concentração das proteínas foi ajustada para que fosse carregado 50 μ g de proteína de cada amostra, por gel. Em cada amostra, incluindo o padrão, foram adicionados 7 μ L de tampão de carga*, aquecidas à 95°C por 5min, centrifugadas à 14000 rpm por 30 segundos e aplicadas no gel. O gel foi corrido em solução de SDS-Page[#] em voltagem variada (120V-60V), dependendo do tempo disponível.

Tampão de Carga

- 0,001g Azul de Bromofenol
- 2mL glicerol
- 2,5mL Tris HCl 0,5M pH6,8
- 4mL SDS 10%
- 0,5mL β -Mercaptoetanol
- 1mL água deionizada

SDS PAGE

- 15g Tris Base
- 72g Glicina
- 2,5g SDS
- Água deionizada q.s.p. 1L

Transferência à membrana

Foram usadas membranas PVDF, permeabilizadas com metanol para a transferência. As membranas foram posicionadas no polo positivo e o gel no polo negativo cobertas com solução de transferência* overnight a 70 mA à 4°C.

*Solução de Transferência

- 800mL Tampão de Transferência [#]
- 200mL metanol

[#]Tampão de Transferência

- 4,8g Tris base
- 23,6g glicina
- Água deionizada q.s.p. 1,6L

Imunoblotting

Após a transferência a membrana foi lavada com TBST e incubada com os respectivos anticorpos primários e secundários conjugados a HRP (Cell Signaling[®]).

Anticorpos primários utilizados: Cleaved Caspase-3 (Asp 175), Caspase-8 (1C12), Cleaved Caspase-9 (Asp330) e LC3B (Cell Signaling[®]); Mouse Anti-PARP (BD[®]); Caspase-4 p20 e NF- κ B p65 (Santa Cruz[®]).

Revelação da membrana

As membranas marcadas foram lavadas 3x com TBST para completa retirada dos anticorpos não aderidos e reveladas com o Amersham ECL Western Blotting Detection Reagente (GE[®]). Posteriormente foram colocadas em caixa escura junto com os filmes de raio X (Fuji medical x-ray film - FujiFilm[®]) e expostas pelo tempo necessário. Os filmes foram então revelados em um processador de raio-x (AGFA[®], classic E.O.S, modelo é G334i).

Microscopia dos cultivos celulares

A células (U-118 e SK-MEL-2) foram plaqueadas em placas de 6 compartimentos e cresceram normalmente até atingir 80% de confluência e foram tratadas com arucanolídeo na concentração de 5 μ g/mL durante 6 e 12h. Quando desejado foi realizado o pré-tratamento com o inibidor geral de caspases Z-VAD-FMK na concentração de 50 μ M 1h antes do tratamento com o arucanolídeo. Após isso 1 μ L de Dapi, diluído em 100 μ L de PBS foram adicionados às células durante 5 minutos. As células também foram marcadas com iodeto de propídio para verificar a integridade da membrana, portanto 1 μ L de IP (solução de 1mg/mL) foi adicionado diretamente ao meio de cultura durante 5 minutos. As células foram então lavadas com PBS e observadas em microscópio de fluorescência.

Ensaio Farmacológicos “*in vivo*”

Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6J, cujos grupos experimentais foram mantidos em gaiolas individuais identificadas com temperatura constante de 22°C ± 3°C e umidade relativa do ar entre 30 e 70%, com ração e água fornecidos *ad libitum*. Todos os protocolos atenderam as normas éticas de pesquisa e foram aprovados pelo Comitê de ética Animal do Instituto de Biologia (CEEA) sob os protocolos 1438-1 e 1439-1 de fev/2008 (anexos).

Avaliação da Atividade Anticâncer em Modelo Murino: Melanoma

B16F10

Modelo de Tumor sólido

Grupos de oito camundongos C57BL/6J fêmeas, receberam 1×10^5 células B16F10 por via subcutânea no flanco do animal. O tratamento foi realizado a cada três dias, durante 20 dias e teve início no quarto dia. Um grupo recebeu solução tampão fosfato salina (PBS) (controle negativo) e outro o quimioterápico 5-Fluoracil na dose de 15mg/Kg (controle positivo), além do arucanolídeo nas doses de 5, 10 e 15mg/Kg. Após esse período os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, para as avaliações macroscópicas do peso relativo do tumor. Parte dos tumores foi processada histologicamente e realizada imunohistoquímica para fragmentação de DNA, seguindo normas do fabricante (FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Calbiochem®) (Geran, RI *et al* 1972, Henry, RJ, 1974).

Modelo experimental de metástase no pulmão

Para induzir a metástase no pulmão, $2,5 \times 10^5$ células B16-F10 foram injetadas via endovenosa na safena de camundongo C57BL/6 fêmea. Após isso, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 10 animais que foram tratados a partir do dia 2, a cada três dias, via intraperitoneal, com PBS (controle negativo), com o 5-Fluoracil nas doses de 15mg/Kg (controle positivo) e com o arucanolídeo na dose de 5, 10 e 15mg/Kg. Os animais foram eutanaziados no dia 21 e o número aparente de metástases avaliado. O pulmão foi processado para a dosagem da melanina e a diferença na quantidade de

melanina foi utilizada para quantificar a atividade antimetastática. Os resultados foram apresentados graficamente como média \pm erro padrão da média, para cada grupo de tratamento e a análise estatística foi realizada através do ANOVA – teste Duncan para $p < 0,05$.

Dosagem de Melanina

Após a retirada, o pulmão foi pesado e homogeneizado em 5mL de água destilada com a ajuda de um sonicador. A amostra foi centrifugada a 10000g por 20 min e o precipitado (ppt) lavado com 5mL de tampão fosfato pH 6,5 para remoção de materiais solúveis e nova centrifugação nas mesmas condições. A seguir o precipitado foi extraído com uma mistura de clorofórmio: metanol 2:1 (1x) e depois com etanol: éter 3:1 (2x), para retirada dos lipídios, centrifugando e descartando o sobrenadante após cada etapa.

O resíduo, após secagem, foi tratado com 1mL solução de lise contendo 0,3% de saponina em solução salina (NaCl) 0,9%, durante 30 min para remoção das hemoproteínas. Após centrifugação o ppt foi lavado com 5mM $MgCl_2$ em 0,15M NaCl (2x) e tratado com 0,01M Tris-HCl (pH 7,8) contendo 0,5% SDS; 0,01M EDTA; 100 $\mu g/mL$ Proteínase K incubado à 56° C por 2h. O produto dessa digestão foi lavado com solução salina (NaCl) 0,9% e depois com água destilada. O ppt foi dissolvido em 400 μL de uma solução de NaOH 0,1N à 56° C por 30 min para completa solubilização. A solução foi a seguir aplicada em placa de 96 compartimentos e a concentração de melanina determinada à 450nm.

Avaliação dos parâmetros sanguíneos e bioquímicos dos animais

Ao final de alguns experimentos foi determinado o hemograma de cada animal. Para tanto, o animais foram anestesiados (100 mg ketamina + 5 mg xilazina) e o sangue coletado através do plexo retro-orbitário com capilares de vidro. O sangue foi colocado em microtubos com EDTA (1mL de sangue para 50 μL de EDTA) e lido em aparelho veterinário para análise de hemograma (Sysmex®, modelo pocH-100iV), avaliando-se: leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hbg) e plaquetas (Pt). O sangue foi centrifugado a 5.000 rpm durante 30 minutos para a obtenção do soro, utilizado para determinação de: transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP), Fosfatase Alcalina (FA), Gamma-Glutamil transpeptidase (GGT)

Metodologia

relacionadas com a toxicidade hepática e de Uréia e Ácido Úrico para avaliação de toxicidade renal.

Resultados e Discussão

Isolamento do Arucanolídeo

Precipitação com acetato de chumbo

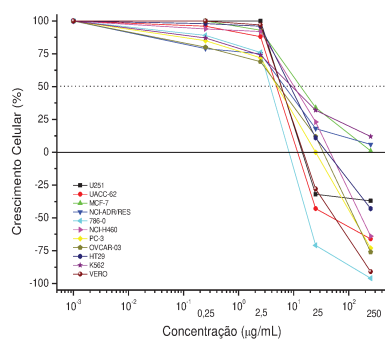
A adição de uma solução básica de acetato de chumbo 10% no extrato bruto diclorometânico (EBD), onde estão presentes os princípios ativos anticâncer, gerou a precipitação de graxas e clorofila juntamente com o chumbo, arrastando também os compostos fenólicos (Fig. 11). A solução resultante foi extraída com acetato de etila que deu origem a uma fração acetato (FrAct), rica em terpenos. O EBD e a FrAct foram avaliados em cultura de células tumorais humanas (Fig. 12).

Figura 11. Cromatografia em camada delgada (CCD) do EBD e da fração acetato (FrAct).

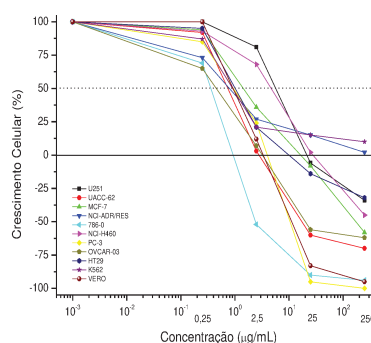


Cromatografia em camada delgada (CCD) do EBD e da fração acetato (FrAct) obtida na limpeza com acetato de chumbo. FM: Diclorometano/metanol 98:2. Revelador: Anisaldeído.

Figura 12. Atividade antiproliferativa das amostras A: EBD e B: FrAct.



A



B

Atividade antiproliferativa do EBD (A) e da FrAct (B) em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

Esse processo facilita muito o isolamento e a identificação de compostos, mas tem um rendimento muito baixo, de apenas 9,75%. Além disso, outra desvantagem desse procedimento é a quantidade gerada de resíduo de chumbo, metal pesado, altamente tóxico, de difícil descarte. No entanto, os gráficos da figura 11 demonstram que a atividade específica dessa nova fração (FrAct) aumentou em dez vezes, demonstrando que o processo de precipitação com acetato básico de chumbo concentrou os princípios ativos.

Purificação da Fração Acetato (FrAct)

A fração acetato foi submetida a uma coluna cromatográfica clássica, gerando 36 novas frações que foram reunidas em 8 grupos devido suas similaridades químicas avaliadas em CCD. O rendimento total desse processo foi de 87,07%. Esses grupos foram submetidos ao ensaio de atividade antiproliferativa *in vitro*, que revelou algumas frações de elevada potência e seletividade para as linhagens de rim, melanoma, próstata e ovário (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de TGI (Total Growth Inhibition) das amostras obtidas no fracionamento da Fração Acetato (FrAct).

Linhagem	EBD	FrAct								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
U251	25,56	41,25	64,70	12,33	12,73	56,93	38,32	38,40	90,85	46,34
UACC62	13,77	3,70	72,47	8,19	1,83	28,28	15,39	55,38	55,99	19,08
MCF-7	204,85	17,17	75,99	6,64	17,85	80,44	34,95	92,45	64,42	160,04
NCI-ADR	228,58	132,71	74,22	117,50	137,91	>250	>250	192,27	>250	95,95
786-O	8,41	0,99	36,45	1,44	1,02	14,85	12,60	9,52	35,52	10,08
NCI-460	44,22	35,20	85,90	22,51	7,19	30,10	53,61	82,94	67,92	168,01
PC-3	24,35	3,38	37,67	4,60	1,48	10,55	20,43	14,76	38,53	29,21
OVCAR03	28,08	3,60	32,52	3,27	5,70	21,96	21,55	34,97	61,80	49,72
HT-29	50,45	19,69	58,70	4,27	9,34	13,35	37,10	68,51	63,34	123,82
K562	>250	183,32	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
VERO	18,28	3,12	43,46	3,27	1,50	14,03	11,61	26,35	57,67	22,44

Os valores de TGI, isto é, a concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular (Tabela 5), duas frações tiveram destaque, as frações 2 e 3. E por isso

foram submetidas à cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas. A fração 3 estava praticamente pura, composta por uma substância com 85% de pureza que a ressonância magnética nuclear (RMN) (Figs. 13-19 e Tabela 6) identificou como arucanolídeo, um dos germacranolídeos já descritos para essa espécie (Ferreira *et al*, 1980). A fração 2 também possui o arucanolídeo em sua composição, porém em menor quantidade.

Figura 13. Fragmentograma (espectrômetro de massas) do Arucanolídeo.

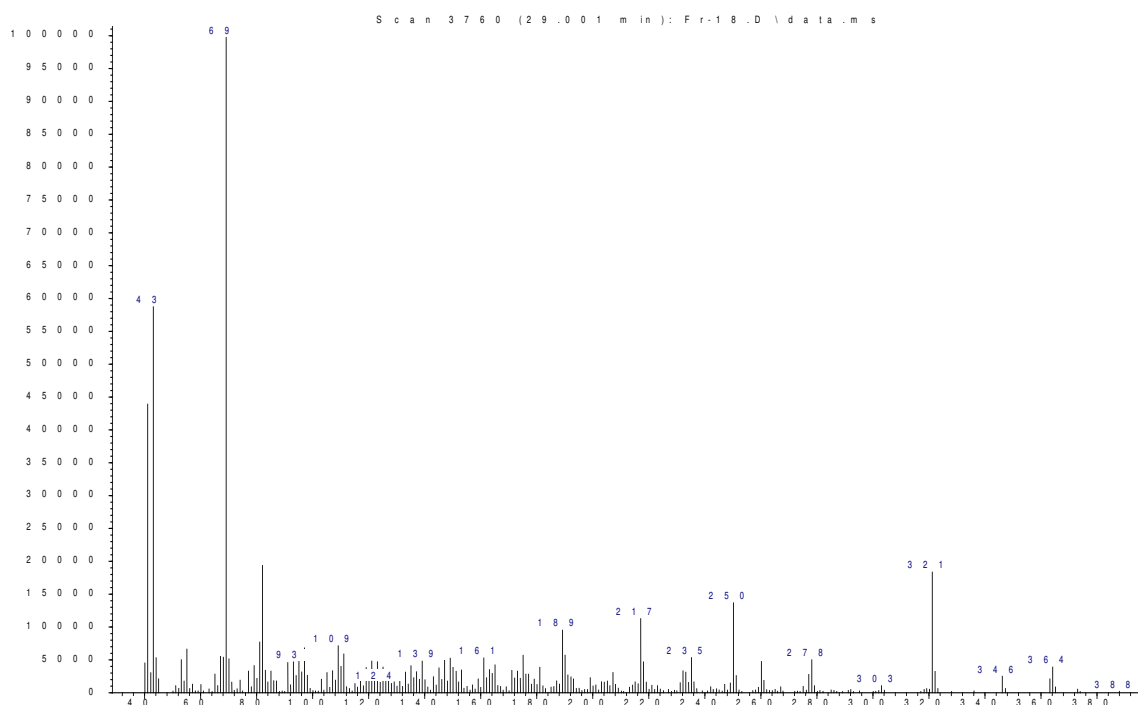


Figura 14. Espectro de RMN¹H(499,88 MHz) em CDCl₃ para o composto Arucanolídeo.

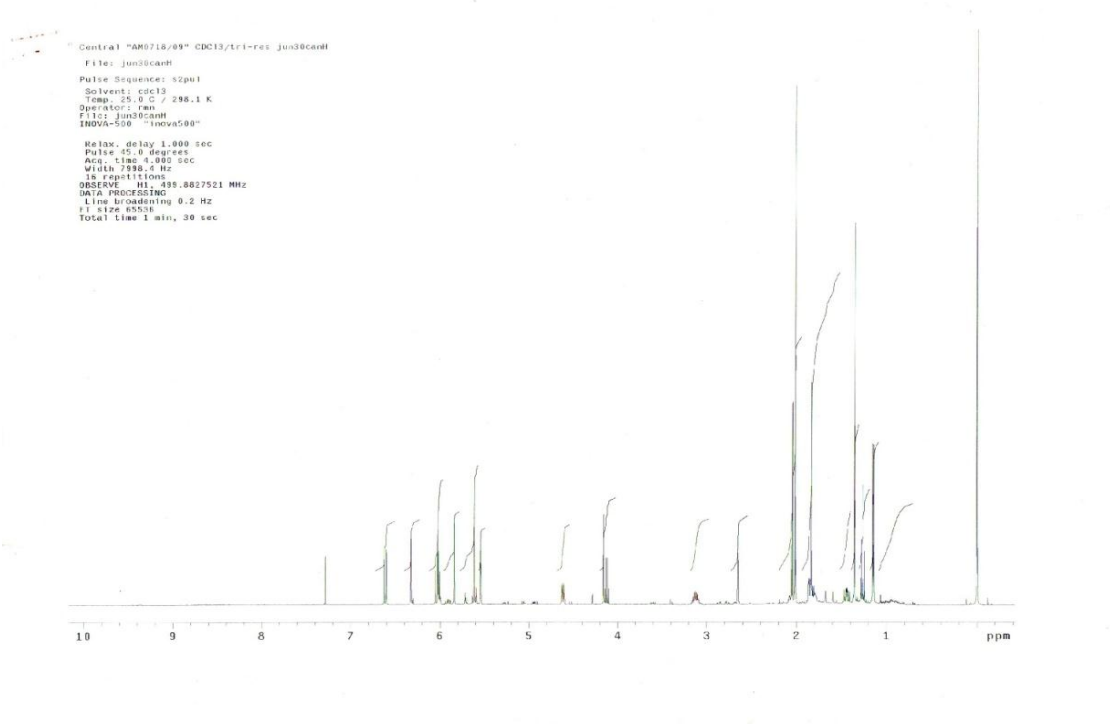


Figura 15. Espectro de RMN¹³C (125,69 MHz) em CDCl₃ para o composto Arucanolídeo.

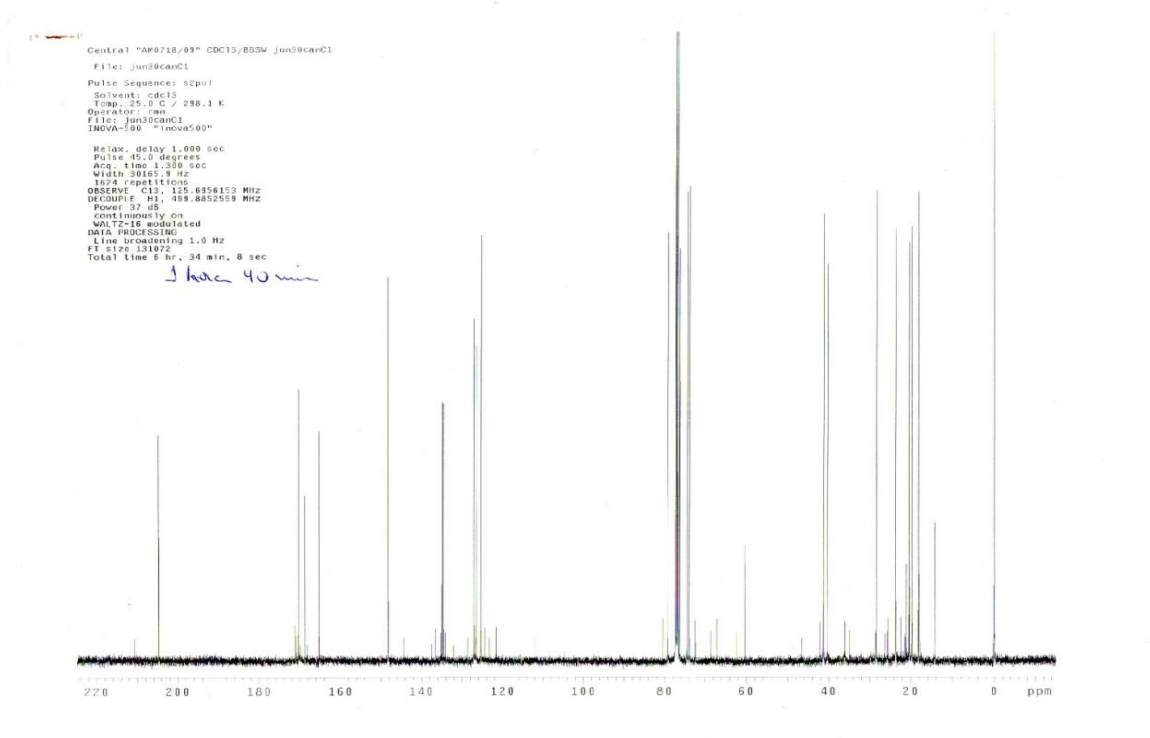


Figura 16. Espectro de RMN¹³C (125,69 MHz) em CDCl₃ obtido na sequência de pulso DEPT para o composto Arucanolídeo.

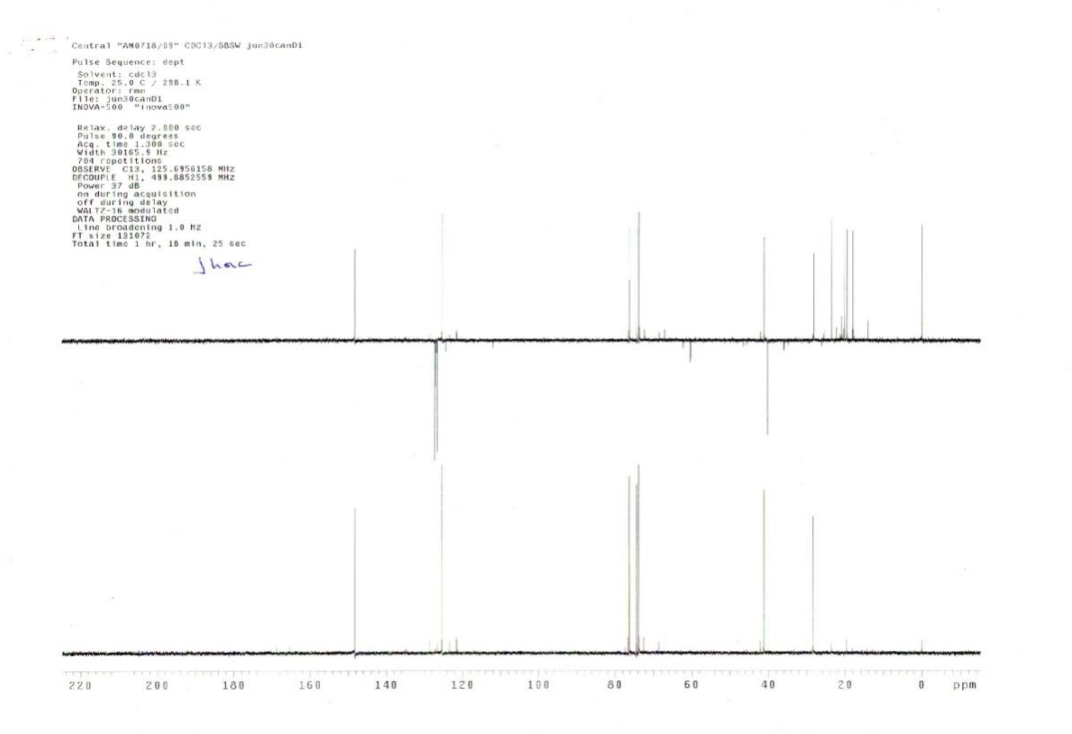


Figura 17. Espectro de RMN¹H (499,88 MHz) x ¹³C (125,69 MHz) em CDCl₃ obtido na sequência de pulso HSQC para o composto Arucanolídeo.

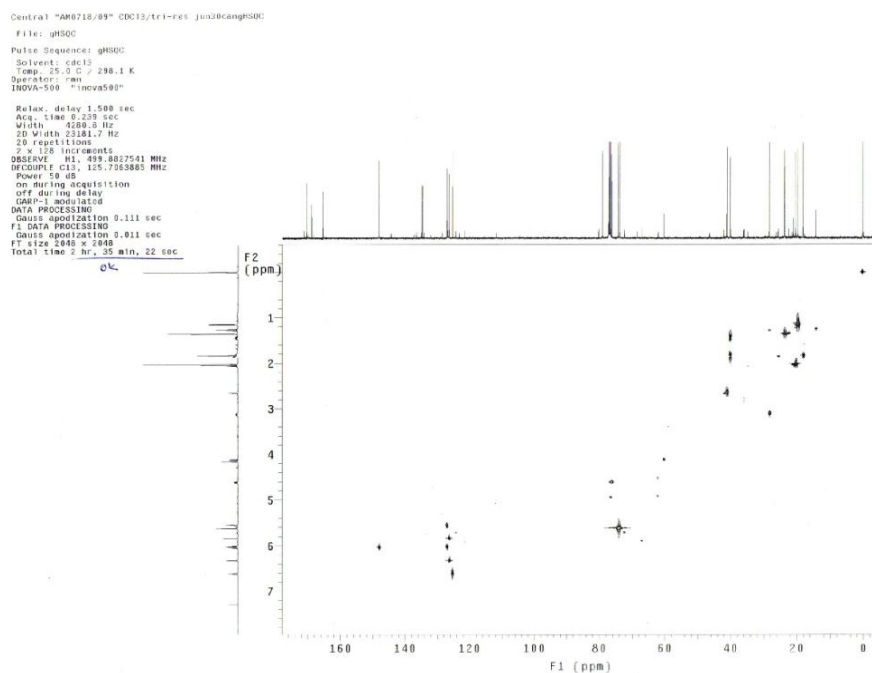


Figura 18. Espectro de RMN¹ H (499,88 MHz) x ¹³C (125,69 MHz) em CDCl₃ obtido na sequência de pulso HMBC para o composto Arucanolídeo.

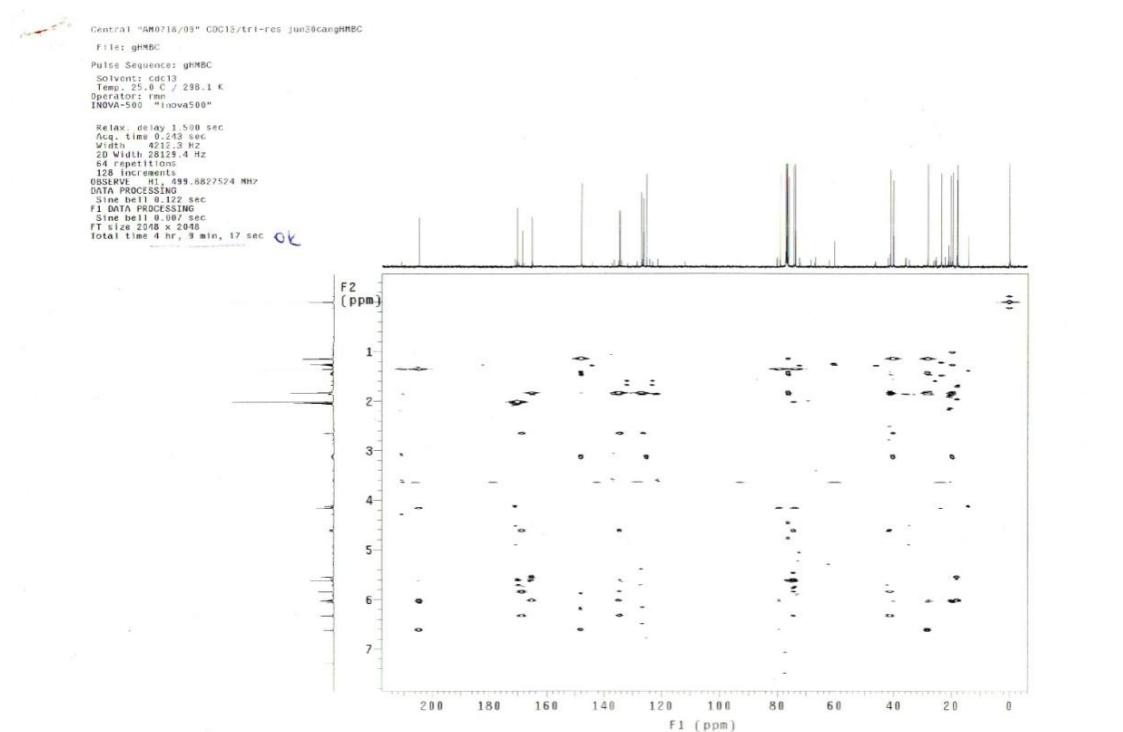


Figura 19. Espectro de RMN¹ H x ¹H (499,88 MHz) em CDCl₃ obtido na sequência de pulso COSY para o composto Arucanolídeo.

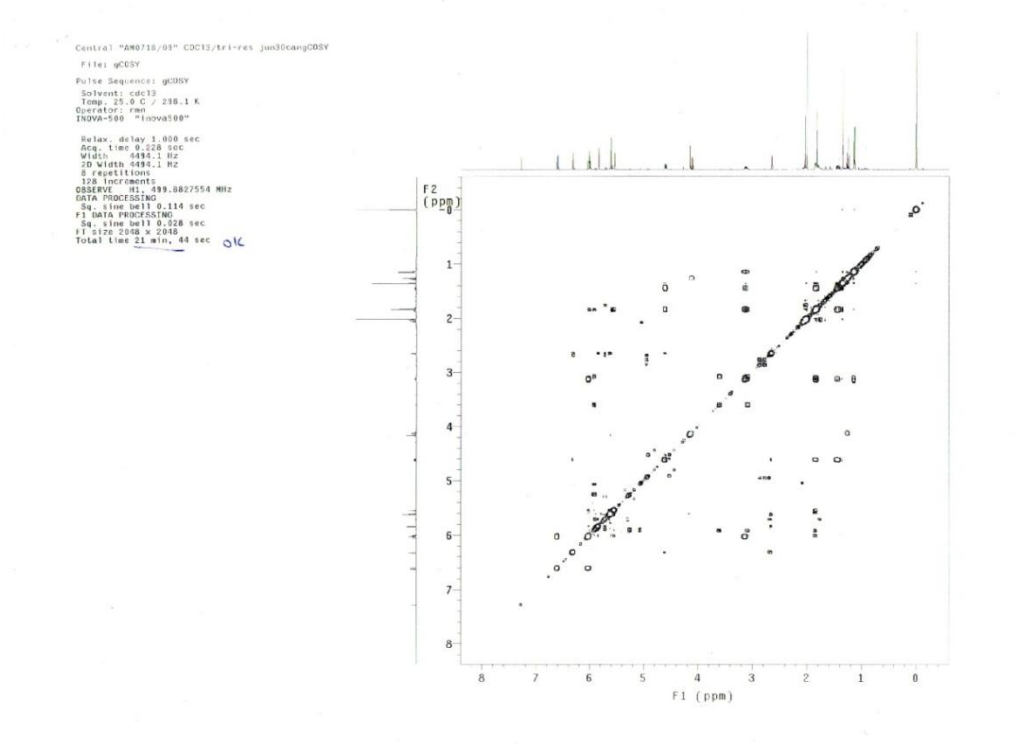
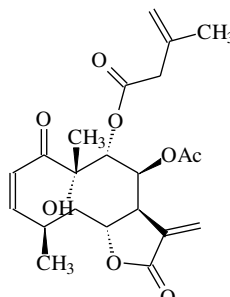


Tabela 6. Dados espectrais de RMN¹H e ¹³C do Arucanolideo (C₂₁H₂₆O₈) (11 Tesla, CDCl₃).

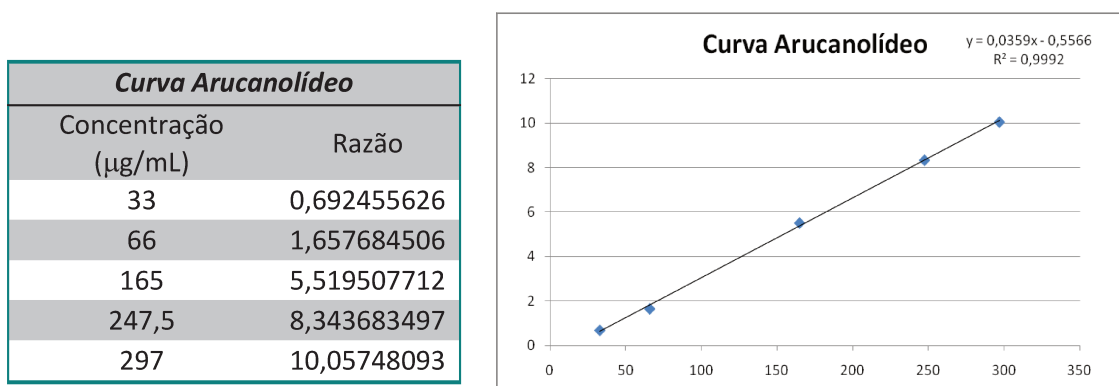
Carbono	δ C (experimental)	δ C (Ferreira et al., 1980)	δ H (mult; JH,H in Hz) (experimental)	δ H (mult; JH,H in Hz) (Ferreira et al., 1980)
				
1	204.69	204.1	-	-
2	125.39	125.5	6.61(d;11.7)	6.61(d;12)
3	148.23	148.3	6.03 (t;11.5)	6.03(dd;12,11.5)
4	28.31	28.3	3.12 (m)	3.13(ddd;12,7,5)
5	40.28	40.3	1.86 (m)	1.83 (dd, 14,5)
5'	40.28	40.3	1.44 (m)	1.44 (dd; 14,12)
6	76.35	76.4	4.62 (dd; 4.9,11.7)	4.62*
7	41.26	41.3	2.65 (br s)	2.66*
8	74.43**	74.0**	5.61 (br s)	5.62*
9	73.94**	74.5**	5.61 (br s)	5.62*
10	79.26	79.3	-	-
11	134.63	134.7	-	-
12	168.75	168.9	-	-
13	126.53	126.6	5.84 (d; 1.46)	5.84*
13'	126.53	126.6	6.32 (d; 1.0)	6.32*
14	23.63	23.6	1.35 (s)	1.35*
15	19.73	19.7	1.14 (d;6.35)	1.14*
16	165.35	165.4	-	-
17	134.93	135.0	-	-
18	127.13	127.3	5.62 (d;1.46)	5.54*
18'	127.13	127.3	6.01 (d;1.0)	6.01*
19	18.09	18.1	1.83 (t; 1.0)	1.83*
20	170.31	170.4	-	-
21	20.37	20.4	2.01 (s)	2.01*

*Dados não apresentados na referência; **Dados intercambiáveis.

Dosagem do Arucanolídeo

A dosagem do arucanolídeo no extrato bruto e na fração acetato foi feita por cromatografia gasosa – espectrometria de massas com o DBF (dibutilftalato) como padrão interno (PI). Foi feita uma curva de diferentes concentrações do Arucanolídeo (Pd) com concentração conhecida do PI. O gráfico, concentração *versus* razão área Pd/PI foi construído no Excel, gerando uma equação de reta (Fig. 20).

Figura 20. Curva de diferentes concentrações do arucanolídeo.



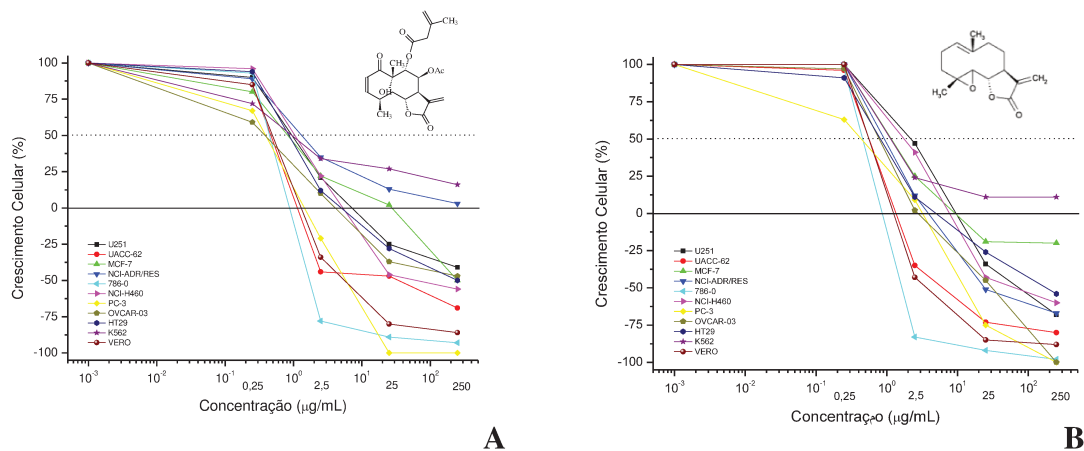
As amostras testadas (EBD e Fr. Act.) foram diluídas em 1mg/mL e a razão das áreas (Pd/PI) foi substituída na equação da reta ($y=0,0359x-0,5566$) encontrando 3,17% de arucanolídeo no EBD (31,7µg de arucanolídeo em 1mg de EBD) e 25,1% na Fr. Act. (251,1µg de arucanolídeo em 1mg de Fr. Act.).

Após o isolamento do arucanolídeo, o partenolídeo, germacranolídeo mais estudado, isolado da planta *Tanacetum parthenium*, foi submetido ao teste de atividade antiproliferativa com o objetivo de analisar o perfil de atividade desse composto frente às linhagens celulares usadas nesse trabalho, como um controle positivo (Fig. 21).

A planta *Tanacetum parthenium*, popularmente conhecida como *feverfew*, tem seu uso popular para o tratamento de enxaquecas, dores de estômago, dores de dente, irregularidades menstruais e artrite reumatoide, com atividade antiinflamatória confirmada (Parada-Turska *et al*, 2007; Sur *et al*, 2009). Em sua composição possui o germacranolídeo partenolídeo, com atividade antiproliferativa e anticâncer amplamente estudada. Apresenta atividade antiproliferativa em células de meduloblastoma (TE671), carcinoma de pulmão (A549), adenocarcinoma de cólon (HT-29) e células endoteliais da veia umbilical

(HUVEC) e *in vivo* contra câncer de pele induzido por UV e em modelos de tumor xenográfico de câncer de mama (Parada-Turska *et al*, 2007).

Figura 21. Atividade antiproliferativa do Arucanolídeo e Partenolídeo



Atividade antiproliferativa do arucanolídeo, isolado de *C. pinnatifida* (A) e do Partenolídeo (Sigma[®]) (B) em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

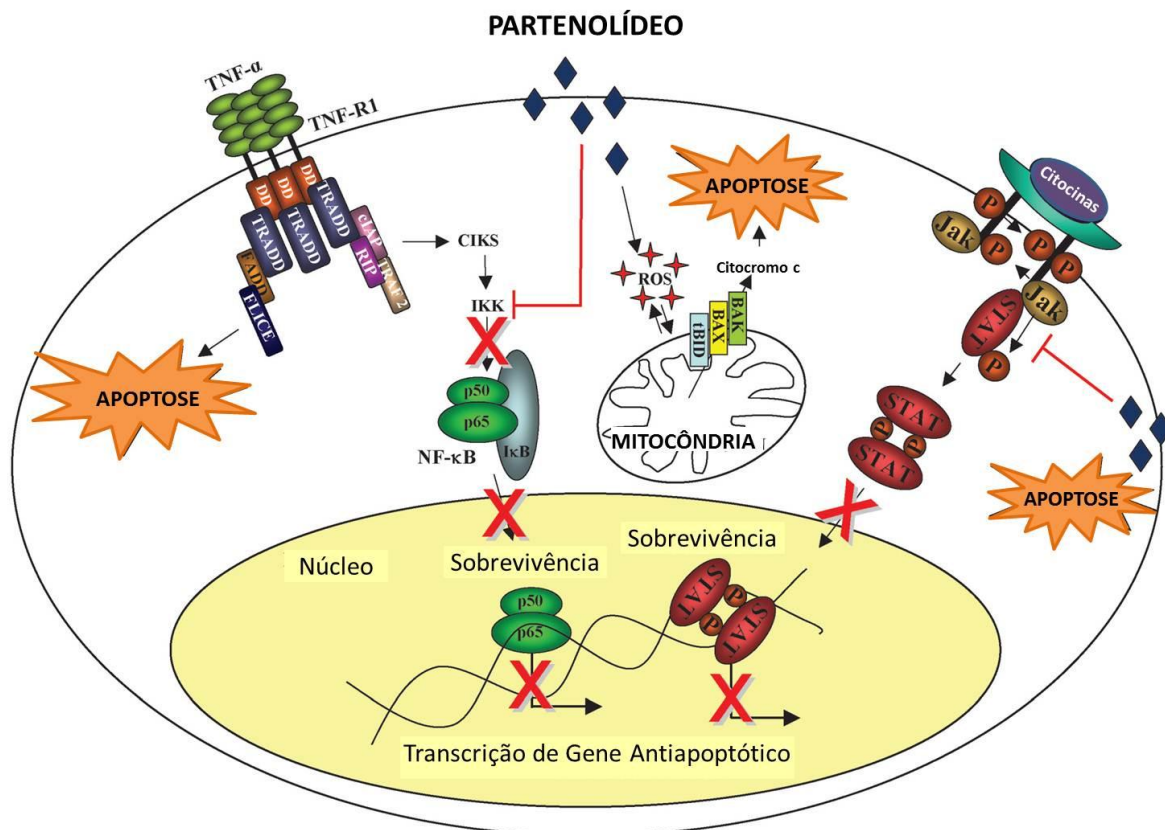
Tabela 7. Valores de TGI (Total Growth Inhibition) do Arucanolídeo e do Partenolídeo.

Linhagem	Arucanolideo	Partenolideo
U251	12,73	11,24
UACC-62	1,83	1,62
MCF-7	17,85	25,18
NCI-ADR/RES	137,91	1,08
786-O	1,02	1,08
NCI-460	7,19	9,53
PC-3	1,48	2,60
OVCAR03	5,70	4,03
HT-29	9,34	8,87
K562	>250	168,36
VERO	1,50	49,72

Diversos estudos a respeito do mecanismo de ação do partenólídeo foram realizados mostrando ativação da Jun-quinase N-terminal (JNK), redução da atividade da MAP quinase e geração de ROS. Além disso, também funciona como inibidor do fator de transcrição NF-kappaB, prevenindo a degradação de IκB-α e IκB-β (Pajak *et al*, 2008).

O fator de transcrição NF-κB é importante na expressão de genes de citocinas envolvidos na resposta inflamatória celular, na resposta imune e também na regulação da proliferação celular, transformação e desenvolvimento tumoral. Também regula genes responsáveis pela invasão tumoral, metástase e quimiorresistência (Parada-Turska *et al*, 2007; Pajak *et al*, 2008; Sweeney *et al*, 2005).

Figura 22. Mecanismos de atividade pró-apoptóticas do Partenólídeo



Modelo para os mecanismos de indução de apoptose do partenólídeo. Inibição do NF-kB e da atividade de transcrição das STATs resulta na regulação da transcrição de genes anti-apoptóticos. Como consequência, as células cancerosas tornam-se sensíveis à indução de apoptose por via extrínseca. Além disso, o estresse oxidativo induzido pelo partenólídeo media a disfunção mitocondrial e inicia a apoptose por via intrínseca. (modificado de Pajak *et al*, 2008).

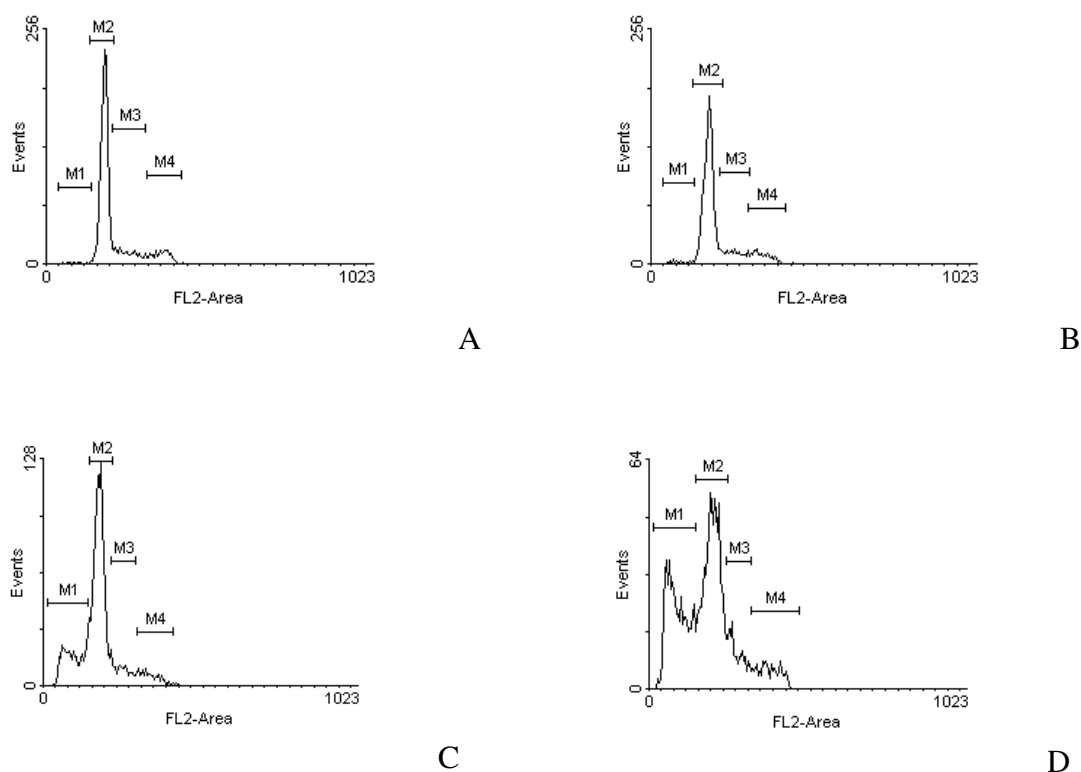
Analisando o gráfico do partenolídeo (Fig. 21) e os valores de TGI na tabela 7 verificamos similaridades no perfil de atividades, com grande seletividade para as linhagens de melanoma (UACC-62) e rim (786-O), sugerindo que eles possam estar agindo da mesma maneira nessas células. E essa atividade pode estar relacionada ao núcleo comum destas moléculas, incluindo o grupo α -metileno- γ -lactona. Além disso, o partenolídeo apresenta elevada potência para a linhagem de ovário resistente a múltiplas drogas. Já o arucanolídeo é mais potente que o partenolídeo para a linhagem VERO, sugerindo que o arucanolídeo apresente uma toxicidade maior, já que esta é uma linhagem não tumoral. No entanto, somente estudos em modelos utilizando animais de laboratório podem determinar a toxicidade desses compostos. As similaridades encontradas podem sugerir que o arucanolídeo tenha o mesmo mecanismo de ação do partenolídeo, pelo menos em algumas células (Fig. 22).

Atividade do Arucanolídeo em células de glioblastoma U-118

MG

Um glioma é um tumor maligno originário de células da glia, que são constituintes do tecido que sustenta e rodeia os neurônios no Sistema Nervoso Central. São tumores agressivos, invasivos e com baixo prognóstico de tratamento. As células U-118 são derivadas de um glioma maligno, classificado como um astrocitoma de grau IV (glioblastoma multiforme) (OMS, 2012; ATCC, 2012). O arucanolídeo apresenta um baixo TGI para a linhagem de glioma U-251 ($TGI_{U251}=12,73\mu\text{g/mL}$), devido a isso, seu mecanismo de morte celular foi avaliado usando a linhagem U-118 MG, disponível no laboratório do Dr. Faustino Mollinedo, no Centro de Investigación del Cáncer, da Universidad de Salamanca, Salamanca, Espanha.

Figura 23. Ciclo celular das células U-118



Histograma representativo do conteúdo de DNA da células U118, A: sem tratamento; tratadas com arucanolídeo $5\mu\text{g/mL}$ durante B: 6h; C: 12h; D: 24h, marcados com Iodeto de propídio (IP) obtidos em citômetro de fluxo.

Tabela 8: Porcentagem das fases do ciclo celular das células U118 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, em diversos tempos.

	Controle	06h	12h	24h
Sub-G1	1,317	1,533	19,63***	39,51***
G1	75,67	75,18	69,69	45,03
S	15,32	15,75	9,24	11,47
G2/M	8,977	8,41	3,575	5,29

Esses resultados mostram claramente o aumento da porcentagem de células em sub-G1 que de 1,3% nas células não tratadas, chega em quase 40% nas células tratadas com arucanolídeo 5µg/mL durante 24h (Figs. 23, Tabela 12), caracterizando a presença de fragmentação de DNA. Essa fragmentação de DNA é típica de morte celular induzida por apoptose (Leist *et al*, 2001). Para confirmar a indução de apoptose nas células U-118 foi analisada a exposição de fosfatidilserina pela marcação com anexina-V através de citometria de fluxo e também foi avaliada a presença de proteínas apoptóticas por western blotting.

Figura 24. Exposição de fosfatidilserina e permeabilização da membrana plasmática das células U-118

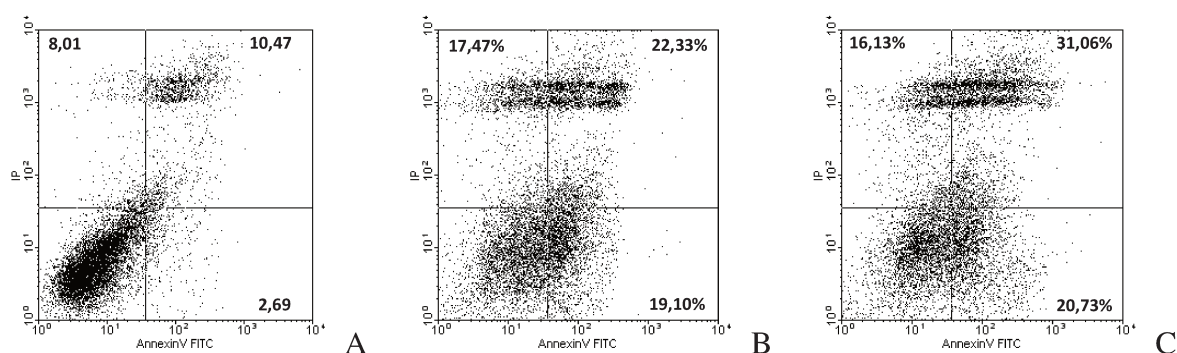


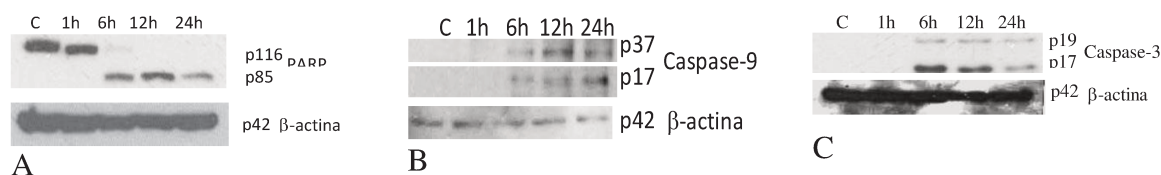
Gráfico representativo estilo dotplot das células U118, A: sem tratamento e tratadas com arucanolídeo 5µg/mL durante B: 12h; C: 24h marcados com Anexina-V (y) e Iodeto de propídio (IP) (x) obtidos em citômetro de fluxo com as porcentagens de células de cada quadrante.

Tabela 9. Porcentagem de células U118 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com Anexina-V e Iodeto de Propídio.

	Controle	12h	24h
Apoptose Inicial	2,69	19,105*	20,735*
Apoptose Tardia	10,47	22,335	31,065*
Mortas	8,015	17,475	16,135

Esses resultados (Figs. 24, Tabela 9) confirmam a indução de apoptose, pelo menos para a maioria das células mortas, já que a marcação do iodeto de propídio só é possível quando a membrana plasmática já perdeu sua integridade, o que caracteriza células não viáveis. A marcação com apenas a anexina-V (Tabela 9) ainda pode caracterizar os tipos “apoptose-like” e “necrose-like” de morte celular, apesar de a hipótese apoptose ainda não ser descartada, principalmente pelo fato de a exposição de fosfatidilserina ser uma etapa inicial da apoptose (Leist *et al*, 2001).

Figura 25. Western Blotting nas células U-118 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL em diversos tempos



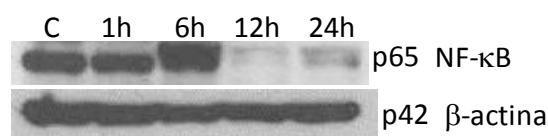
Proteínas extraídas de células U-118 sem tratamento (C) e tratadas com arucanolídeo 5µg/mL durante 1, 6, 12 e 24h. A: PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) e β-actina; B: Caspase-9 e β-actina; C: Caspase-3 e β-actina.

Os resultados de Western Blotting confirmam a indução de apoptose, pelo arucanolídeo, na dose de 5µg/mL, a partir de 6h de tratamento. A clivagem do PARP, a ativação de caspase-9 e caspase-3 (Fig. 25) demonstram o envolvimento da mitocôndria nesse processo, através da via intrínseca da apoptose. Não foi provado o envolvimento da via extrínseca, já que não foi detectada a ativação de caspase-8 (dados não mostrados).

Sabe-se que o Partenolídeo possui várias rotas de indução de apoptose, entre eles a inibição do fator de transcrição NF- κ B, através da alquilação na subunidade p65 e da inibição do IKK, que impede a fosforilação de seu inibidor, $\text{I}\kappa\text{B}$, inibindo sua ativação (Garcia-Pineros *et al*, 2001, Pajak *et al*,2008). Devido a similaridade de estrutura química e do perfil de atividade frente as linhagens tumorais avaliadas, o arucanolídeo poderia estar inibindo produção de fatores anti-apoptóticos pela célula através da inibição do fator de transcrição NF- κ B.

Zanotto-Filho e colaboradores, em 2011, mostraram que o partenolídeo, bem como outros inibidores de NF- κ B, apresentou baixa toxicidade para os astrócitos normais, indicando selectividade para células cancerosas. No entanto, em glioblastomas (células U-138 MG, U-87, U-373 e C6), produziu disfunção mitocondrial (despolarização da membrana, *downregulation* da bcl-xL e liberação do citocromo c) e parada na fase G2/M nas etapas iniciais do tratamento com partenolídeo. Estes eventos foram seguidos da presença de sub-G1, formação de corpos apoptóticos e ativação da caspase-3. Por outro lado, Anderson & Bejcek, em 2008, demonstraram que o partenolídeo é capaz de induzir apoptose, com ativação de caspase-3/7, sem afetar o fator de transcrição NF- κ B em células U-87.

Figura 26. Western Blotting para subunidade p65 do NF- κ B e β -actina nas células U-118 tratadas com arucanolídeo 5 μ g/mL em diversos tempos.



Proteínas extraídas de células U-118 sem tratamento (C) e tratadas com arucanolídeo 5 μ g/mL durante 1, 6, 12 e 24h.

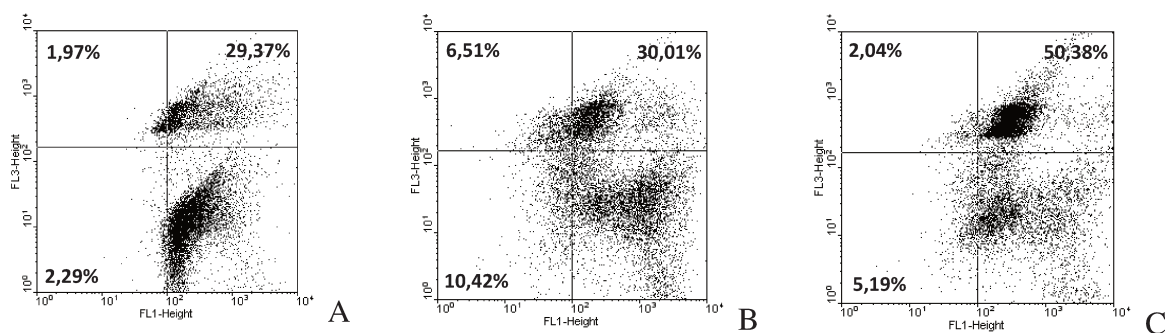
O fator de transcrição NF- κ B é formado de duas subunidades, uma p65 e outra p50. Essas subunidades unidas funcionam como fator de transcrição, se ligando diretamente ao DNA, sendo responsável pela transcrição de diversos fatores anti-apoptóticos, fatores de crescimento e citocinas inflamatórias. No citoplasma o NF- κ B está ligado diretamente ao seu inibidor o $\text{I}\kappa\text{B}$, que impede sua translocação ao núcleo. Ao ser fosforilado por uma

quinase, denominada IKK, o κ B libera o NF- κ B, que será translocado para o núcleo, funcionar como um fator de transcrição. A liberação do κ B no citoplasma, o direciona diretamente para a degradação proteossômica (Maeda & Omata, 2008).

Nesse caso apenas a subunidade p65 do NF- κ B foi avaliada, em extrato de proteínas totais. Nota-se uma redução dessa proteína a partir de 12h de tratamento com o arucanolídeo 5 μ g/mL (Fig. 26). Esse resultado pode sugerir uma redução do fator de transcrição NF- κ B após o tratamento com o arucanolídeo, porém esse resultado só pode ser confirmado com outras avaliações. Essa redução não pode ser afirmada quando avaliada no extrato de proteínas totais, podendo gerar, neste caso, um falso positivo. Uma forma inicial de avaliação da inibição deste fator de transcrição pode ser feita detectando seu inibidor, o κ B, pois quando este não está ligado ao NF- κ B, ele é rapidamente degradado. Como outra opção a avaliação de suas subunidades como a p65, deveria ser feita separadamente nos extratos de proteínas citoplasmáticas e nucleares. Os testes para confirmar a inibição do NF- κ B pelo arucanolídeo ainda não foram realizados.

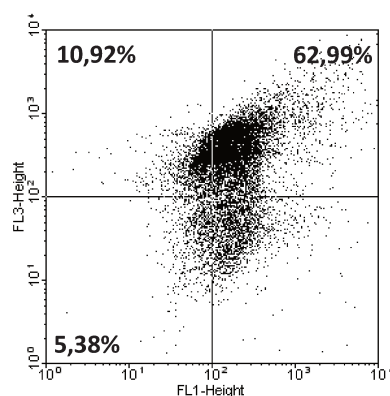
Outro aspecto importante na indução de apoptose por lactonas sesquiterpênicas é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando as células a morrerem por apoptose. Por isso, as células U-118 MG foram submetidas à marcação com o DHE e Dioc₆ após o tratamento com arucanolídeo 5 μ g/mL (Figs. 27 e Tabela 14).

Figura 27. Geração de ROS e avaliação do potencial de membrana mitocondrial das células U-118



Dotplot das células U118, A: sem tratamento e tratadas com arucanolídeo 5 μ g/mL durante B: 12h; C: 24h, marcados com DHE (y, FL3) e Dioc₆ (x, FL1) obtidos em citômetro de fluxo com as porcentagens de células de cada quadrante.

Figura 28. Geração de ROS e avaliação do potencial de membrana mitocondrial das células U-118 tratadas com CCCP 100 μ M durante 24h.



Dotplot das células U118, tratadas com CCCP 100 μ M/mL durante 24h, marcados com DHE (y, FL3) e Dioc₆ (x, FL1) obtidos em citômetro de fluxo com as porcentagens de células de cada quadrante.

O CCCP (Carbonil cianido *m*-clorofenil hidrazona) é um inibidor da fosforilação oxidativa. Ele provoca um desacoplamento do gradiente de prótons, que é estabelecido durante a atividade normal dos transportadores de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. Foi usado como controle positivo para a perda de potencial mitocondrial (Park *et al*, 1997).

Tabela 10. Porcentagem de células U118 tratadas com arucanolídeo 5 μ g/mL, marcadas com DHE (ROS) e Dioc₆ ($\Delta\Psi_m$ - Potencial membrana mitocondrial).

	Controle	12h	24h	CCCP
ROS	29,37	30,01	50,385***	62,99***
$\Delta\Psi_m$	2,29	10,42*	5,195	5,38
Dupla	1,975	6,515	2,045	10,92

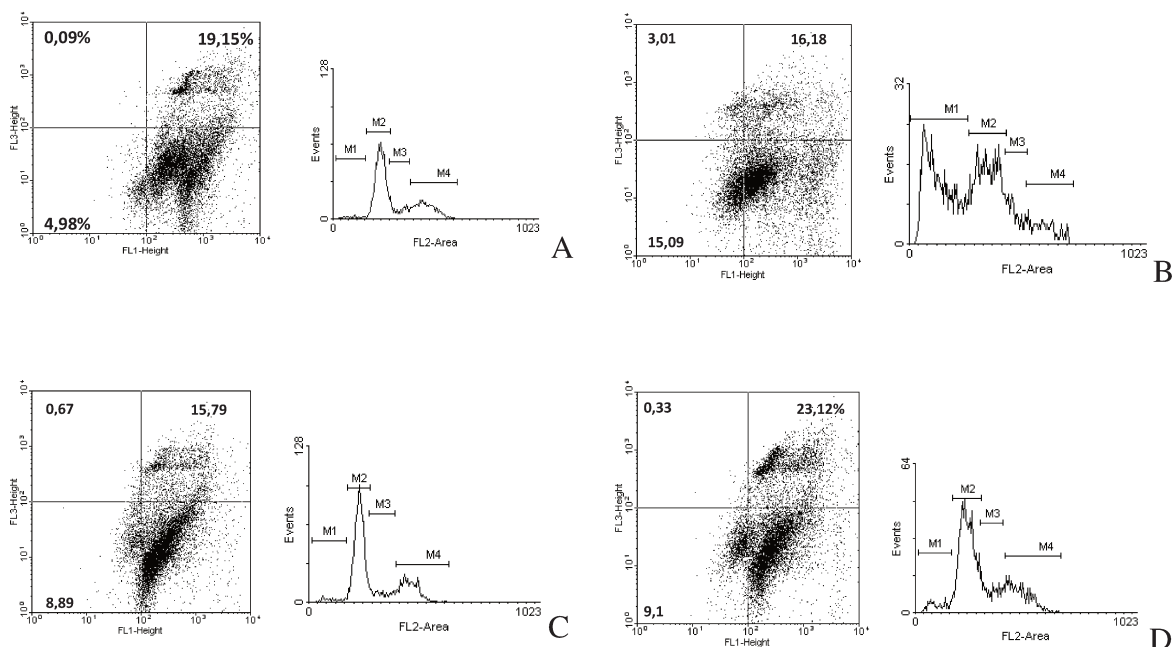
Em se tratando de um experimento altamente sensível, o controle apresenta uma grande quantidade de radicais livres, porém é notável o aumento após o tratamento com o arucanolídeo 5 μ g/mL e com o CCCP após 24h (Figs 27-28, Tabela 10). Apesar de não haver um aumento significativo na porcentagem de células que perderam potencial de

membrana mitocondrial, é notável o deslocamento celular para essa direção, comprovando a importância da mitocôndria na indução de apoptose pelo arucanolídeo (Fig. 27).

Nesse experimento, mesmo o CCCP sendo um desacoplante da membrana mitocondrial, não houve grande aumento no número de células que perderam o potencial mitocondrial, mas sim um grande aumento na quantidade de radicais livres gerados, confirmando a ação do arucanolídeo na mitocôndria (Fig. 28).

Para avaliar se essa geração de radicais livre era essencial para a indução de apoptose pelo arucanolídeo, as células U-118 foram previamente tratadas com um antioxidante, o N-acetil-cisteína (NAC) na dose de 10mM/mL 1 hora antes do tratamento com o arucanolídeo e foram avaliados quanto a geração de radicais livres, potencial de membrana mitocondrial e ciclo celular.

Figura 29. Geração de radicais livres, avaliação do potencial de membrana mitocondrial e ciclo celular das células U-118



Mesma alíquota de células U-118, A: sem tratamento; B: tratadas com com arucanolídeo 5µg/mL durante 24h; C: tratadas com NAC 10mM/mL; D: tratadas com NAC 10mM/mL seguidas pelo tratamento com arucanolídeo 5µg/mL durante 24h. Gráfico estilo dotplot das células marcadas com DHE (y, FL3) e Dioc₆ (x, FL1) lidos em citômetro de fluxo com as porcentagens de células de cada quadrante. Histograma do conteúdo de DNA marcados

com Iodeto de propídio (IP) obtidos em citômetro de fluxo.

Tabela 11: Porcentagem de células U118 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com DHE (ROS) e Dioc₆ ($\Delta\Psi_m$ - Potencial membrana mitocondrial).

	Controle	NAC 10mM	NAC 10mM +	
			Arucanolídeo 5µg/mL 24h	Arucanolídeo 5µg/mL 24h
ROS	19,15	15,79	16,18	23,12
$\Delta\Psi_m$	4,98	8,89	15,09*	9,1
Dupla	0,09	0,67	3,01	0,335

Tabela 12: Valores das fases do ciclo celular das células U118 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL.

	Controle	NAC 10mM	NAC 10mM +	
			Arucanolídeo 5µg/mL 24h	Arucanolídeo 5µg/mL 24h
Sub-G1	2,81	3,04	32,85***	6,31*
G1	63,88	65,61	45,38*	52,32
S	10,64	9,78	8,51	18,07
G2/M	25,02	22,07	7,92**	26,87

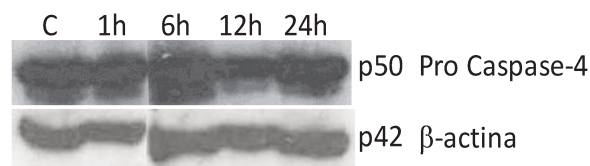
Esses resultados mostram que o tratamento prévio com um antioxidante como o NAC reduziu o número de células em fase sub-G1, isto é com DNA fragmentado, sugerindo uma redução da indução de apoptose pelo arucanolídeo 5µg/mL durante 24h (Fig. 29 e Tabelas 11 e 12).

Não se pode afirmar que o pré-tratamento com o NAC reduziu a morte celular provocada pelo arucanolídeo, pois esse composto pode ter a capacidade de induzir a morte celular por outras vias, quando sua via principal, nesse caso a geração de ROS, está bloqueada. Além disso, seria importante também avaliar a ativação de caspases nesse processo e também o uso de diferentes antioxidantes como pré-tratamento para melhor avaliar o mecanismo de ação do arucanolídeo nas células de glioblastoma U-118 MG.

Como a perda do potencial da membrana mitocondrial não foi tão evidente, e o retículo endoplasmático também é capaz de gerar radicais livres, a atividade do arucanolídeo na caspase-4, caspase ativada com o aumento de estresse do retículo endoplasmático, foi avaliada através de *western blotting*.

A caspase-4 se localiza predominantemente na membrana externa do retículo endoplasmático, e desempenha papéis importantes na apoptose induzida pelo estresse de retículo endoplasmático. Sabe-se que indutores farmacológicos de estresse de retículo endoplasmático como a tunicamicina e taspigargina induzem a apoptose em linhagens celulares de melanoma humano por ativação da caspase-4. Contudo, está claro que a ativação da caspase-4 por essas moléculas em células de melanoma é independente da ativação de caspase-8, e sim dos eventos mitocondriais apoptóticos e de ativação da caspase-9 e -3 (Mao *et al*, 2010).

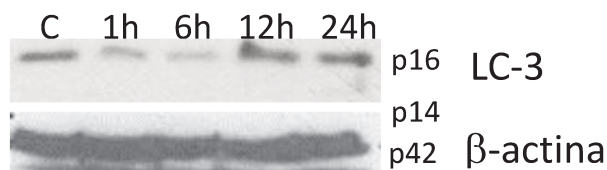
Figura 30. Western Blotting caspase-4 e β -actina nas células U-118 tratadas com arucanolídeo 5 μ g/mL em diversos tempos.



Proteínas extraídas de células U-118 sem tratamento (C) e tratadas com arucanolídeo 5 μ g/mL durante 1, 6, 12 e 24h.

Os resultados mostram não haver ativação da caspase-4 visto que apenas a pró Caspase-4 foi detectada, sugerindo a ausência de estresse de retículo endoplasmático (Fig. 30). Além disso, não foi identificada a indução de autofagia pelo arucanolídeo na dose de 5 μ g/mL, pois não foi detectado a presença da proteína LC-3BII (p14), apenas a constitutiva LC-3BI (p16) (Fig. 31).

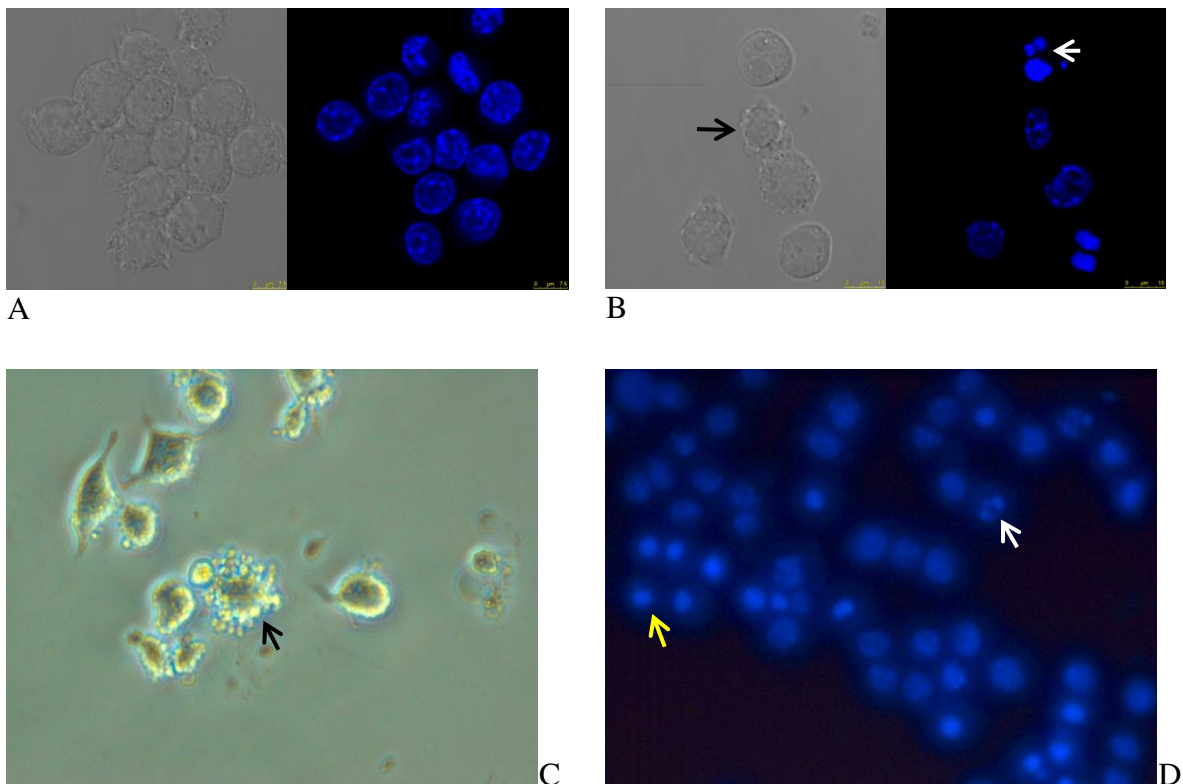
Figura 31. Western Blotting LC-3B e β -actina nas células U-118 tratadas com arucanolídeo 5 μ g/mL em diversos tempos.



Proteínas extraídas de células U-118 sem tratamento (C) e tratadas com arucanolídeo 5 μ g/mL durante 1, 6, 12 e 24h.

Outro aspecto importante a ser levado em consideração nos tipos de morte celular é a morfologia celular. A apoptose apresenta alterações morfológicas características, especialmente evidente no núcleo, onde a cromatina se condensa e compacta em figuras geométricas e aparentemente simples (globular, em forma de lua crescente). Outras características típicas incluem a retração citoplasmática, o *blebbing* de membrana (protuberância irregular da membrana plasmática de uma célula ao morrer, análogo ao borbulhamento de fermentação por leveduras) e a formação de corpos apoptóticos (com fragmentos nucleares). A necrose é frequentemente associada com edema celular (inchaço de organelas) e ausência de *blebbing* de membrana (Leist *et al*, 2001).

Figura 32. Fotomicrografia nas células U-118

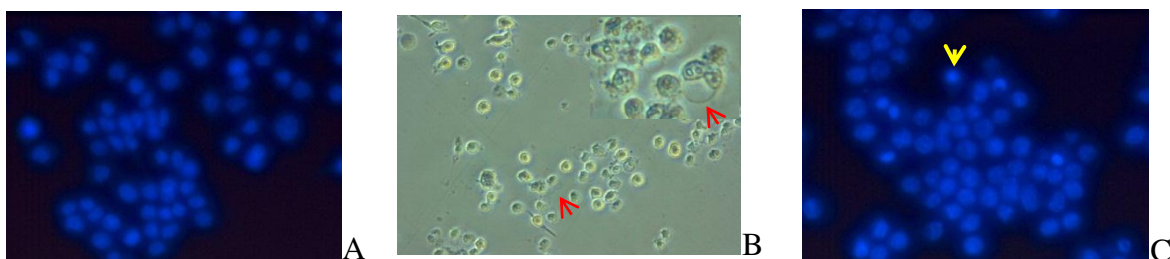


Fotomicrografia das células U-118. A: sem tratamento (Campo claro e Dapi – Aumento 400x); B: tratadas com arcanolideo 5µg/mL durante 6h (Campo Claro e Dapi – Seta preta: *Blebbing* – Aumento 400x); C: tratadas com arcanolideo 5µg/mL durante 12h (Campo Claro- Seta Preta: *Blebbing* – Aumento 200x); D: tratadas com arcanolideo 5µg/mL durante 12h (Dapi – Sera amarela: Compactação DNA, Seta branca: Fragmentação DNA – Aumento 200x).

As fotomicrografias apresentadas demonstram a morfologia apoptótica das células U-118 tratadas com arucanolídeo $5\mu\text{g/mL}$ a partir de 6 horas de tratamento. Comparadas com as células sem tratamentos, as células tratadas com arucanolídeo apresentam compactação e fragmentação de DNA e zeiosis (Figs. 32) (Leist *et al*, 2001).

A indução de apoptose pelo arucanolídeo, parece ser caspase dependente, já que ativa a Caspase-9 e a Caspase-3 após seu tratamento (Figs. 32). Para verificar essa característica, as células U-118 foram pré tratadas pelo inibidor geral de caspases Z-VAD-FMK (Enzo[®]), $50\mu\text{M/mL}$ seguidas pelo tratamento com o arucanolídeo $5\mu\text{g/mL}$ durante 12 horas. Esse pré tratamento fez com que as células tratadas com o arucanolídeo $5\mu\text{g/mL}$ perdessem a maior parte das características morfológicas de apoptose e inclusive adquirisse uma morfologia necrótica, com deslocamento do núcleo para a lateral celular e formação de uma grande “bolha” (seta vermelha, Fig. 33B). As células tratadas apenas com Z-VAD-FMK (Fig. 33) tem a morfologia semelhante ao controle (Fig. 32).

Figura 33. Fotomicrografia nas células U-118 tratadas com Z-VAD-FMK



Fotomicrografia das células U-118. A: tratadas com Z-VAD-FMK $50\mu\text{M/mL}$ (Dapi – Aumento: 200x); Tratadas com com arucanolídeo $5\mu\text{g/mL}$ durante 12 horas, após o tratamento com Z-VAD-FMK (B: Campo claro - Seta Vermelha: “Bolha” característico de necrose – Aumento 200x e 400x); (C: Dapi – Aumento 200x)

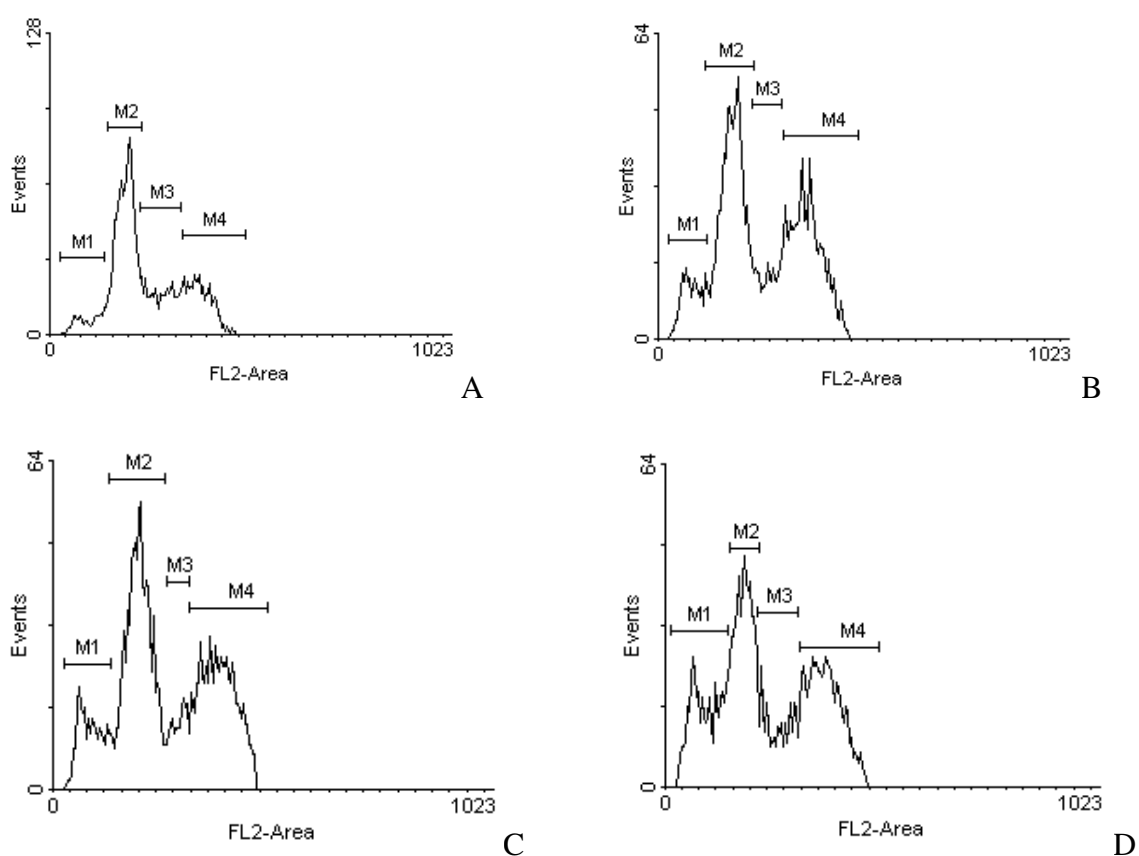
Apesar de ainda existir uma compactação de DNA em algumas células pré tratadas com o Z-VAD-FMK, houve a redução do número de células com características de apoptose (não quantitativo), e inclusive houve o aparecimento de algumas características necróticas (Fig. 33, seta vermelha), sugerindo que o arucanolídeo pode induzir outro tipo de morte celular quando a via apoptótica está bloqueada.

Portanto, o arucanolídeo, na dose de 5µg/mL é capaz de induzir apoptose nas células de glioblastoma U-118, a partir de 6 horas de tratamento. Essa indução ocorre pela ativação da via intrínseca, caspase dependente e após a geração de espécies reativas de oxigênio. Os resultados encontrados em glioblastoma diferem dos resultados já publicados em células de leucemia HL-60, onde o arucanolídeo induz apoptose independente da ativação de caspases, via ativação do fator de indução de apoptose (AIF) (Nakagawa *et al*, 2005).

Atividade do Arucanolídeo nas células de adenocarcinoma de cervix HeLa e HeLa transfectadas com BCL-XL

O arucanolídeo induz apoptose por via intrínseca em células de glioblastoma (U-118) e para avaliar a real importância da mitocôndria nesse processo, as células HeLa e as células HeLa transfectadas com o gene da proteína BCL-XL foram usadas para essa avaliação. Esses testes foram realizados no laboratório do Dr. Faustino Mollinedo, no Centro de Investigación del Cáncer, da Universidad de Salamanca, Salamanca, Espanha.

Figura 34. Ciclo celular das células HeLa



Histograma representativo do conteúdo de DNA da células HeLa. A: sem tratamento e tratadas com arucanolídeo 5 μ g/mL durante B: 24h; C: 48h; D: 72h , marcados com Iodeto de propídio (IP) obtidos em citômetro de fluxo.

Tabela 13. Porcentagem das diversas fases do ciclo celular das células HeLa tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, em diversos tempos.

	Controle	24h	48h	72h
Sub-G1	8,515	12,61	13,26	18,6*
G1	54,48	44,17**	40,6**	39,24**
S	18,8	16,71	13,92	11,61
G2/M	18,53	24,66	34,34*	32,81*

Diferente dos resultados encontrados nas células de glioblastoma, o arucanolídeo demora muito mais tempo para matar as células HeLa, após uma parada em G2/M, muito notável a partir de 48 horas de tratamento (Fig. 34, Tabela 13). Diferente do encontrado nos resultados do ciclo, as células HeLa tratadas com arucanolídeo 5µg/mL perdem a aderência e encontram-se em suspensão com 24 horas de tratamento (observação microscópica). Por isso, o arucanolídeo pode atuar diretamente na aderência celular e essa perda de aderência provoca a morte celular por *anoikis*. *Anoikis* é uma forma particular de apoptose que é desencadeada por o desprendimento de células a partir da matriz extracelular (Kepp *et al*, 2011).

Por ser uma forma de apoptose, esse processo de morte celular compartilha as características apoptóticas. Portanto as células tratadas com arucanolídeo foram marcadas com Anexina-V para verificar a exposição de fosfatidilserina.

Figura 35. Exposição de fosfatidilserina e permeabilização da membrana plasmática das células HeLa

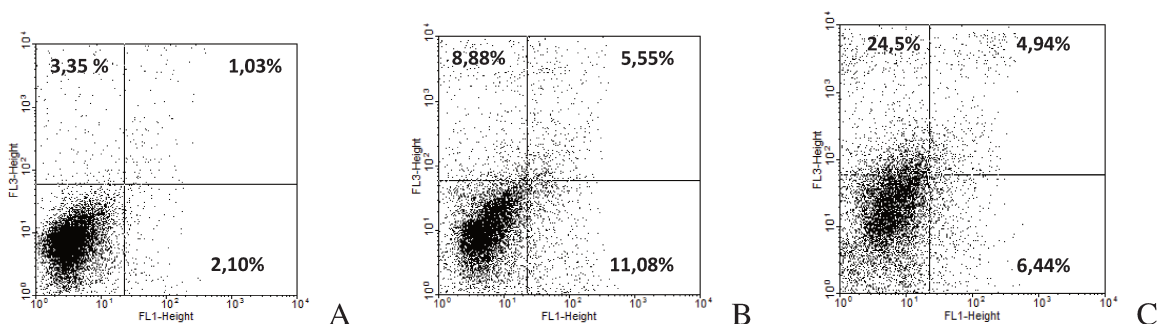


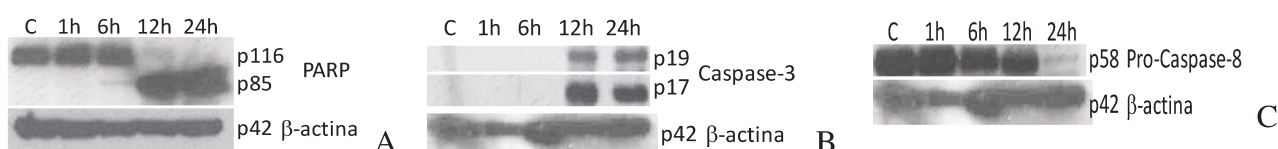
Gráfico estilo dotplot das células HeLa, A: sem tratamento e tratadas com arucanolídeo 5µg/mL durante B: 12h; C: 24h marcados com Anexina-V (y) e Iodeto de propídio (IP) (x) obtidos em citômetro de fluxo com as porcentagens de células de cada quadrante.

Tabela 14. Porcentagem de células HeLa tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com Anexina-V e Iodeto de Propídio.

	Controle	12h	24h
Apoptose Inicial	1,03	11,8*	6,64
Apoptose Tardia	2,1	5,55*	4,94*
Mortas	3,35	8,88	24,5**

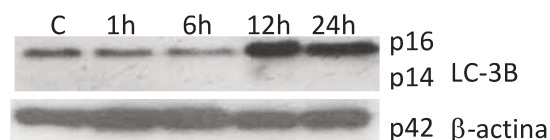
Esses resultados não podem confirmar a indução de apoptose, pois a porcentagem de células que expuseram a fosfatidilserina é baixa (Fig. 35, Tabela 14). Os resultados mostram que a indução de apoptose pelo arucanolídeo nas células HeLa parece ser um processo inicial e não único, podendo haver outros tipos de morte, incluindo a necrose. Isso porque a marcação com apenas anexina-V, sugerindo uma apoptose inicial é maior após 12 horas de tratamento do que 24 horas. E após 24 horas, o que aumenta é número de células marcadas apenas com IP, não a dupla marcação que seria esperado para uma apoptose tardia (Tabela 14).

Figura 36. Western Blotting nas células HeLa tratadas com arucanolídeo 5µg/mL em diversos tempos



Proteínas extraídas de células HeLa sem tratamento (C) e tratadas com arucanolídeo 5µg/mL durante 1, 6, 12 e 24h. A: PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) e β-actina; B: Caspase-3 e β-actina; C: Caspase-8 e β-actina.

Figura 37. Western Blotting para LC-3B e β-actina nas células HeLa tratadas com arucanolídeo 5µg/mL em diversos tempos



Proteínas extraídas de células HeLa sem tratamento (C) e tratadas com arucanolídeo 5µg/mL durante 1, 6, 12 e 24 horas.

Os resultados de western blotting confirmam a indução de apoptose nas células HeLa pelo arucanolídeo, através da clivagem do PARP e ativação da caspase-3 (Fig. 36). Porém esse processo de morte celular é mais lento do que o encontrado para as células U-118, já que a clivagem do PARP apenas inicia após 6 horas e a ativação da caspase-3 ocorre a partir das 12 horas de tratamento.

Não foi detectada a ativação de caspase-9 para essas células (dado não mostrado) mas foi observado uma redução na pró-caspase-8 (Fig. 36), o que pode sugerir uma ativação da via extrínseca ao invés da via intrínseca observada nas células U-118. Porém essa redução só é observada a partir de 24 horas de tratamento, enquanto a ativação da caspase efetora (caspase-3) ocorre a partir de 12 horas (Fig. 36). Não foi observada presença de caspase-8 ativa, mas problemas técnicos não estão descartados nesse caso.

Como a indução de apoptose não foi muito evidente, a indução de autofagia foi avaliada através da detecção da proteína LC-3B. Não foi detectada a forma LC-3B II que caracteriza autofagia, apenas a LC-3B I, constitutiva (Fig. 37). Como o arucanolídeo gera radicais livres em glioblastoma, esta característica também foi avaliada nas células de adenocarcinoma de cervix.

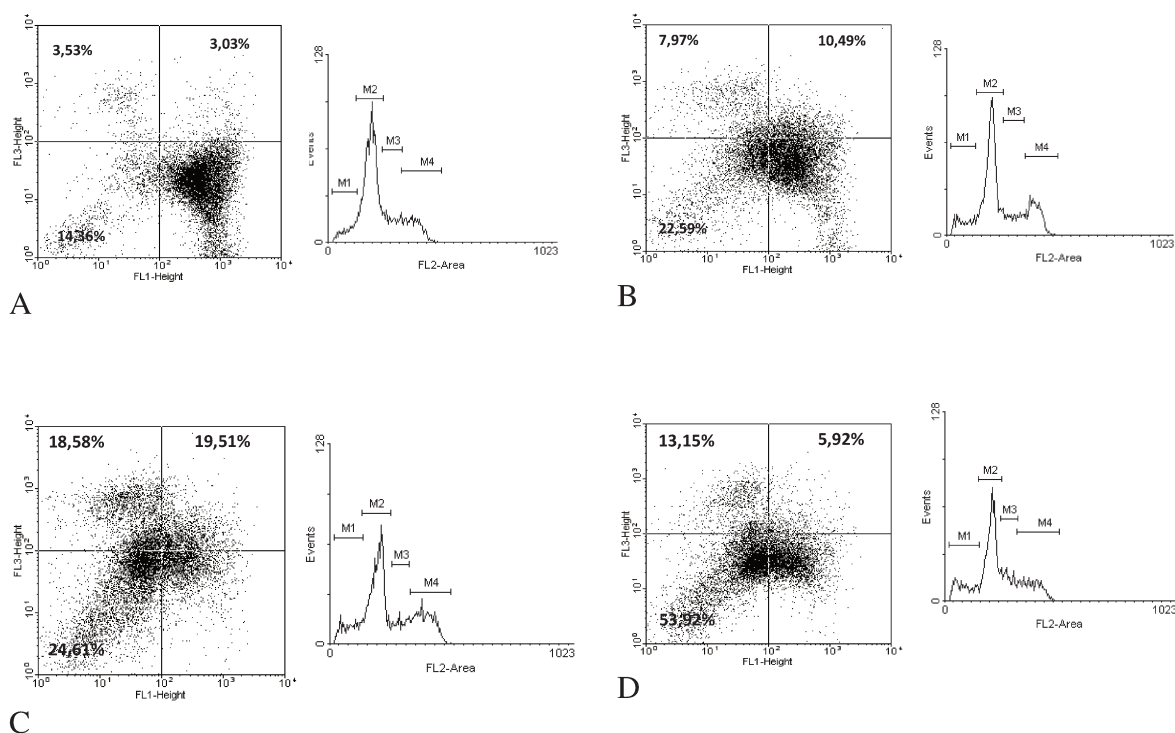
Tabela 15. Porcentagem de células HeLa tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com DHE (ROS) e Dioc₆ ($\Delta\Psi_m$ - Potencial membrana mitocondrial).

	Controle	CCCP	12h	24h
ROS	3,03	5,925	10,49	19,51*
$\Delta\Psi_m$	14,36	53,92**	22,59	37,31*
Dupla	3,52	13,15*	7,97	18,58**

Tabela 16. Valores das fases do ciclo celular das células HeLa tratadas com arucanolídeo 5µg/mL.

	Controle	CCCP	12h	24h
Sub-G1	8,15	15,79*	10,60	13,60*
G0/G1	64,70	52,28**	58,15**	50,80**
S	15,17	17,60	13,63	10,89
G2/M	15,84	19,82	18,11	25,46**

Figura 38. Geração de radicais livres, avaliação do potencial de membrana mitocondrial e ciclo celular das células HeLa



Mesma alíquota de células HeLa, A: sem tratamento; tratadas com com arucanolídeo 5µg/mL durante B: 12h; C: 24h; D: tratadas com CCCP 100µM. Gráfico estilo dotplot das células marcadas com DHE (y, FL3) e Dioc₆ (x, FL1) lidos em citômetro de fluxo com as porcentagens de células de cada quadrante e histograma do conteúdo de DNA marcados com Iodeto de propídio (IP) obtidos em citômetro de fluxo.

Os resultados confirmam a geração de radicais livres pelo arucanolídeo também nas células HeLa, porém isso não é suficiente para induzir a apoptose (fragmentar o DNA) nessas células, nessas condições (Fig. 38, Tabelas 15-16). Nessas células o arucanolídeo, além de gerar radicais livre, também propicia a perda de potencial da membrana mitocondrial, muito mais evidente que nas células U-118 (Tabela 15). E nem o tratamento com o CCCP, com mais de 50% das células que perderam o potencial da membrana mitocondrial, aumentou significativamente a quantidade de células em fase Sub-G1 (Fig. 38), comprovando que essa via parece ter pouca importância para a indução de apoptose nessa

linhagem celular. Com esses resultados, a indução de apoptose nas células HeLa pelo arucanolídeo, parece ser um processo minoritário e, de alguma forma envolvendo a via extrínseca da apoptose.

Embora a via intrínseca não estar muito ativa nas células HeLa, foram usadas células HeLa previamente transfectadas com o gene de Bcl-xL (10/12/2001) disponíveis no laboratório do Dr. Faustino Mollinedo, para avaliar se a mitocôndria estaria pouco ou nada envolvida na morte celular induzida pelo arucanolídeo.

A família de proteínas Bcl-2, composta por membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos, atua como um *checkpoint* das caspases e disfunção mitocondrial. A família Bcl-2 compartilha homologias, agrupadas dentro de quatro regiões conservadas, as proteínas homólogas a Bcl-2, possuem os quatro domínios BH1-4, que controlam a capacidade destas proteínas para dimerizar e funcionam como reguladores da apoptose. As proteínas Bcl-xL, Bcl-2, e BAX são capazes de formar poros condutores de íons em membranas. As proteínas BID e BAD possuem apenas o domínio BH3, conhecidos como *BH-3 only*, e a fosforilação de BAD liga os sinais de sobrevivência à família de proteínas Bcl-2 (Chao & Korsmeyer *et al*, 1998).

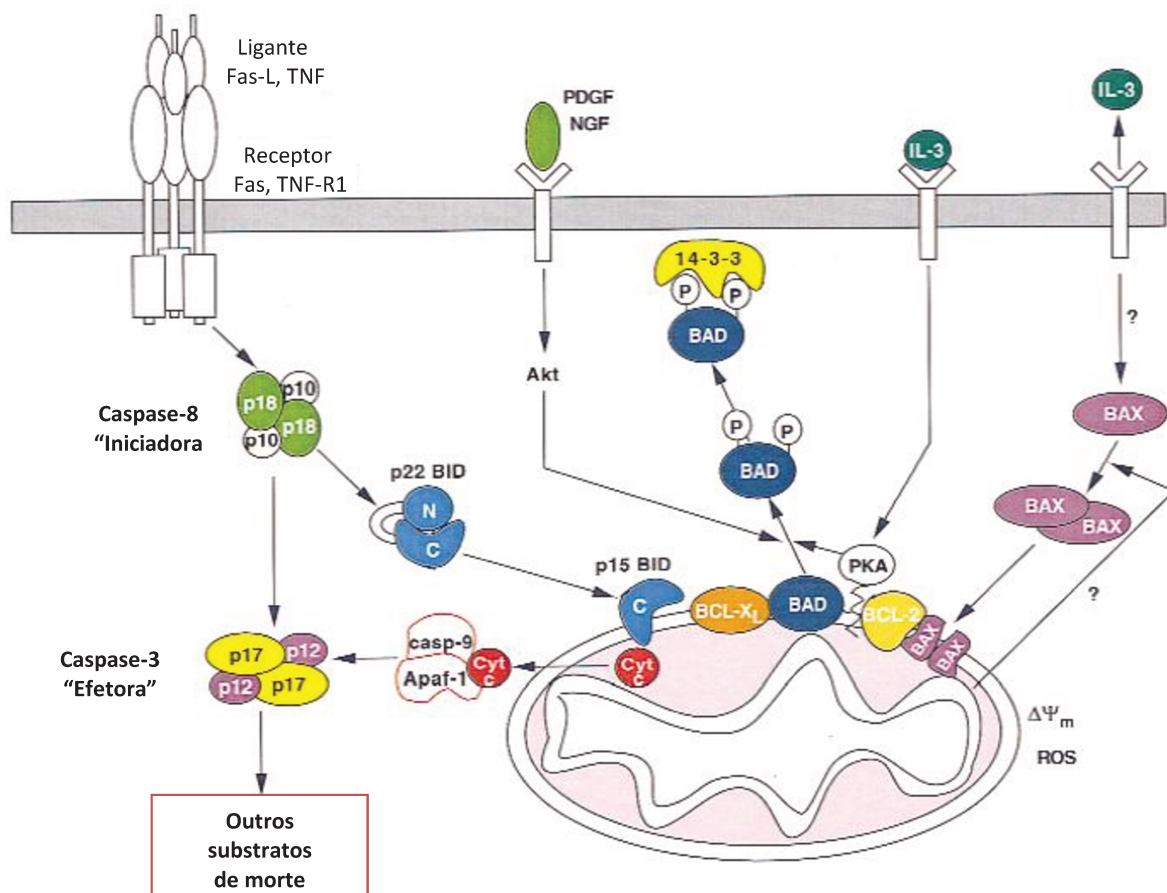
A ativação da molécula pró-apoptótica BAX parece envolver a translocação subcelular e dimerização. Em células viáveis uma porção substancial da BAX é monomérica e encontrada tanto no citosol ou fracamente ligada às membranas. Após um estímulo de morte, a citosólica e monomérica BAX é translocada para a mitocôndria onde se torna uma proteína de membrana integral e reticulável, como um homodímero. A presença de uma molécula anti-apoptótica, tais como Bcl-2 ou Bcl-xL pode inibir a ativação de BAX em sequência a um sinal de morte (Gross *et al*, 1999).

A clivagem da proteína BID citosólica p22 pela caspase-8 gera um fragmento carboxi-terminal p15 que se transloca para a mitocôndria. O BID truncado p15 (tBID) se insere na membrana e é necessário para liberação do citocromo c da mitocôndria. É importante salientar que, na presença de BCL-2 ou Bcl-xL, a clivagem e a translocação de BID sequencial a ativação da caspase-8 ainda pode ocorrer (Gross *et al*, 1999).

Alguns trabalhos relatam que a molécula anti-apoptótica Bcl-xL é um ligante de Apaf-1 (fator apoptótico de ativação de protease-1) e alguns membros proapoptóticos BCL-2 têm sido demonstrados como dissociadores deste complexo. Estas observações levaram à hipótese de que um dos papéis pró-apoptóticos dos membros de BCL-2 é deslocar o Apaf-

1, permitindo a ativação da caspase-9 (Gross *et al*, 1999). A Figura 39 resume as vias pró e anti-apoptóticas das proteínas da família BCL-2, incluindo a Bcl-xL.

Figura 39. Vias Pró- e Anti-Apoptóticas das proteínas da família BCL-2.

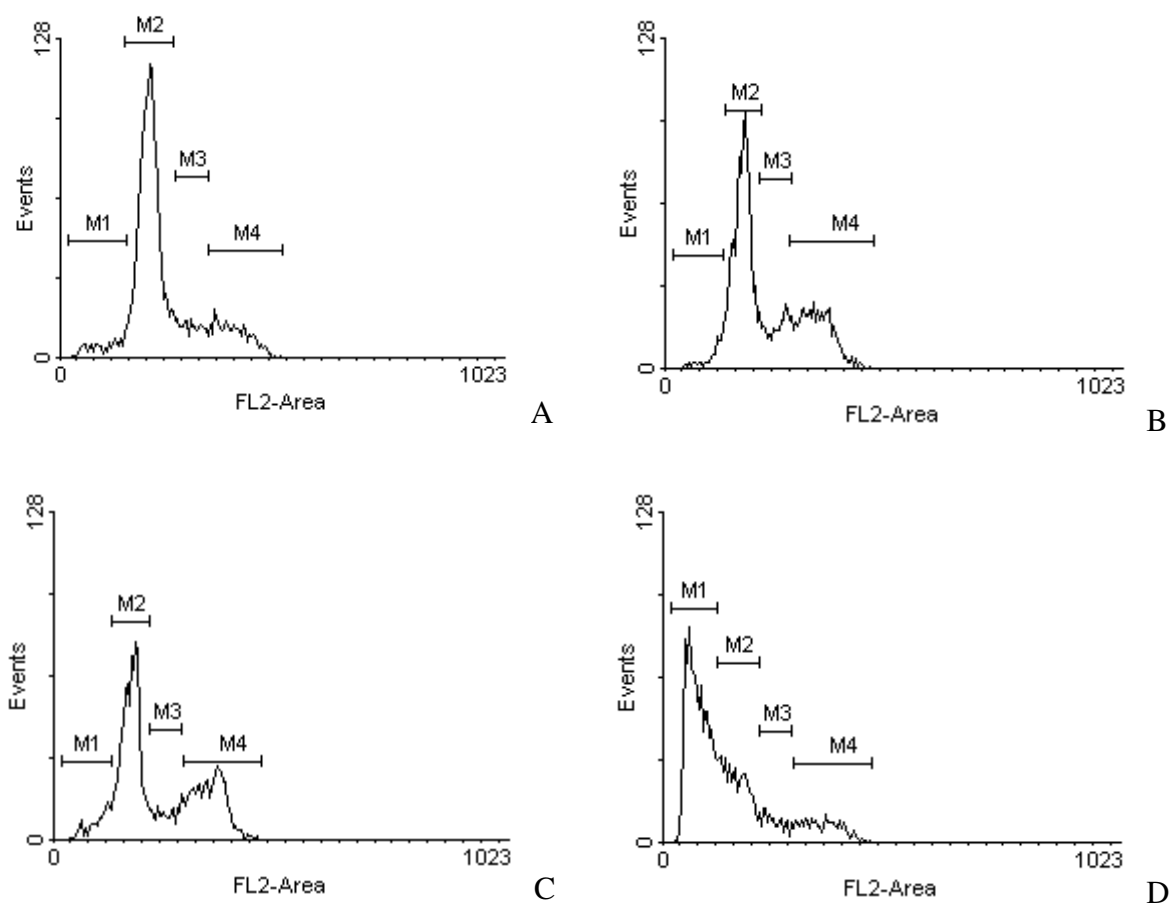


Modelo de sinalização das vias de apoptose e de sobrevivência envolvendo os membros da família Bcl-2 (Modificado de Gross *et al*, 1999).

Tabela 17. Porcentagem das diversas fases do ciclo celular das células HeLa Bcl-xL tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, em diversos tempos.

	Controle	24h	48h	72h	96h
Sub-G1	7,36	9,86	8,305	5,85	58,93***
G0/G1	69,17	61,92	54,27	58,46	29,48
S	12,65	19,54	18,96	20	9,48
G2	13,06	9,15	19,01	19,06	6,83

Figura 40. Ciclo celular das células HeLa Bcl-xL



Histograma representativo do conteúdo de DNA da células HeLa Bcl-xL. A: sem tratamento e tratadas com arucanolídeo $5\mu\text{g}/\text{mL}$ durante B: 48h; C: 72h; D: 96h , marcados com Iodeto de propídio (IP) obtidos em citômetro de fluxo.

Os resultados com as células HeLa Bcl-xL comprovam a importância da mitocôndria no processo de morte celular induzido pelo arucanolídeo (Fig. 40, Tabela 17) já que nas células HeLa normais a morte ocorre com 72 horas, nas células transfectadas elas só ocorrem com 96 horas, quando o ciclo celular está totalmente desfeito (Fig. 40).

Figura 41. Exposição de fosfatidilserina e permeabilização da membrana plasmática das células HeLa Bcl-xL

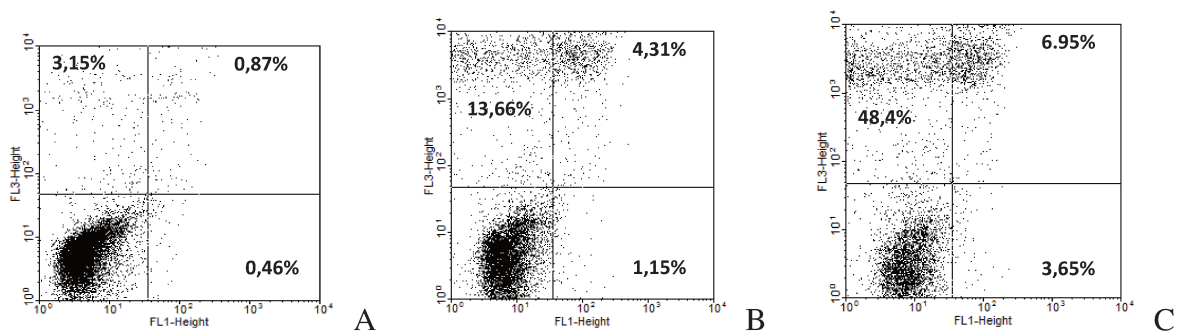


Gráfico estilo dotplot das células HeLa Bcl-xL, A: sem tratamento e tratadas com arucanolídeo 5µg/mL durante B: 12h; C: 24h marcados com Anexina-V (y) e Iodeto de propídio (IP) (x) obtidos em citômetro de fluxo com as porcentagens de células de cada quadrante.

Tabela 18. Porcentagem de células HeLa Bcl-xL tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com Anexina-V e Iodeto de Propídio.

	Controle	12h	24h
Mortas	3,15	13,66	48,4**
Apoptose Inicial	0,87	4,13	3,64
Apoptose Tardia	0,46	1,15	6,95

Esses resultados comprovam a importância da mitocôndria na indução de apoptose pelo arucanolídeo, visto que 48% dessas células perderam a integridade da membrana plasmática, sem exposição de fosfatidilserina, sugerindo morte por necrose (Fig. 41, Tabela 18).

Os resultados de western blotting para as células HeLa Bcl-xL demonstram clivagem de PARP a partir das 24 horas de tratamento com arucanolídeo 5µg/mL e ativação de caspase-3 a partir de 48 horas de tratamento (Fig. 42). E apesar de a maior parte das células HeLa Bcl-xL morrerem por necrose, uma parte delas parece morrer por apoptose, porém esse processo é mais lento.

Figura 42. Western Blotting nas células HeLa Bcl-xL tratadas com arucanolídeo 5µg/mL em diversos tempos



Proteínas extraídas de células HeLa Bcl-xL sem tratamento (C) e tratadas com arucanolídeo 5µg/mL durante 1, 6, 12 e 24h. A: PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) e β-actina; B: Caspase-3 e β-actina.

Portanto os resultados obtidos até agora evidenciam a importância do tipo e características celulares para indução de morte celular pelo arucanolídeo. Nas células de glioblastoma U-118, fica notável a indução de apoptose, via intrínseca. Já nas células de adenocarcinoma de cervix HeLa, a apoptose ainda está presente, porém a via extrínseca parece estar envolvida. O mais curioso deste processo é a integridade mitocondrial que parece essencial para o processo apoptótico induzido pelo arucanolídeo, já que nas células HeLa transfectada com o gene Bcl-xL, uma proteína anti-apoptótica da família Bcl-2, há pouca indução de apoptose e a maioria das células morrem por necrose. Esses resultados confirmam a proteção das células transfectadas com Bcl-xL à indução de apoptose.

Diversos relatos tem sugerido o envolvimento do partenolídeo em múltiplas vias de morte celular induzida por apoptose em células cancerosas humanas, incluindo: o estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático, a ativação de caspases e a disfunção mitocondrial. Sabe-se que o partenolídeo e algumas outras lactonas sesquiterpênicas são capazes de ativar caspase-8, e essa ativação pode atuar diretamente na proteína da família Bcl-2, BID, gerando o tBID que é translocado à membrana mitocondrial, desencadeando a via intrínseca da apoptose através da liberação de citocromo c ao citosol (Zhang *et al*, 2004).

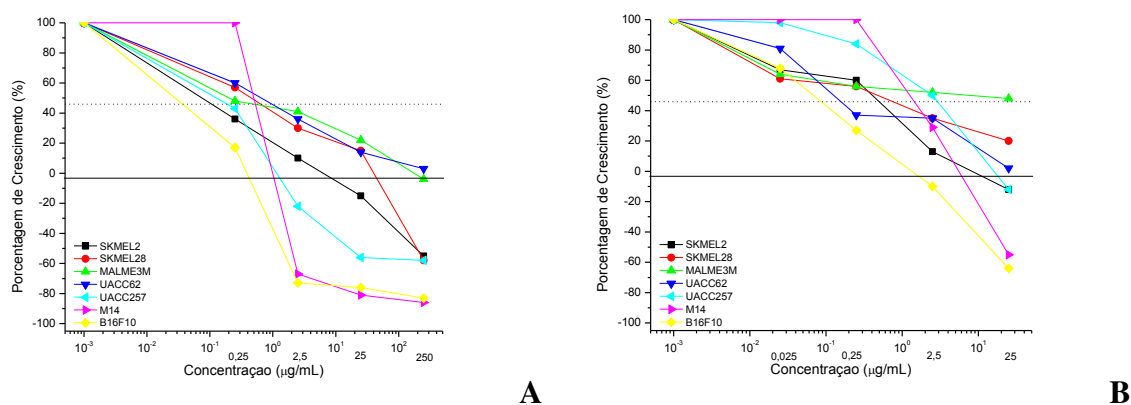
A proteína BID não foi avaliada nas células HeLa, após o tratamento com o arucanolídeo, porém, assim como o germacranolídeo partenolídeo, o arucanolídeo pode iniciar a indução de apoptose pela via extrínseca e terminar ou apenas amplificar sua atividade pela via intrínseca.

Atividade do arucanolídeo em células de melanoma

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina) e tem predominância em adultos brancos. Segundo GLOBOCAN, no ano de 2008 no Brasil o melanoma teve incidência de 1,1% com mortalidade de 0,7% resultando em 63% de mortalidade relativa. Portanto, apesar de pouco incidente, o melanoma se torna altamente perigoso devido a sua alta capacidade de metastizar. Para o ano de 2012, estima-se que serão 6.230 novos casos de melanoma no Brasil (INCA, GLOBOCAN).

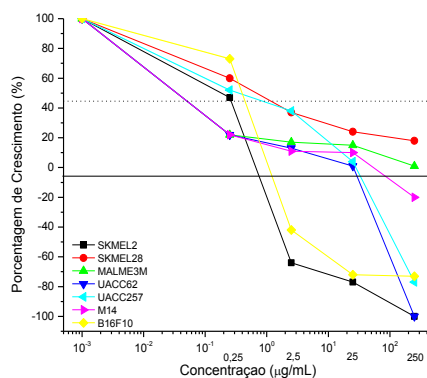
Desde a avaliação da atividade antiproliferativa do extrato bruto diclorometânico de *Calea pinnatifida*, existe uma tendência à seletividade para a linhagem de melanoma UACC-62 (Marchetti, 2008) que também foi observada com o composto isolado arucanolídeo e como controle positivo partenolídeo. Por esse motivo, um experimento usando sete linhagens de melanoma humano foi realizado. A cisplatina, comumente usada no tratamento quimioterápico de melanomas em humanos, foi utilizada como controle positivo.

Figura 43. Atividade antiproliferativa do Partenolídeo e Cisplatina



Atividade antiproliferativa dos controles positivos Partenolídeo (Sigma®) (A) e Cisplatina (B) em cultura de células tumorais humanas de melanoma, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

Figura 44. Atividade antiproliferativa do Arucanolídeo



Atividade antiproliferativa do arucanolídeo, isolado de *C. pinnatifida* em cultura de células tumorais humanas de melanoma, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

Tabela 19. Valores de TGI (Total Growth Inhibition) nas linhagens de melanoma.

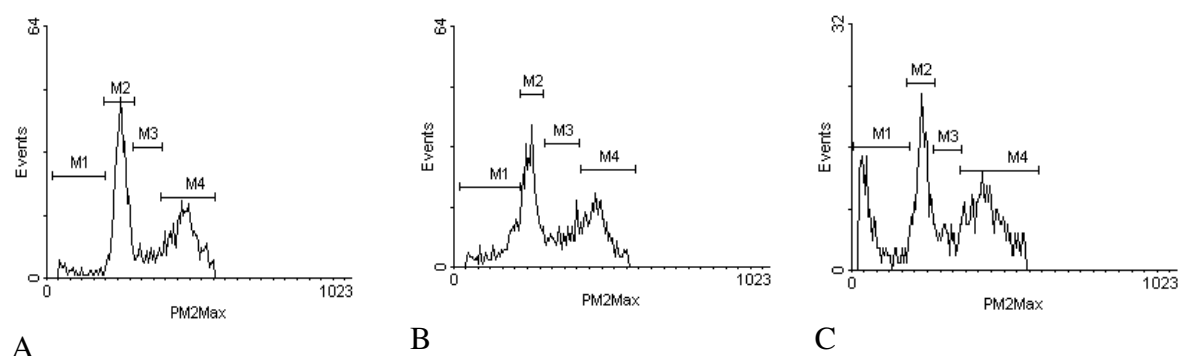
Linhagem	Cisplatina	Partenolídeo	Arucanolídeo
SK-MEL-2	9,15	5,55	0,65
SK-MEL-28	110,35	18,77	>250
MALME-3M	>250	152,01	82,31
UACC-62	23,99	155,25	3,59
UACC-257	16,45	1,56	12,60
M14	5,58	1,49	21,33
B16-F10	1,14	0,36	1,25

Os resultados comprovam a seletividade dos germacranolídeos para as linhagens de melanoma inclusive com potência mais elevada do que a cisplatina, para a maioria das linhagens. (Figs. 43-44, Tabela 19). Nesse experimento o arucanolídeo foi mais potente para a SK-MEL-2, UACC-62 e B16-F10 (Fig. 44, Tabela 19).

Atividade do arucanolídeo na linhagem de melanoma SK-MEL-2 e SK-MEL-2 transfectadas com BCL-XL

As células SK-MEL-2 são originadas de um melanoma metastático de pele (ATCC) e estavam disponíveis no laboratório do Dr. Faustino Mollinedo.

Figura 45. Ciclo celular das células SK-MEL-2



Histograma representativo do conteúdo de DNA da células SK-MEL-2. A: sem tratamento e tratadas com arucanolídeo $5\mu\text{g/mL}$ durante B: 12h; C: 24h, marcados com Iodeto de propídio (IP) obtidos em citômetro de fluxo.

Tabela 20. Valores das fases do ciclo celular das células SK-MEL-2 tratadas com arucanolídeo $5\mu\text{g/mL}$, em diversos tempos.

	Controle	12h	24h
Sub-G1	3,82	9,69	36,2*
G1	48,74	41,47	28,925
S	13,58	16,39	11,155
G2/M	36,22	34,28	24,485

Esses resultados mostram claramente o aumento da porcentagem de células em sub-G1 de 3% das células não tratadas, para quase 37% das células tratadas com arucanolídeo $5\mu\text{g/mL}$ durante 24h (Fig. 45, Tabela 20), caracterizando a presença de fragmentação de DNA, indicativo de apoptose. Para confirmar a indução de apoptose nas células SK-MEL-2 foi analisada a exposição de fosfatidilserina pela marcação com anexina-V através de

citometria de fluxo e também foi avaliada a presença de proteínas apoptóticas por western blotting.

Figura 46. Exposição de fosfatidilserina e permeabilização da membrana plasmática das células SK-MEL-2

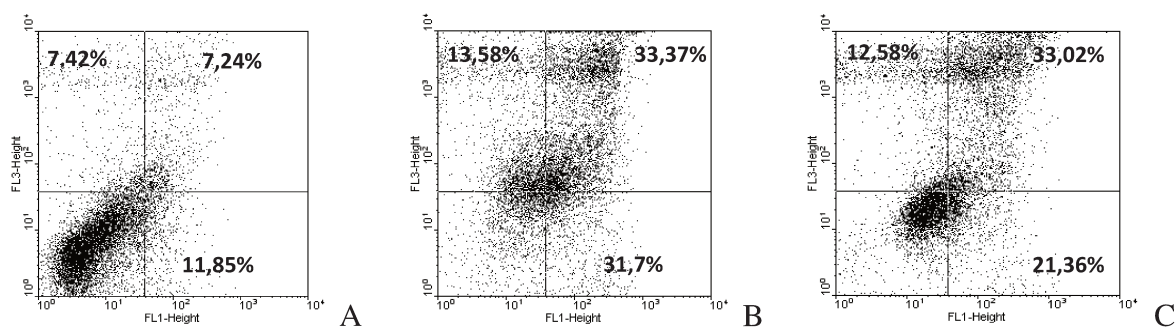


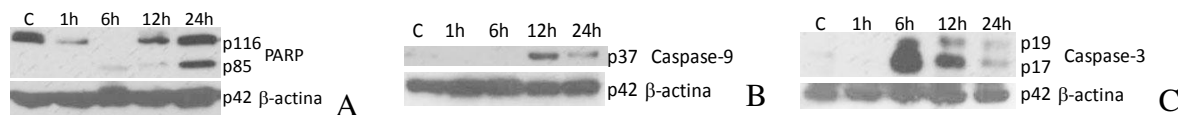
Gráfico estilo dotplot das células SK-MEL-2, A: sem tratamento e tratadas com arucanolídeo 5µg/mL durante B: 12h; C: 24h marcados com Anexina-V (y) e Iodeto de propídio (IP) (x) obtidos em citômetro de fluxo com as porcentagens de células de cada quadrante.

Tabela 21. Porcentagem de células SK-MEL-2 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com Anexina-V e Iodeto de Propídio.

	Controle	12h	24h
Mortas	11,85	31,7*	21,36
Apoptose Inicial	7,42	13,58*	12,58*
Apoptose Tardia	7,24	33,37*	33,02*

Esses resultados (Fig. 46, Tabela 21) confirmam a indução de apoptose, pelo menos em parte das células mortas, já que a maioria das células não estavam marcadas apenas com a anexina-V. A marcação do iodeto de propídio só é possível quando a membrana plasmática já perdeu sua integridade, o que caracteriza células não viáveis, nesse caso muito característico de apoptose tardia (dupla marcação). Não há grandes diferenças na marcação encontrada nas células tratadas 12 ou 24 horas, e também há uma população celular que não expõe fosfatidilserina, podendo morrer por necrose.

Figura 47. Western Blotting nas células SK-MEL-2 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL em diversos tempos



Proteínas extraídas de células SK-MEL-2 sem tratamento (C) e tratadas com arucanolídeo 5µg/mL durante 1, 6, 12 e 24h. A: PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) e β-actina; B: Caspase-9 e β-actina; C: Caspase-3 e β-actina.

Os resultados de Western Blotting confirmam a indução de apoptose, pelo arucanolídeo, na dose de 5µg/mL, a partir de 6h de tratamento. A clivagem do PARP, a ativação de caspase-9 e caspase-3 demonstram o envolvimento da mitocôndria nesse processo, através da via intrínseca da apoptose (Fig. 47). Não foi provado o envolvimento da via extrínseca, já que não foi detectada a ativação de caspase-8 (dados não mostrados).

Células de melanoma superexpressam várias proteínas anti-apoptóticas e a eficácia da terapêutica anti-melanoma depende da inibição da expressão de genes anti-apoptóticos regulados pelo NF-κB. Neste contexto, o partenolídeo poderia mediar as suas propriedades pró-apoptóticas em dois níveis: a nível da mitocôndria através da regulação da expressão de Bcl-XL ou através da regulação da expressão de survivina. As diferenças das linhagens de melanoma na expressão basal de Bcl-XL, survivina ou outras proteínas anti-apoptóticas, bem como a dependência de vias de sinalização do IKK/NF-κB, podem contribuir para a resposta apoptótica do partenolídeo observada nas linhagens de melanoma A375, 1205Lu e WM793 (Czyz *et al*, 2010).

Czyz e colaboradores, em 2010 mostraram que o partenolídeo apresenta atividades anti-metastáticas e pró-apoptóticas em células de melanoma, e que estes efeitos, embora não exclusivamente, estão associados com a supressão da atividade do NF-κB e que o partenolídeo é capaz de neutralizar a ativação de alguns genes dependentes de NF-κB induzidos por cisplatina ou TNFα. Os mecanismos envolvidos incluem a regulação de genes que expressam as proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL e survivina, bem como ciclina D1, MMP-9 e IL-8. Portanto, a diversidade de resultados nessas linhagens de melanoma

sugere uma dependência do contexto celular, e evidencia as propriedades polifarmacológicas do partenólídeo.

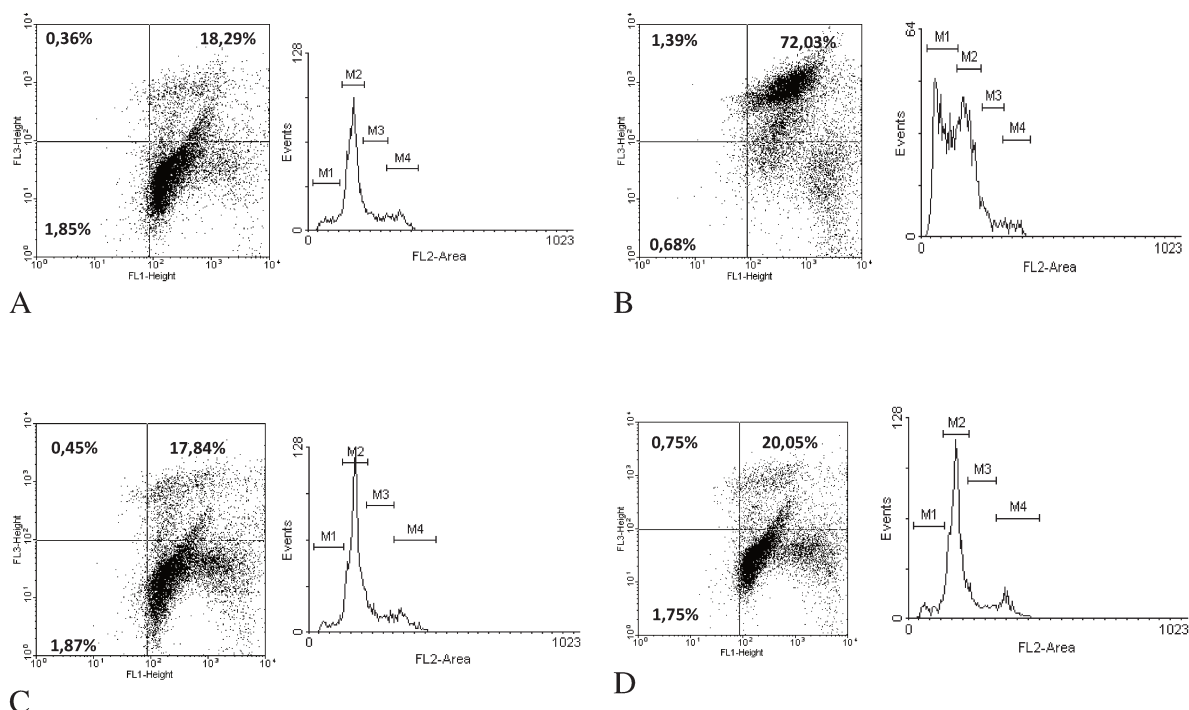
Lesiak e colaboradores, em 2010, também avaliou a atividade antitumoral do partenólídeo nas linhagens A375, 1205Lu e WM793 de melanoma. A morte celular acompanhada pela despolarização da membrana mitocondrial e ativação da caspase-3 foi observada como o resultado desse tratamento. Interessantemente, melanócitos são menos suscetíveis à morte celular induzida pelo partenólídeo que as células metastáticas. O nível de espécies reactiva de oxigênio não foi significativamente aumentado nessas células. No entanto, a pré-incubação de NAC protegeu as células de melanoma da morte celular induzida pelo partenólídeo, sugerindo como o mecanismo responsável pela atividade do partenólídeo, a reação com tióis intracelulares.

Embora os estudos anteriores relatem que o partenólídeo induz a morte celular em várias células tumorais por um mecanismo dependente de caspase, para as células de melanoma humano SK-MEL-28 o partenólídeo estimula a morte por um mecanismo caspase-independente. A morte celular é dependente de estresse oxidativo, pois foi impedida pelo tratamento prévio com o NAC, enquanto o Z-VAD-FMK e outros inibidores de caspases não foram capazes de impedi-la, revelando um mecanismo caspase-independente (D'Anneo *et al*, 2012).

O partenólídeo induz a morte celular em células SK-MEL-28 pela ativação de um mecanismo de caspase-independente, mediado por AIF (Fator de indução de apoptose). O AIF parece ser responsável não só pela condensação da cromatina, mas também por eventos necróticos. Estudos recentes demonstram que o AIF desempenha papel-chave na necrose programada, por sua capacidade em organizar um complexo degradante de DNA (D'Anneo *et al*, 2012).

Esses estudos a respeito da atividade antitumoral do partenólídeo em linhagens de melanoma estimulam ainda mais o estudo da atividade antitumoral do arucanolídeo nessas linhagens. Mesmo o partenólídeo apresentando diversos mecanismos de ação, frente a diferentes linhagens, a relação da mitocôndria, e a produção de radicais livres parecem ser pontos-chave em comum na atividade antitumoral deste germacranolídeo, embasando a análise de geração de radicais livres e perda de potencial mitocondrial pelo arucanolídeo nas células SK-MEL-2.

Figura 48. Geração de radicais livres, avaliação do potencial de membrana mitocondrial e ciclo celular das células SK-MEL-2



Mesma alíquota de células SK-MEL-2, A: sem tratamento; B: tratadas com com arucanolídeo 5 μ g/mL durante 24h; C: tratadas com NAC 10mM/mL; D: tratadas com NAC 10mM/mL seguidas pelo tratamento com arucanolídeo 5 μ g/mL durante 24h. Gráfico estilo dotplot das células marcadas com DHE (y, FL3) e Dioc₆ (x, FL1) lidos em citômetro de fluxo com as porcentagens de células de cada quadrante. Histograma do conteúdo de DNA marcados com Iodeto de propídio (IP) obtidos em citômetro de fluxo.

Ao contrario do encontrado por Lesiak, no tratamento com o arucanolídeo na células SK-MEL-2, há uma grande aumento na geração de ROS, porém não há despolarização da membrana mitocondrial (Fig. 48). Como o NAC parece ser um importante inibidor da morte celular induzida pelo partenólídeo (Lesiak *et al*, 2010, D'Anneo *et al*, 2012), também foi usado em pré-tratamento do arucanolídeo nas células SK-MEL-2.

Tabela 22. Porcentagem de células SK-MEL-2 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, marcadas com DHE (ROS) e Dioc₆ (ΔΨ_m - Potencial membrana mitocondrial).

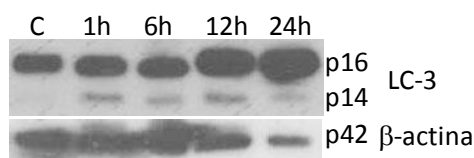
	Controle	NAC 10mM	Arucanolídeo 5µg/mL 24h	NAC 10mM + Arucanolídeo 5µg/mL 24h
ROS	18,29	17,84	72,03***	20,055
ΔΨ_m	1,85	1,87	0,68	1,745
Dupla	0,36	0,45	1,39*	0,75

Tabela 23. Valores das fases do ciclo celular das células SK-MEL-2 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL.

	Controle	Arucanolídeo 5µg/mL 24h	NAC 10mM	NAC 10mM + Arucanolídeo 5µg/mL 24h
Sub-G1	6,31	49,70***	5,47	8,04
G1	71,38	41,47*	69,66	71,88
S	13,06	6,93**	17,9	14,62
G2/M	10,06	2,44**	8,74	8,2

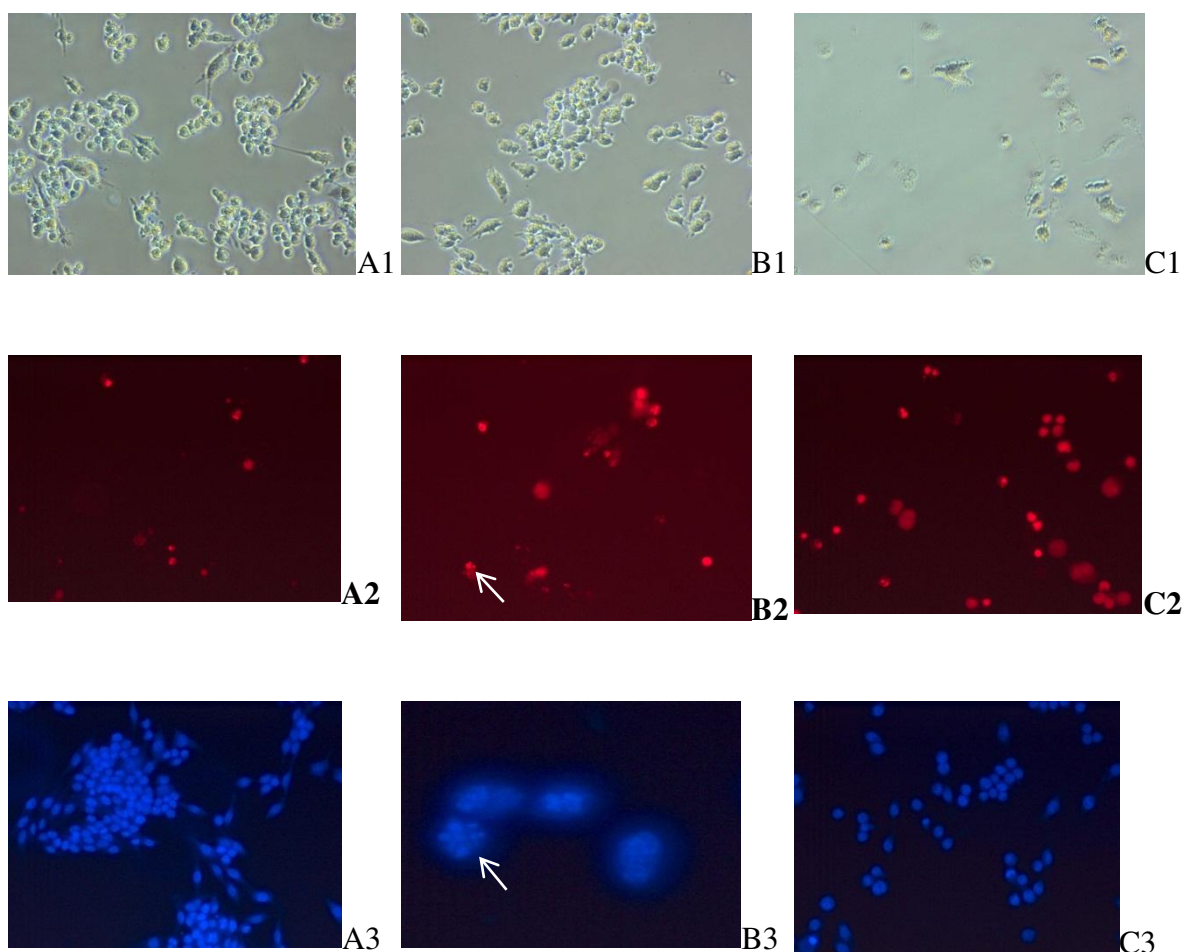
Assim como ocorre com o tratamento do partenolídeo nas células de melanoma, o arucanolídeo induz apoptose na células SK-MEL-2 pela via intrínseca e a geração de radicais livres parece ser essencial para esse processo, visto que o pré-tratamento com o NAC, impediu a morte celular induzida pelo arucanolídeo (Fig. 48, Tabelas 22-23).

Figura 49. Western Blotting LC-3 e β-actina nas células SK-MEL-2 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL em diversos tempos.



Proteínas extraídas de células SK-MEL-2 sem tratamento (C) e tratadas com arucanolídeo 5µg/mL durante 1, 6, 12 e 24h.

Figura 50. Fotomicrografia nas células SK-MEL-2



Fotomicrografia das células SK-MEL-2. A: sem tratamento; tratadas com B: arucanolídeo 5µg/mL durante 12h; C: Z-VAD-FMK 50µg/mL seguidas do tratamento com arucanolídeo 5µg/mL durante 12h, campo claro (1), iodeto de propídio -IP (2) e Dapi (3). Aumento 200x ou 400x (B3). Seta branca: Fragmentação de DNA.

As células tratadas com arucanolídeo 5µg/mL também foram avaliados quanto a indução de morte celular por autofagia. Nas células de melanoma SK-MEL-2, o arucanolídeo induz autofagia a partir de 1 hora de tratamento (Fig. 50). Essa ativação ocorre antes de qualquer sinal de morte celular, mostrando, nesse caso, a autofagia como tentativa de sobrevivência celular (Rosenfeldt & Ryan, 2011).

As células foram marcadas com iodeto de propídio durante 5 minutos, para avaliar a integridade da membrana plasmática, como sinal de viabilidade celular. As

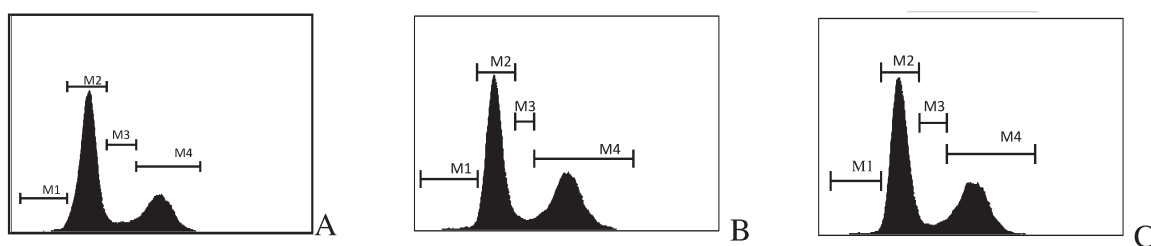
fotomicrografias das células SK-MEL-2 tratadas com arucanolídeo 5 μ g/mL comprovam a indução de apoptose, já que a fragmentação de DNA é evidente (Seta amarela, Fig. 50), e a maior parte das células que já estavam com a membrana permeável também tem seu DNA fragmentado como sinal de apoptose tardia (Fig. 50).

As células tratadas com o inibidor geral de caspases mantêm a morfologia do controle, provando que apenas o tratamento com o Z-VAD-FMK não atera a viabilidade celular (Dados não mostrados).

O pré-tratamento como inibidor geral de caspases Z-VAD-FMK parece ter bloqueado a indução de apoptose pelo arucanolídeo, já que as células perderam as características apoptóticas, como a fragmentação de DNA. Além disso, o bloqueio da apoptose parece induzir um outro tipo de morte pelo arucanolídeo, a necrose, já que a maioria das células perderam a integridade de membrana, não estando mais viáveis (Fig. 50). Além disso, as células perderam a morfologia, principalmente os prolongamentos, se tornando mais arredondadas (Fig. 50). Com isso, pode-se dizer que a indução de apoptose pelo arucanolídeo nas células SK-MEL-2 é caspase-dependente.

Para confirmar a real interferência da mitocôndria na indução de apoptose pelo arucanolídeo, nas células SK-MEL-2, células SK-MEL-2 transfectadas com o gene Bcl-xL foram usadas para avaliação. Essas células foram gentilmente cedidas pelo Dr. Faustino Mollinedo à Divisão de Farmacologia e Toxicologia, CPQBA, UNICAMP.

Figura 51. Ciclo celular das células SK-MEL-2 Bcl-xL



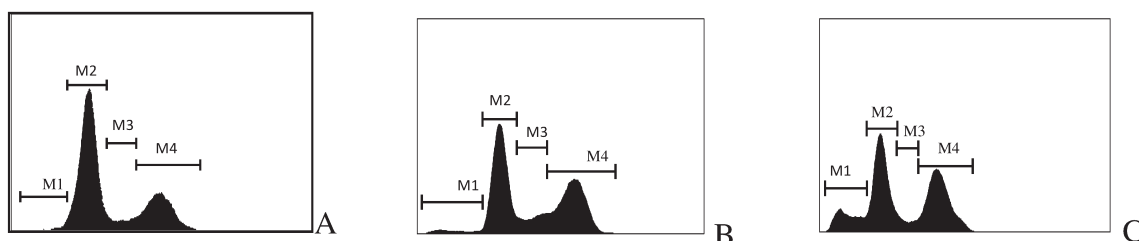
Histograma representativo do conteúdo de DNA da células SK-MEL-2 Bcl-xL. A: sem tratamento e tratadas com arucanolídeo 5 μ g/mL durante B: 12h; C: 24h, marcados com Iodeto de propídio (IP) obtidos em citômetro de fluxo.

Tabela 24. Valores das fases do ciclo celular das células SK-MEL-2 Bcl-xL tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, em diversos tempos.

	Controle	12h	24h
Sub-G1	0,99	1,74	1,26
G0/G1	58,57	56,495	55,715
S	7,785	8,095	5,93
G2/M	31,765	31,04	34,26

Os resultados (Fig. 51, Tabela 24) mostram a ausência de fragmentação de DNA nessas condições, evidenciando a importância da mitocôndria na indução de apoptose pelo arucanolídeo nas células SK-MEL-2. Por esse motivo, a dose de 10 µg/mL foi avaliada.

Figura 52. Ciclo celular das células SK-MEL-2 Bcl-xL



Histograma representativo do conteúdo de DNA da células SK-MEL-2 Bcl-xL. A: sem tratamento e tratadas com arucanolídeo 10µg/mL durante B: 12h; C: 24h, marcados com Iodeto de propídio (IP) obtidos em citômetro de fluxo.

Apenas com 10µg/mL e durante 48 horas de incubação que o arucanolídeo parece induzir apoptose nas células SK-MEL-2 transfectadas com Bcl-xL, mostrando que a mitocôndria é muito importante para o processo apoptótico induzido pelo arucanolídeo, porém esse germacranolídeo ainda parece capaz de induzir apoptose nessas condições (Fig. 52, Tabela 25).

Tabela 25. Valores das fases do ciclo celular das células SK-MEL-2 Bcl-xL tratadas com arucanolídeo 10µg/mL, em diversos tempos.

	Controle	24h	48h
Sub-G1	0,99	2,82	13,5***
G0/G1	58,57	47,96	41,18
S	7,785	11,96	5,7
G2/M	31,765	33,3	39,06

Figura 53. Ativação de multicaspases das células SK-MEL-2 Bcl-xL

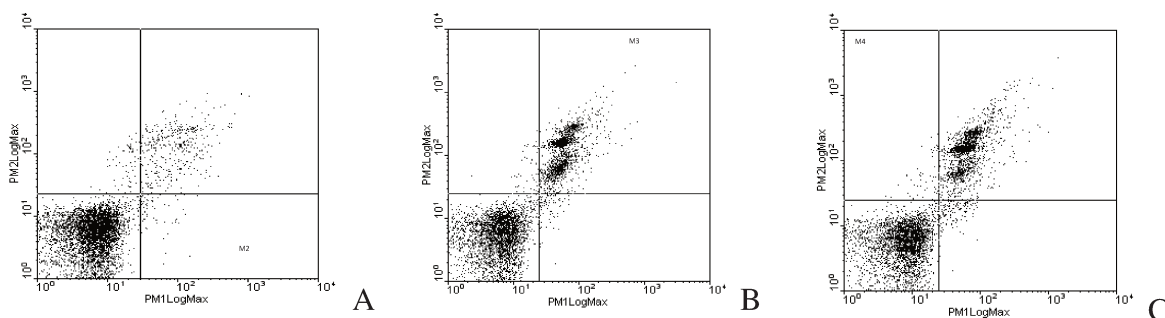


Gráfico estilo dotplot das células SK-MEL-2 Bcl-xL. A: sem tratamento e tratados com arucanolídeo 10µg/mL durante B: 12h; C: 24h, marcados com SR-VAD-FMK (x) e 7-AAD (y) obtido em citômetro de fluxo com as porcentagens de células de cada quadrante.

Tabela 26. Porcentagem de células SK-MEL-2 Bcl-xL tratadas com arucanolídeo 10µg/mL marcadas com SR-VAD-FMK e 7-AAD

	Controle	12h	24h
7-AAD	1,32	1,01	0,91
Caspases	1,03	1,81	2,54**
Dupla	7,38	33,25**	34,11***

Os resultados de multicaspases confirmam a indução de apoptose pelo arucanolídeo nas células SK-MEL-2 Bcl-xL, já que não há um aumento na marcação única de 7-AAD nas células tratadas, quando comparadas ao controle (Figs. 53, Tabela 26). Como o teste marca todas as caspases, pois o fluorocromo está ligado a um inibidor geral de caspases,

não se pode avaliar por qual via de apoptose (intrínseca ou extrínseca) o arucanolídeo estará agindo nessas condições. Um teste específico de caspase-9, caspase-8 ou mesmo o *western blotting* para essas proteínas serão as etapas subsequentes desse trabalho.

Indução de Apoptose pelo arucanolídeo

Os produtos naturais oferecem grande diversidade estrutural, e as técnicas modernas de separação, elucidação estrutural, a triagem e a síntese combinatória, tem levado à revitalização dos produtos vegetais como fontes de novos medicamentos (Issa *et al*, 2006). Dentre os produtos naturais, as lactonas sesquiterpênicas estão entre as moléculas mais promissoras para o desenvolvimento de medicamentos antitumorais. Algumas propriedades químicas das lactonas sesquiterpênicas podem ser as responsáveis por atividades antitumorais e anti-inflamatórias, dentre elas o centro alquilante de reatividade, a cadeia lateral e lipofilicidade e a geometria molecular (Ghantous *et al*, 2010).

O arucanolídeo é um germacranolídeo com um grupo α -metileno- γ -lactona, que tem a capacidade de reagir na presença de biomoléculas contendo aminoácidos nucleofílicos ou resíduos de guanina, pois atuam como um aceptor de Michael, formando assim adutos estáveis (Barcelos *et al*, 2012).

Segundo Nagakawa e colabores, em células de leucemia HL-60, a inativação do NF- κ B, que tem sido geralmente observada na apoptose induzida pelo partenolídeo, não ocorreu na indução de apoptose pelo arucanolídeo. Além disso, os resultados por eles obtidos indicam que a apoptose induzida pelo arucanolídeo se deve principalmente à dissipação de potencial de membrana mitocondrial, provocando indução de apoptose via AIF, independente de caspases (Nagakawa *et al*, 2005).

Além do partenolídeo, isolado de *Tanacetum parthenium*, outros germacranolídeos são conhecidos por inibirem a via do fator de transcrição NF- κ B dentre eles o 2 α ,5-epoxy-5,10-dihydroxy-6 α -angeloyloxy-9 β -(3-methylbutyloxy)-germacran-8 α ,12-olide, isolado de *Carpesium triste*. (Lee *et al*, 2011, Pajak *et al*, 2008). O NF- κ B é um fator de transcrição que regula diversos genes responsáveis por funções vitais. Regula genes que controlam a apoptose, a proliferação, a diferenciação celular, a resposta imunitária e a inflamação (Pajak *et al*, 2008).

Com isso, células tratadas com os inibidores desse fator de transcrição são mais sensíveis à morte celular, principalmente pela inibição da transcrição de moléculas anti-apoptóticas. Essa característica também confere certa seletividade às linhagens tumorais frente outras não tumorais que geralmente tem apenas níveis basais de NF- κ B (Czyz *et al*, 2010). Uma das proteínas anti-apoptóticas reguladas pela via do NF- κ B é a survivina, membro da família de proteínas inibidoras de apoptose (IAPs). A survivina aumenta a sobrevivência de linhagens de células pela capacidade de suprimir a apoptose através da ligação direta com a caspase-9 ou por interação com smac-DIABLO (McLaughlin *et al*, 2006).

Sabe-se que a proteína survivina está super expressa em melanomas, incluindo a linhagem SK-MEL-2 e também em glioblastomas, como nas linhagens U-251 e U-87 (Tamm *et al*, 1998, McLaughlin *et al*, 2006, Czyz *et al*, 2010) sendo um importante alvo para o desenvolvimento de novas drogas. Portanto a seletividade do arucanolídeo para as linhagens de melanoma e glioblastoma pode estar relacionada ao bloqueio da survivina pela inibição da via do NF- κ B.

Uma das principais vias de ativação do NF- κ B é a ligação do TNF- α ao seu receptor (TRAF1). Sabe-se que o partenolídeo sensibiliza células para a indução de apoptose via extrínseca do TNF- α , tanto por inibir a ativação do NF- κ B, quanto por inibir a JNK (proteína quinase c-Jun N-terminal), uma das MAPK (proteínas quinases ativadoras de mitógeno) (Pajak *et al*, 2008).

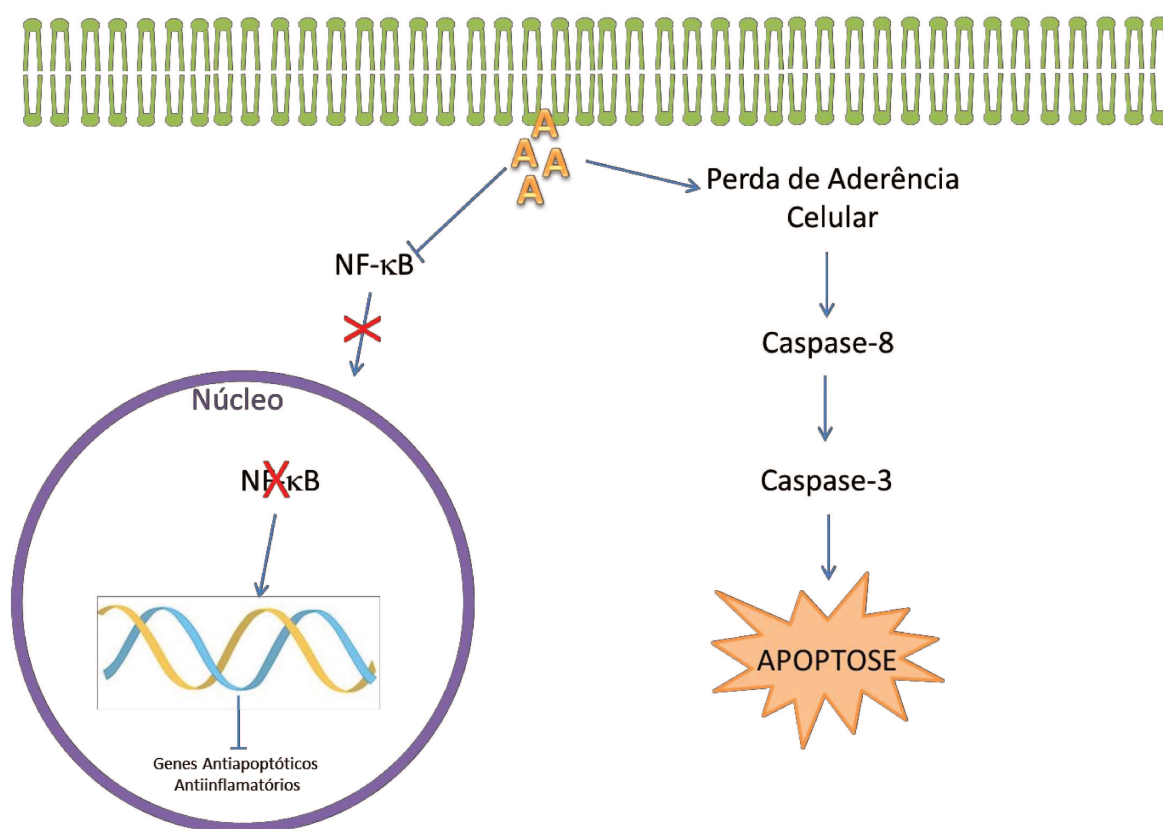
A ativação da caspase-8 também é possível após a indução de anoikis. O desprendimento celular, através da perda de adesão celular com a matriz extracelular ativa a caspase-8 via IPS-1 (estimulador promotor de interferon- β 1) e DAP3 (proteína associada a morte 3) (Li *et al*, 2009). Como o arucanolídeo induziu apoptose em células HeLa através da ativação de caspase-8, e após a perda de aderência dessas células, esse composto pode atuar nessa célula através da indução de *anoikis*.

Já nas células de melanoma (SK-MEL-2) e glioblastoma (U-118) a ativação de caspase-8 não foi observada. Nessas linhagens, o estresse oxidativo é o responsável por disparar o processo apoptótico. O estresse oxidativo refere-se ao aumento da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou disfunção do sistema antioxidante de defesa celular (Pajak *et al*, 2008).

Em células de carcinoma hepatocelular (SH-J1), durante a indução de apoptose pelo partenolídeo nota-se, a depleção de glutatona, a geração de espécies reativas de oxigênio, redução do potencial transmembrana mitocondrial, a ativação de caspases (caspases-7, -8 e -9) e a superexpressão de GADD153 (*oxidative stress or anticancer agent inducible gene*). Esta indução de apoptose foi inibida ou abolida pelo antioxidante N-acetil-cisteína, enquanto o antioxidante L-butionina-(S, R)-sulfoximina parece reforçar a indução de apoptose (Wen *et al*, 2002).

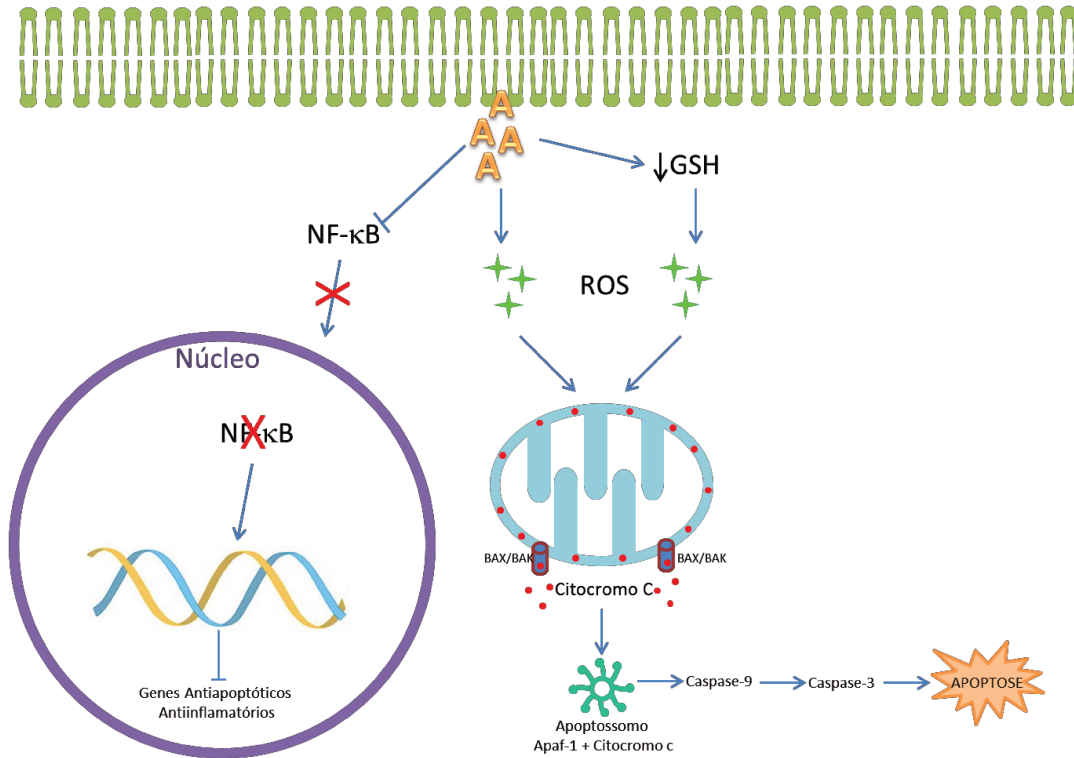
A inibição da indução da apoptose produzida pelo arucanolídeo nas células SK-MEL-2 e U-118, pelo tratamento prévio com o antioxidante N-acetil-cisteína, sugere que o estresse oxidativo mediado pelo arucanolídeo pode estar relacionado com a depleção de glutatona. Essa hipótese é corroborada pelo fato de que o arucanolídeo, assim como o partenolídeo contém uma α -metileno- γ -lactona insaturada que é capaz de participar em uma adição de Michael com compostos contendo um grupo-SH (Wen *et al*, 2002).

Figura 54. Sugestão de Via apoptótica nas células HeLa



Portanto o arucanolídeo é capaz de induzir apoptose, por diferentes vias, nas diferentes linhagens celulares avaliadas. As figuras A e B sintetizam as vias sugeridas de apoptose induzida pelo arucanolídeo, nas células HeLa (Fig. 54) e SK-MEL-2 e U-118 (Fig. 55).

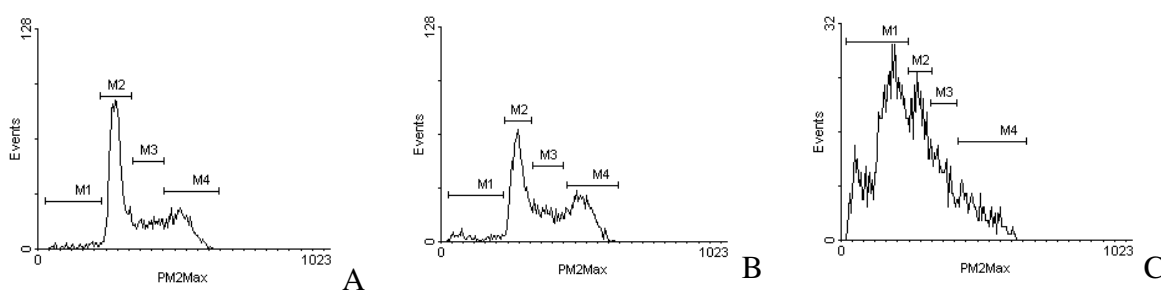
Figura 55. Sugestão de via apoptótica nas células SK-MEL-2 e U-118



Atividade antitumoral do arucanolídeo nas células de melanoma murino B16-F10

Muito se sabe sobre os mecanismos envolvidos na atividade antitumoral *in vitro* do partenolídeo, porém pouco se estudou sobre seus mecanismos *in vivo*. E isso é uma constante nos trabalhos publicados com germacranolídeos, a maioria deles só avaliam mecanismos *in vitro*. O arucanolídeo, por exemplo, induz apoptose, via AIF, independente de caspases, em células de leucemia HL-60, porém não há nenhum estudo sobre sua atividade em modelo de leucemia *in vivo* (Nagakawa *et al*, 2005), por isso, as células de melanoma murino B16-F10 foram utilizadas para avaliar a atividade do arucanolídeo *in vitro* e *in vivo*.

Figura 56. Ciclo celular das células B16-F10



Histograma representativo do conteúdo de DNA da células B16-F10. A: sem tratamento e tratadas com arucanolídeo 5µg/mL durante B: 12h; C: 24h, marcados com Iodeto de propídio (IP) obtidos em citômetro de fluxo.

Tabela 27. Valores das fases do ciclo celular das células B16-F10 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL, em diversos tempos.

	Controle	6h	12h	24h
Sub-G1	3,16	3,27	5,73*	54,53***
G0/G1	53,37	55,22	43,27	26,02**
S	19,33	18,14	21,06	13,22
G2/M	23,65	24,11	30,28	6,24**

Nesse modelo, fica evidente a fragmentação de DNA gerada pelo arucanolídeo 5µg/mL nas células de melanoma murino B16-F10 após 24 horas (Fig. 56, Tabela 27). Para confirmar a indução de apoptose pelo arucanolídeo nessas células, o teste de multicaspases foi aplicado.

Figura 57. Ativação de multicaspases das células B16-F10

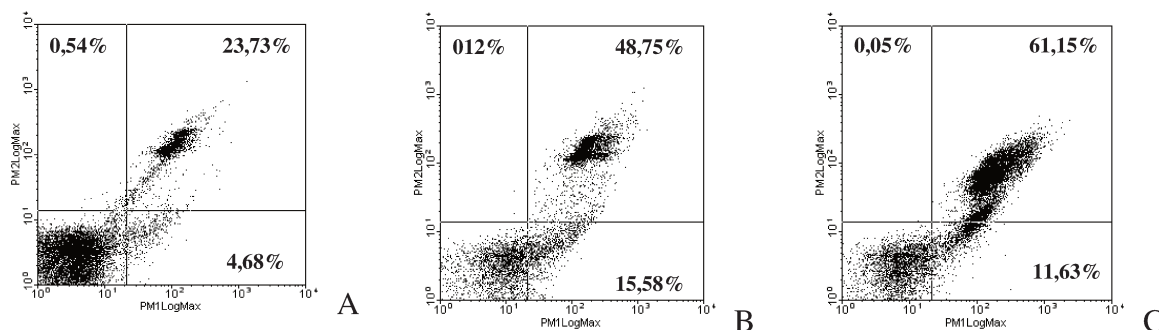


Gráfico estilo dotplot das células B16-F10. A: sem tratamento e tratados com arucanolídeo 10µg/mL durante B: 12h; C: 24h, marcados com SR-VAD-FMK (x) e 7-AAD (y) obtido em citômetro de fluxo com as porcentagens de células de cada quadrante.

Tabela 28. Porcentagem de células B16-F10 tratadas com arucanolídeo 5µg/mL marcadas com SR-VAD-FMK e 7-AAD

	Controle	6h	12h	24h
7-AAD	0,54	0,84	0,125	0,055
Caspases	4,685	4,19	15,58***	11,63**
Dupla	23,73	16,53	48,75**	61,15***

Nesse teste o controle apresenta uma grande porcentagem de células marcadas para ativação de caspases e perda de integridade de membrana (células mortas por apoptose), provavelmente isso foi resultado de um tempo excessivo com a tripsina, ou um excesso de crescimento. Apesar deste pequeno problema técnico, o número de células com caspases ativa é muito notável a partir de 12 horas de tratamento (Fig. 57, Tabela 28). A ausência de

células marcadas somente com 7-AAD (menor 1%) indica ausência de morte necrótica e o fato de a fragmentação de DNA só ser evidente a partir das 24 horas é normal, visto que a ativação de caspases é anterior à fragmentação de DNA no processo apoptótico.

Para a avaliação das vias apoptóticas envolvidas nesse processo, são necessários testes específicos. Testes específicos sobre caspase-9, caspase-8 ou mesmo o *western blotting* para essas proteínas serão as etapas subsequentes desse trabalho.

Como as células B16-F10 são proveniente de um melanoma murino, elas foram usadas em experimentos *in vivo* em camundongos C57Bl/6. Dois modelos de experimentos foram utilizados para avaliar a atividade *in vivo* do arucanolídeo em modelos de melanoma, um subcutâneo (sólido) e outro metastático.

Figura 58. Peso Relativo do Tumor subcutâneo tratado com o arucanolídeo

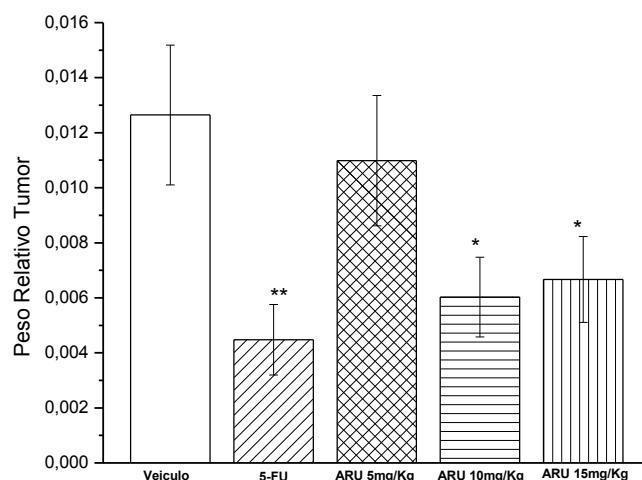


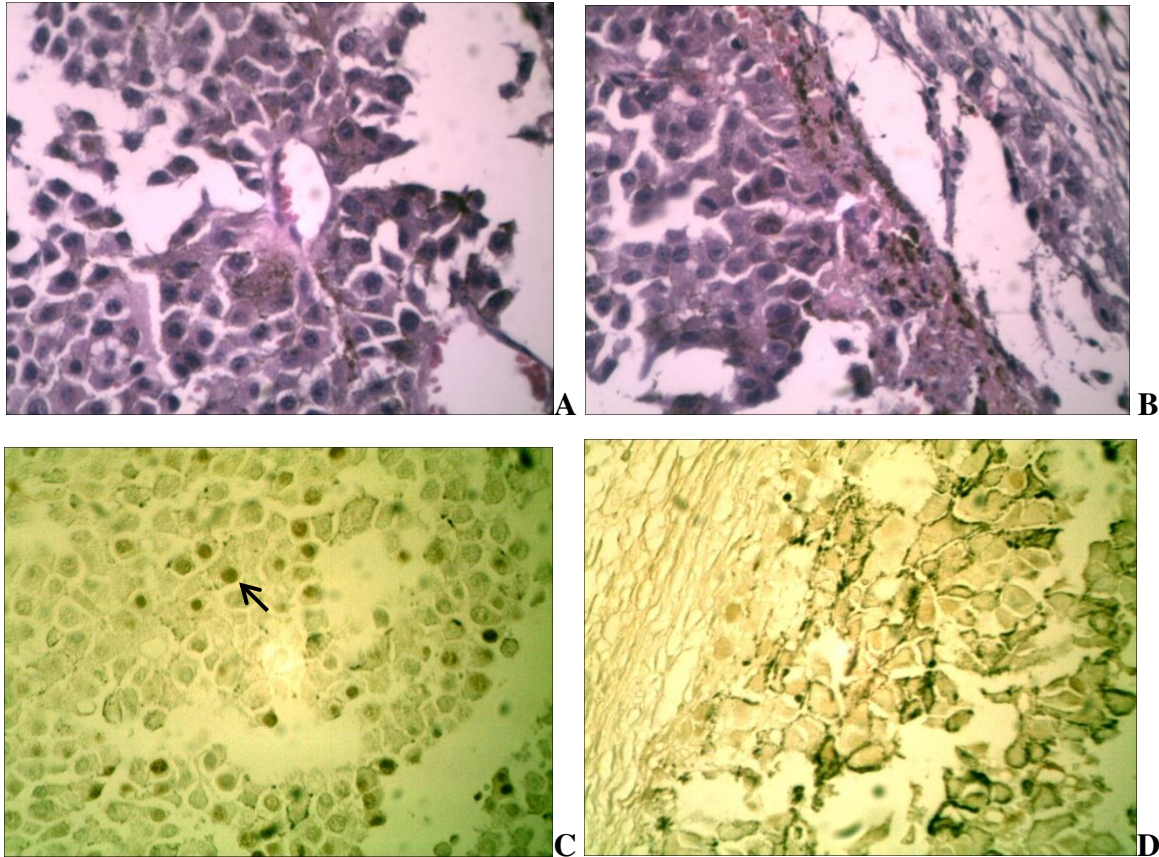
Gráfico de barras do peso relativo do tumor subcutâneo B16-F10 tratados com veículo (controle negativo), 5-FU (controle positivo) e arucanolídeo nas doses de 5, 10 e 15mg/Kg.

* $p < 0,05$; $p < 0,01$. ($p = 0,02$)

Os resultados comprovaram a atividade antitumoral *in vivo* do arucanolídeo que inibiu o crescimento tumoral nas doses de 10mg/Kg (53%; $p = 0,03$) e 15mg/Kg (48%, $p = 0,04$). O controle positivo, o quimioterápico 5-Fluoracil na dose de 15mg/Kg foi capaz de inibir em 65% o tumor ($p = 0,009$) (Fig. 58). Como o arucanolídeo tem a capacidade de induzir apoptose nas células B16-F10 *in vitro*, os tumores tratados foram processados

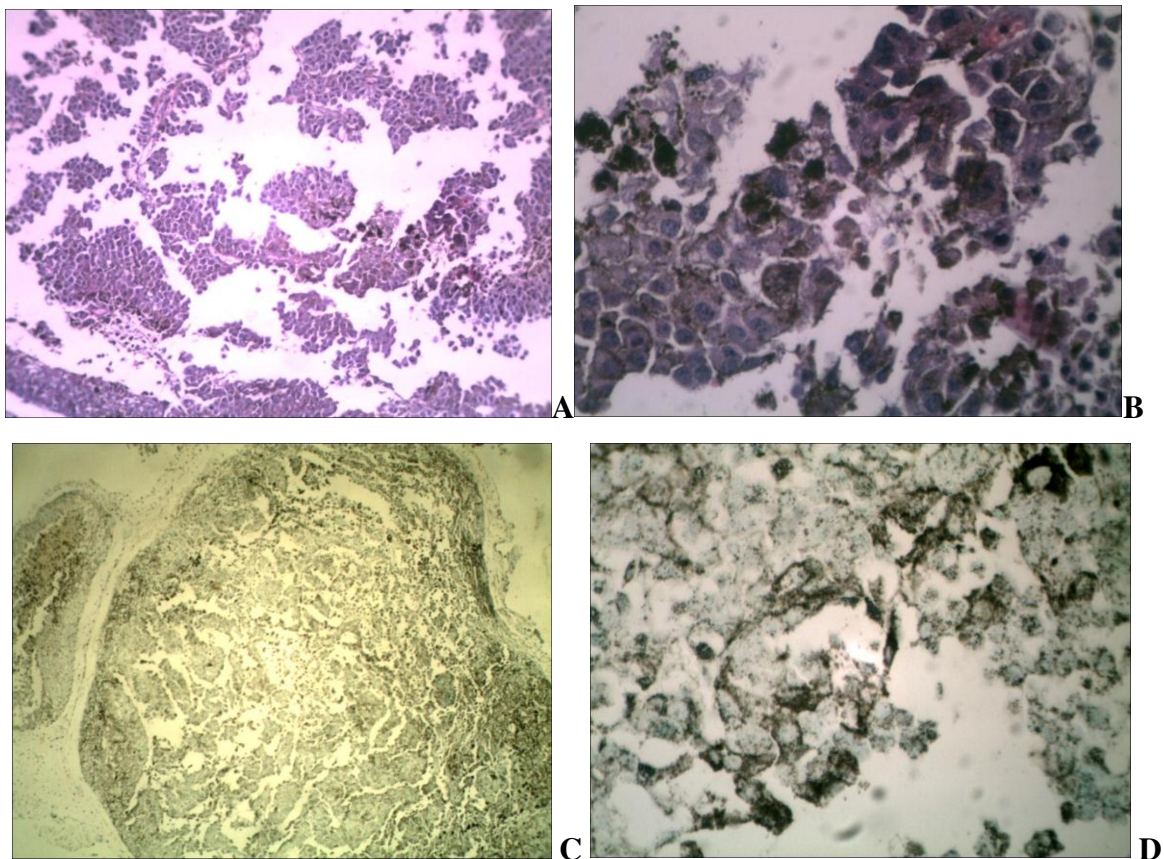
histologicamente e realizada imunohistoquímica para TUNEL, que detecta fragmentação de DNA.

Figura 59. Fotomicrografia do tumor subcutâneo de B16-F10 do controle negativo



Fotomicrografia do tumor subcutâneo de B16-F10 do controle negativo, após 15 dias. Coradas com Hematoxilina-Eosina. Aumento 400x (A e B). Corte com imunohistoquímica para TUNEL, contracorado com verde de metila. Aumento 400x (C e D) Seta: marcação tunel.

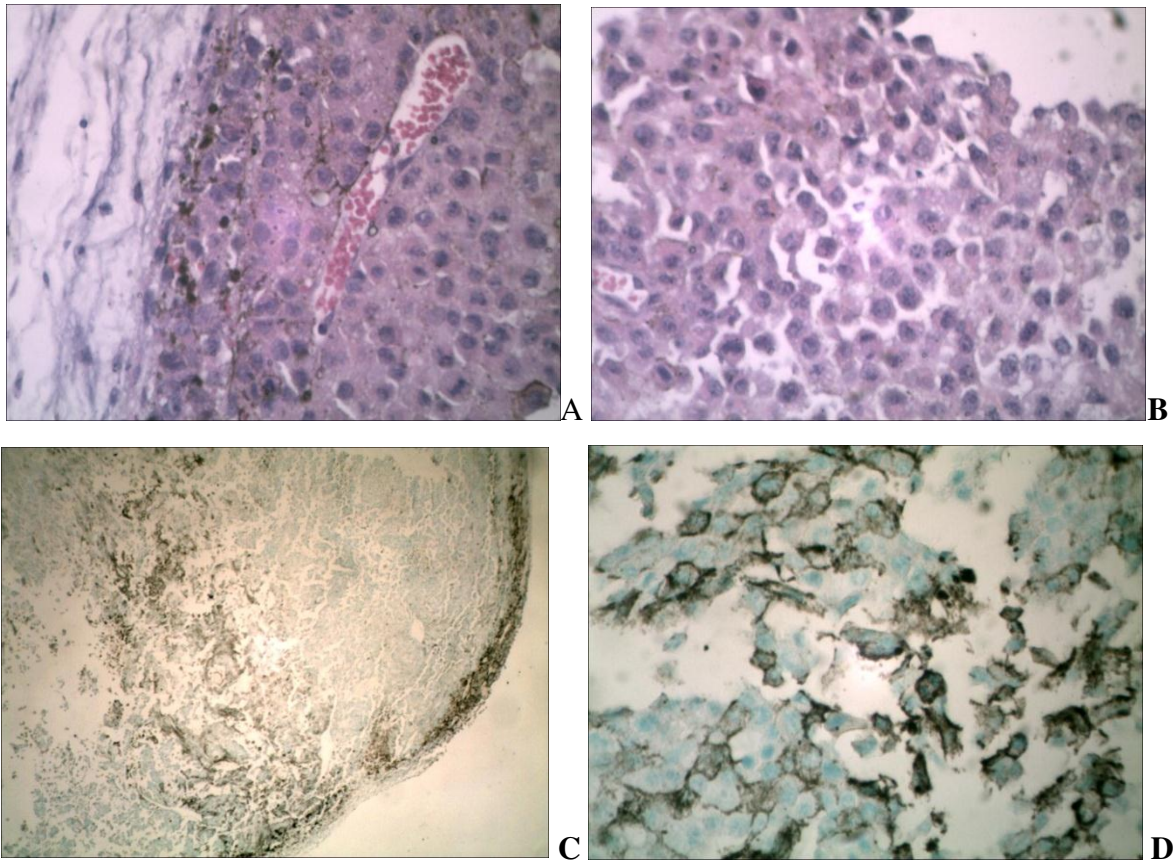
Figura 60. Fotomicrografia do tumor subcutâneo de B16-F10 do controle positivo



Fotomicrografia do tumor subcutâneo de B16-F10 do controle positivo, após 15 dias.

Coradas com Hematoxilina-Eosina. Aumento 100x (A) e 400x (B). Corte com imunohistoquímica para TUNEL, contracorado com verde de metila. Aumento 40x (C), 400x (D).

Figura 61. Fotomicrografia do tumor subcutâneo de B16-F10 tratado com arucanolídeo 15mg/Kg



Fotomicrografia do tumor subcutâneo de B16-F10 tratado com arucanolídeo 15mg/Kg, após 15 dias. Coradas com Hematoxilina-Eosina. Aumento da ocular: 10x. Aumento 400x (A e B). Corte com imunohistoquímica para TUNEL, contracorado com verde de metila. Aumento da ocular: 10x. Aumento 40x (C), 400x (D).

Em todos os tumores nota-se uma coloração castanho, não originária da revelação da imunohistoquímica, visto que essa coloração também é notada nos cortes corados com HE (Figs 59-61). Essa coloração marrom é citoplasmática, e devido às características dessa linhagem, esse pigmento pode ser melanina, porém, para a confirmação, é necessário uma coloração específica.

O teste de imunohistoquímica para TUNEL marca fragmentação de DNA, portanto a técnica de imunohistoquímica gera um precipitado marrom no núcleo da célula. Essa marcação foi encontrada somente no tumor do grupo controle positivo (seta – Fig. 59), mostrando que, provavelmente, parte das células podem morrer quando o tumor atinge um determinado volume. No caso dos grupos tratados com o 5-FU (controle positivo) e com o

arucanolídeo 15mg/Kg a fragmentação de DNA não foi observada, sugerindo que esses tratamentos podem não estar induzindo apoptose *in vivo*, e que, provavelmente, eles estejam atuando impedindo o crescimento tumoral, sem interferência direta na morte celular.

Para confirmar essa hipótese, testes específicos que avaliam a proliferação celular, como o PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) serão necessários. Além disso, a imunohistoquímica foi realizada em apenas 1 dos tumores como uma primeira análise qualitativa. Para a análise quantitativa, em um próximo experimento, todos os tumores deveriam ser analisados e todas as células marcadas quantificadas.

Uma das maiores críticas sobre a pesquisa e o tratamento de câncer é a frequente falha em reproduzir clinicamente os promissores resultados obtidos em estudo pré-clínicos, geralmente usando tumores singênicos de camundongos ou tumores xenográficos humanos (Francia *et al*, 2011).

Há uma série de fatores que podem explicar o fato de que a pesquisa de novos fármacos ou tratamentos anticâncer apresentem potentes efeitos antitumorais em estudos pré-clínicos em camundongos, enquanto apresentam efeitos muito menos impressionantes ou até mesmo nenhum benefício clínico em pacientes com câncer. Dentre eles estão a variação no metabolismo de drogas e farmacocinética, o uso frequente de tumores de crescimento rápido e o uso de diversos *endpoints*. Entretanto, é provável que uma das razões mais importantes para as discrepâncias entre os resultados pré-clínicos e clínicos é o impacto da metástase avançada (Man *et al*, 2007).

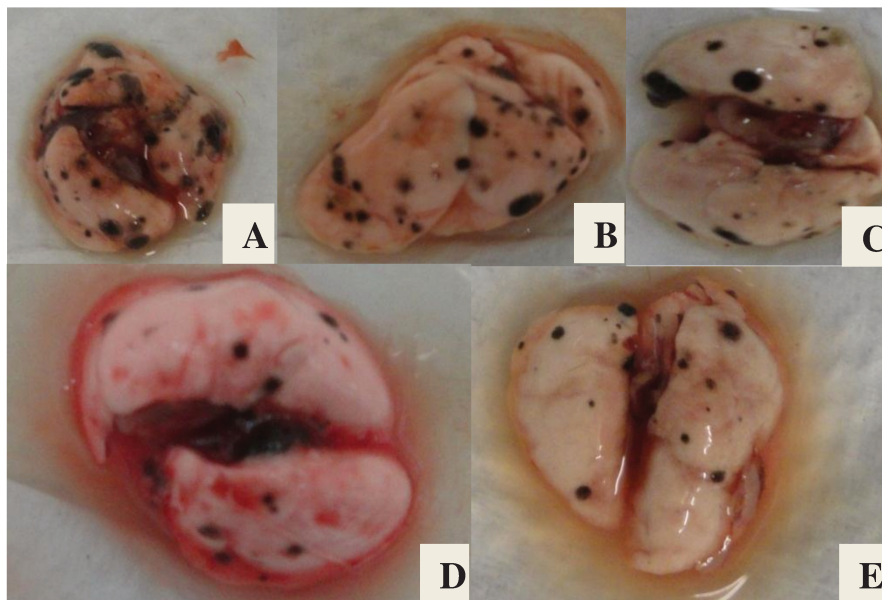
Com isso, há a necessidade de desenvolver modelos de doença metastática avançada que pode ser usado para avaliação de novos fármacos anticâncer. Embora tais modelos provavelmente não sejam práticos para uma triagem rotineira *in vivo* de fármacos candidatos a novos medicamentos, eles poderiam ser utilizados para refinar a decisão sobre se um novo fármaco ou tratamento, que já se mostrou ativo nos modelos tradicionais, deve avançar para a avaliação em ensaios clínicos. Em caso afirmativo, qual o tipo de malignidade seria o alvo “ideal”. Além disso, o uso desses modelos em pesquisas experimentais podem revelar fármacos altamente eficazes para o tratamento de doença metastática avançada (Francia *et al*, 2011).

O modelo de metástase experimental é amplamente utilizado nesses casos para avaliar a atividade de novos fármacos. O modelo de metástase experimental consiste em

inocular a células originárias de uma metástase na corrente sanguínea e avaliar sua implantação nos locais preferenciais. Nesse modelo o fármaco pode atuar na célula, quando ainda na corrente sanguínea, na implantação da célula no tecido alvo e na célula após desenvolvimento do nódulo metastático. Diferente do modelo de metástase espontânea, no qual as células são inoculadas ortotópicamente, isto é, no órgão original da linhagem tumoral, e migram para a corrente sanguínea para atingir novos órgãos (Francia *et al*, 2011). Esse último modelo é mais completo, porém as células B16-F10 não tem capacidade de migrar do tumor subcutâneo original para a corrente sanguínea, com isso, o modelo utilizado nesse trabalho foi o modelo de metástase experimental.

O modelo de metástase experimental com células B16-F10 é amplamente estudado e, após a inoculação pela veia safena, via de inoculação diferente da via geralmente usada (veia da cauda), as células de melanoma produzem metástases no pulmão (Hem *et al*, 1998). Como essas células de melanoma produzem melanina, as metástases possuem cor negra na superfície pulmonar (Fig. 125), que facilita a avaliação da eficácia de um novo fármaco através da dosagem do conteúdo total de melanina no pulmão. Dessa forma, o arucanolídeo foi avaliado nesse modelo experimental através da dosagem de melanina do pulmão.

Figura 62. Fotografias de metástases pulmonares causadas pelas células B16-F10.



Fotografias de metástases pulmonares causadas pelas células B16-F10 dos grupos veículo (controle negativo - A), 5-FU (controle positivo - B) e arucanolídeo nas doses de 5mg/Kg (C), 10mg/Kg (D) e 15mg/Kg (E).

Figura 63. Dosagem da melanina extraída dos pulmões

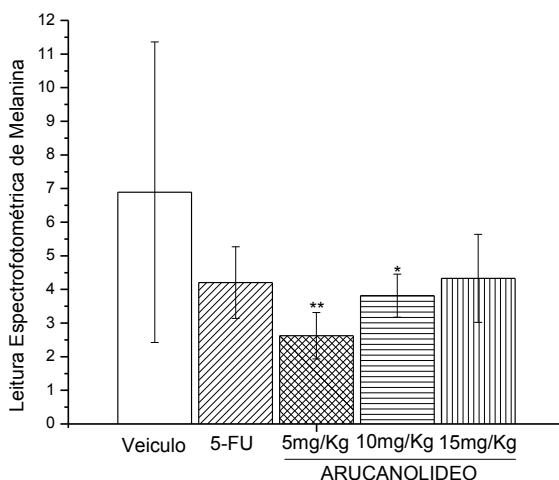


Gráfico de barras expressando média \pm desvio da leitura espectrofotométrica da melanina extraída dos pulmões, dividido pelo peso pulmonar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (em relação ao controle negativo). Teste não estatístico $p = 0,11$.

Apesar desse experimento não ter sido estatisticamente válido ($p = 0,11$), devido ao grande desvio presente no grupo controle negativo (veículo), os grupos tratados com arucanolídeo 5mg/Kg com 62% de redução na quantidade de melanina ($p = 0,01$) e 10mg/Kg com 55% de redução na quantidade de melanina ($p = 0,05$) reduziram as metástases pulmonares, quando comparados com o controle negativo (veículo). Esse ensaio necessita ser refeito, porém mostra a capacidade antimetastática do arucanolídeo, melhor que o controle positivo (5-FU) que reduziu 39% da quantidade de melanina ($p = 0,08$).

O alvo específico de atividade do arucanolídeo na geração de metástases é incerto. O arucanolídeo poderia atuar matando parte das células ainda na corrente sanguínea, poderia dificultar a invasão da célula B16-F10 no tecido pulmonar, ou até mesmo atuar na proliferação ou gerar morte das células já no nódulo metastático. Esses resultados evidenciam o potencial do arucanolídeo como um novo quimioterápico com atividade *in vivo*, principalmente para o tratamento de melanomas.

Além da avaliação da atividade antitumoral, durante os experimentos de atividade antimetastática *in vivo*, alguns parâmetros toxicológicos foram determinados, pois uma das etapas para o desenvolvimento de um novo medicamento envolve a realização de estudos de toxicidade pré-clínica. Como o arucanolídeo se mostrou eficiente para o tratamento de

melanoma, alguns aspectos dos estudos de como evolução de ganho de peso, peso de órgãos, parâmetros hematológicos e bioquímicos foram avaliados.

Figura 64. Ganho de peso dos animais tratados com arucanolídeo após 18 dias

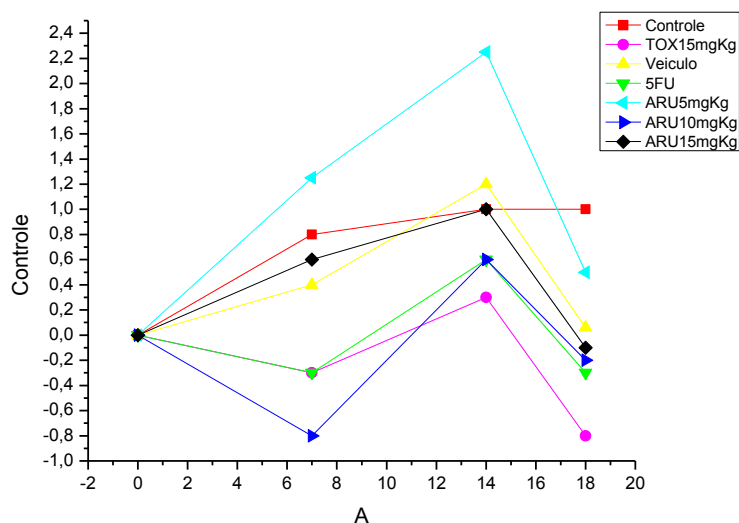


Gráfico de linha dos grupos do experimento de atividade antimetastática. Grupo normal que não recebeu células B16-F10(Controle). Grupo normal tratado com ARU 15mg/Kg. Grupos com metástases, receberam 1×10^5 células B16-F10 via endovenosa, Veículo: grupo controle negativo; 5-FU: grupo controle positivo; ARU 5, 10 e 15mg/Kg.

Os grupos que perderam peso na primeira semana se recuperaram na semana seguinte, porém na terceira semana de tratamento apenas o controle não perdeu peso. Isso mostra que o próprio modelo gera perda de peso, um sinal de toxicidade, porém o tratamento com arucanolídeo parece agravar essa situação, já que o grupo tratado com o arucanolídeo, sem células de metástase, também teve perda de peso, porém nenhuma perda de peso foi superior a 10% (Fig. 64).

Os grupos que não receberam células têm seus valores de leucócitos dentro da faixa normal, sugerindo que o esquema de tratamento i.p., duas vezes por semana, com o arucanolídeo 15mg/Kg não gera leucopenia, uma característica comum de quimioterápicos. Já nos grupos que receberam as células B16-F10, mesmo no grupo controle negativo, um dos animais apresentou leucopenia, que nesse caso pode ser uma característica do modelo, porém o arucanolídeo parece não ser capaz de reverter esse quadro já que na dose de 10mg/Kg, um dos animais também apresenta leucopenia (Tabela 29). Já na dose de

15mg/Kg, dois dos animais apresentam valores acima da faixa normal, o que nesse caso poderia significar uma reação inflamatória, que poderia inclusive prejudicar a atividade metastática nessa dose, explicando a ausência de atividade nesse modelo, com a dose maior (Tabela 29, Fig. 63).

Tabela 29. Número Total de Leucócitos ($10^9/L$) dos animais tratados com arucanolídeo

Sem Metástases		Com Metástases				
Controle	TOX 15mg/Kg	Veículo	5-FU	ARU 5mg/Kg	ARU 10mg/Kg	ARU 15mg/Kg
10,7	9,1	4,5	10,9	9,1	11,2	11,6
9,6	11,1	10,6	9,8	10,3	8,2	13,5*
11	8,8	10,2	11,7	9,9	8,8	9,5
12	6,2	3,2*	8,2	7,7	9,2	8,7
10,7	10,2	12,2	9,5	5,9	7,1	11,2
10,9	8,2	7,2	6,1	7,6	2*	14,1*

Valores normais: 4 a $12 \times 10^9/L$. *valores fora da faixa normal. Grupos sem metástases não receberam as células B16-F10, Controle: serve como parâmetros normais; TOX 15mg/Kg: recebeu o mesmo padrão de tratamento com arucanolídeo. Grupos com metástases, receberam 1×10^5 células B16-F10 via endovenosa, Veículo: grupo controle negativo; 5-FU: grupo controle positivo; ARU 5, 10 e 15mg/Kg: grupo tratado com arucanolídeo nas respectivas doses.

O modelo de metástases com a B16-F10 também parece reduzir o número de eritrócitos causando anemia em dois dos animais do grupo veículo, e em quatro dos grupos tratados. Os animais tratados com arucanolídeo 15mg/Kg que não receberam células B16-F10 não tem alteração no número de eritrócitos, reforçando a hipótese que a anemia é consequência do modelo experimental (Tabela 31).

Tabela 30. Contagem de Eritrócitos ($10^{12}/L$) dos animais tratados com arucanolídeo

Sem Metástases		Com Metástases				
Controle	TOX 15mg/Kg	Veículo	5-FU	ARU 5mg/Kg	ARU 10mg/Kg	ARU 15mg/Kg
9,9	9,1	2,18*	9,46	9,36	10,81	10,96
11,05	11,1	9,5	9,48	9,31	9,61	10,59
9,8	8,8	9,8	10,14	10,09	10,01	11,24
11,15	6,2	5,7*	9,51	9,9	11,14	11,73
11,41	10,2	10,39	8,53	5,17*	5,95*	6,08*
10,86	8,2	10,5	9,73	9,88	6,47*	9,09

Valores normais: 7 a $11 \times 10^{12}/L$. *valores fora da faixa normal. Grupos sem metástases não receberam as células B16-F10, Controle: serve como parâmetros normais; TOX 15mg/Kg: recebeu o mesmo padrão de tratamento com arucanolídeo. Grupos com metástases, receberam 1×10^5 células B16-F10 via endovenosa, Veículo: grupo controle negativo; 5-FU: grupo controle positivo; ARU 5, 10 e 15mg/Kg: grupo tratado com arucanolídeo nas respectivas doses.

Tabela 31. Contagem de Plaquetas ($10^9/L$) dos animais tratados com arucanolídeo

Sem Metástases		Com Metástases				
Controle	TOX 15mg/Kg	Veículo	5-FU	ARU 5mg/Kg	ARU 10mg/Kg	ARU 15mg/Kg
1127	1136	120*	1352	1187	702*	751*
1300	1188	1166	1180	1208	1131	1076
1122	1401	1207	1245	1302	1163	1115
1268	976	134*	1237	1288	480*	746*
976	689*	1151	1440	578*	1003	683*
868	1034	1180	495*	549*	152*	1354

Valores normais: 800 a $1600 \times 10^9/L$. *valores fora da faixa normal. Grupos sem metástases não receberam as células B16-F10, Controle: serve como parâmetros normais; TOX 15mg/Kg: recebeu o mesmo padrão de tratamento com arucanolídeo. Grupos com metástases, receberam 1×10^5 células B16-F10 via endovenosa, Veículo: grupo controle negativo; 5-FU: grupo controle positivo; ARU 5, 10 e 15mg/Kg: grupo tratado com arucanolídeo nas respectivas doses.

Já nas contagens de plaquetas, o tratamento do arucanolídeo, em camundongos sem receber células está alterado, com uma redução em relação a faixa normal, gerando plaquetopenia. No entanto esse modelo de metástase com as células B16-F10 também gera plaquetopenia. Essa característica também é comum na quimioterapia (Tabela 31).

Figura 64. Peso Relativo dos Órgãos (%)

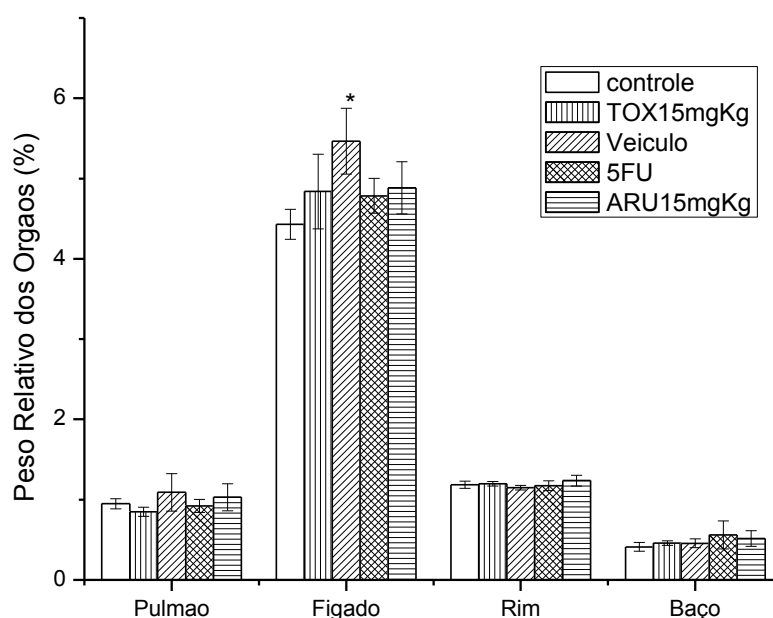


Gráfico de barras do peso relativo dos órgãos: Pulmão, Fígado, Rim e Baço dos animais tratados. *Valor diferente do controle. Grupos sem metástases não receberam as células B16-F10, TOX 15mg/Kg: recebeu o mesmo padrão de tratamento com arucanolídeo. Grupos com metástases, receberam 1×10^5 células B16-F10 via endovenosa, Veículo: grupo controle negativo; 5-FU: grupo controle positivo; ARU 15mg/Kg: grupo tratado com arucanolídeo.

Não há diferença no peso relativo dos órgãos dos animais tratados com arucanolídeo (Fig 64). TGO e TGP são transaminases que catalisam a conversão da porção nitrogenada de um aminoácido para um resíduo de aminoácido. Essas enzimas são liberadas no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito, resultando em aumento da permeabilidade. São encontrados níveis elevados de TGP e TGO em desordens que causam a morte de numerosas células (necrose hepática extensa). Isto acontece nas hepatites agudas A ou B, no dano produzido por drogas como o de uma overdose de

paracetamol, ou quando o fígado é privado de sangue arterial, que traz oxigênio e nutrientes.

Tabela 32. Valores de transaminase glutâmica oxalacética (TGO) dos animais (IU/l)

Sem Metástases TOX 15mg/Kg	Com Metástases		
	Veículo	5-FU	ARU 15mg/Kg
171	96,1 [#]	105	182
206	169	315*	182
124	116	303*	88,7 [#]
259	164	541*	235*
90,9 [#]	132	2112*	224
302*	297*	1068	165

Faixa de valores determinada pela média \pm 2xDesvio Padrão. Valores normais segundo a literatura (Loeb *et al*, 1999): 43 a 104IU/L. [#]Valores dentro da faixa normal. Os animais controle apresentavam valores de TGO fora da faixa normal, por isso uma nova faixa foi calculada, da mesma forma, para comparação dos grupos tratados. Valores controle: 75 a 226IU/L. *Valores fora da faixa controle. Grupos sem metástases não receberam as células B16-F10, TOX 15mg/Kg: recebeu o mesmo padrão de tratamento com arucanolídeo. Grupos com metástases, receberam 1×10^5 células B16-F10 via endovenosa, Veículo: grupo controle negativo; 5-FU: grupo controle positivo; ARU 15mg/Kg: grupo tratado com arucanolídeo.

Alguns animais tratados com o arucanolídeo apresentam alterações nos valores de TGO, e a maioria deles apresentam alterações nos valores de TGP, representando sinais de toxicidade hepática. No entanto o grupo tratado com o veículo também apresentou alterações dessas enzimas, sugerindo que modelo experimental de atividade metastática é capaz de gerar essa hepatotoxicidade, confirmada pelo aumento no peso relativo do fígado. O controle positivo 5-FU parece ser mais tóxico que o arucanolídeo, já que todos os animais tratados com 5-FU apresentam os valores de TGP alterados. Essa toxicidade ainda precisa ser mais explorada com testes toxicológicos completos (Tabelas 32-33). A toxicidade renal também foi avaliada.

Tabela 33. Valores de transaminase glutâmica pirúvica (TGP) dos animais (IU/L)

Sem Metástases	Com Metástases		
TOX 15mg/Kg	Veículo	5-FU	ARU 15mg/Kg
59,5*	48,1*	91,6*	59,5*
88,8*	32,5	61*	85*
34,7	49,6*	108*	26,6
82,8*	97,7*	95,4*	39,7
32,9	51,5*	80,9*	20,1
82,1*	119*	72,1*	132*

Faixa de valores determinada pela média \pm 2xDesvio Padrão. Valores normais segundo a literatura (Loeb *et al*, 1999): 15 a 43IU/L. Os animais controle apresentavam valores de TGP dentro da faixa normal. Valores controle: 23 a 42IU/L. *Valores fora da faixa normal.

Grupos sem metástases não receberam as células B16-F10, TOX 15mg/Kg: recebeu o mesmo padrão de tratamento com arucanolídeo. Grupos com metástases, receberam 1×10^5 células B16-F10 via endovenosa, Veículo: grupo controle negativo; 5-FU: grupo controle positivo; ARU 15mg/Kg: grupo tratado com arucanolídeo.

Tabela 34. Valores de uréia dos animais (mg/dL)

Sem Metástases	Com Metástases		
TOX 15mg/Kg	Veículo	5-FU	ARU 15mg/Kg
27,2	66,1*	50,9*	45,9
38,5	60,7*	39,7	40,7
44,4	71,7*	37,9	36,5
42,8	47,2	44,4	47,6
49,5	54,9*	35,2	32
52,4*	53,6*	39,3	43,7

Faixa de valores determinada pela média \pm 2xDesvio Padrão. Valores normais segundo a literatura (Loeb *et al*, 1999): 13 a 34mg/dL. #Valores dentro da faixa normal. Os animais controle apresentavam valores de TGO fora da faixa normal, por isso uma nova faixa foi calculada, da mesma forma, para comparação dos grupos tratados. Valores controle: 24 a 49mg/L. *Valores fora da faixa controle. Grupos sem metástases não receberam as células

B16-F10, TOX 15mg/Kg: recebeu o mesmo padrão de tratamento com arucanolídeo. Grupos com metástases, receberam 1×10^5 células B16-F10 via endovenosa, Veículo: grupo controle negativo; 5-FU: grupo controle positivo; ARU 15mg/Kg: grupo tratado com arucanolídeo.

De uma forma geral os valores de uréia estiveram no intervalo de normalidade, com algumas elevações. Quando comparados com os dados de literatura os valores obtidos estão elevados. No entanto, isso tem sido o padrão observado nas espécies utilizadas pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA, podendo estar relacionado com o tipo de ração consumida, que possui teores de proteína mais elevados. Os valores de Fosfatase alcalina, GammaGT, creatinina e ácido úrico também foram determinados estando na faixa de normalidade para todos os grupos.

Com esses resultados, o arucanolídeo parece ter toxicidade hepática, menor que o quimioterápico usado de controle 5-FU, mantendo seu potencial para o encaminhamento para pesquisa clínica após um estudo toxicológico completo.

Conclusões

-
- O arucanolídeo é um dos compostos envolvidos na atividade antitumoral de *Calea pinnatifida*, com concentração de 3% no extrato bruto.
 - O arucanolídeo apresenta atividade antiproliferativa semelhante à atividade do partenolídeo (germacranolídeo isolado de *Tanacetum parthenium*), com seletividade para as linhagens de melanoma (UACC-62) e rim (786-0); induzindo apoptose por ativação de caspases em todas as linhagens avaliadas (U-118, HeLa, SK-MEL-2, B16-F10).
 - Nas linhagens de glioblastoma U-118 e melanoma SK-MEL-2 o arucanolídeo induziu apoptose pela geração de radicais livres utilizando a via intrínseca da apoptose. A ativação dessa via foi confirmada através do tratamento prévio com N-acetil-cisteína que inibiu o processo apoptótico.
 - Nas células HeLa o arucanolídeo induz apoptose pela via extrínseca da apoptose.
 - A pouca indução de apoptose nas células HeLa Bcl-xL sugerem que o envolvimento da mitocôndria nesse processo é importante, porém não essencial.
 - A redução significativa da apoptose em células SK-MEL-2 Bcl-xL evidenciam a importância da mitocôndria na indução de apoptose pelo arucanolídeo nessas células.
 - O arucanolídeo também induziu apoptose nas células B16-F10 *in vitro* através da ativação de caspases. No entanto, essa característica não foi reproduzida em modelo experimental (*in vivo*) de câncer.
 - O arucanolídeo apresenta atividade antitumoral *in vivo* em tumor subcutâneo B16-F10, e aparente atividade antimetastática em modelo de metástase experimental com células B16-F10;
 - Os animais tratados com arucanolídeo na dose de 15mg/Kg apresentam toxicidade hepática.

- Todos os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* estimulam a continuidade dos estudos com o arucanolídeo, com a finalidade de desenvolver um novo quimioterápico, principalmente para o tratamento de melanomas.

Referências Bibliográficas

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002) *Biologia Molecular da célula*. 4^o edição, Artmed, Porto Alegre, 1313-1362.
- Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Júnior AS, Zani CL. (2000) Biological screening of brazilian medicinal plants. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 367-373.
- Anderson KN, Bejcek BE. (2008) Parthenolide induces apoptosis in glioblastomas without affecting NF-kappaB. *J Pharmacol Sci*. 106(2):318-20.
- ATCC: The essentials of life science research. <http://www.atcc.org>
- Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. (2012) Lee J, Giordano S, Zhang J. *Biochem J*. 441(2):523-40
- Barcelos RC, Pastre JC, Caixeta V, Vendramini-Costa DB, Carvalho JE, Pilli RA. (2012). Synthesis of methoxylated goniothalamine, aza-goniothalamine and γ -pirones and their in vitro evaluation against human cancer cells. *Bioorg Med Chem*, 20(11): 3635-3651.
- Bolzani VS, Young CM, Furlan M, Cavalheiro AJ, Araújo AR, Silva DHS, Lopes MN. (1999) Search for antifungal and anticancer compounds from native plants species of Cerrado and Atlantic Forest. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 71: 181-187.
- Bork, P.M., Schmitz, M.L., Kuhnt, M., Escher, C., Heinrich, M. (1997) Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as a potent inhibitors of transcription factor NF- κ B. *FEBS Letters*, 402:85-90.
- Brown JM and Attardi LD. (2005) The Role of Apoptosis in Cancer Development and Treatment Response. *Nature Reviews: Cancer*, 5: 231- 237.
- de Bruin EC, Medema JP. (2008) Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev*. 34(8):737-49.
- Cen XN, Zhu P, Shi YJ, Ren YL, Ma MX, Yu JR. (2002) Cytokine-induced killer cells induce apoptosis of K562 cells expressed bcr-abl. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 10 (3): 201-4.

- Chao DT, Korsmeyer SJ. (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Ver Immunol.* 16:395-419.
- Czuczman MS, Grillo-López AJ, White CA, Saleh M, Gordon L, LoBuglio AF, Jonas C, Klippenstein D, Dallaire B, Varns C. (1999) Treatment of Patients With Low-Grade B-Cell Lymphoma With the Combination of Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody and CHOP Chemotherapy *J Clin Oncol.*: 17(1): 268.
- Czyz M, Lesiak-Mieczkowska K, Koprowska K, Szulawska-Mroczek A, Wozniak M. (2010) Cell context-dependent activities of parthenolide in primary and metastatic melanoma cells. *Br J Pharmacol.* 160(5):1144-57.
- D'Anneo A, Carlisi D, Lauricella M, Emanuele S, Di Fiore R, Vento R, Tesoriere G. (2012) Parthenolide induces caspase-independent and AIF-mediated cell death in human osteosarcoma and melanoma cells. *J Cell Physiol.* Jun 11, *in press*.
- Dewick PM. (2006) The Mevalonate and Deoxyxylulose Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids. In: Dewick PM. *Medicinal Natural Products*, 2nd Edition, John Wiley & Sons LTD, England, p. 167.
- Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, Dicato M, Diederich M. (2005) Chemopreventive and Therapeutic Effects of Curcumin. *Cancer Letters*, 233: 181-190.
- Fadeel B and Orrenius S. (2005) Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Human Disease. *Journal of Internal Medicine*, 258: 479-517.
- Ferreira ZS, Roque NF, Gottlieb OR, Oliveira F, Gottlieb HE. Structural clarification of germacranolides from *Calea* species. *Phytochemistry* 1980; 19: 1481-1484.
- Francia, G., Cruz-Munoz, W., Man, S., Xu, P. & Kerbel, R. S. (2011) Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nature Rev. Cancer.* 11, 135-141.
- Gao S and Scott RE. (2003) Stable overexpression of specific segments of the P2P-R protein in human MCF-7 cells promotes camptothecin-induced apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 97(3): 445-52.

- Garcia-Pineres AJ, Castro V, Mora G, Schmidt TJ, Strunck E, Pahl HL, Merfort I. (2001) Cysteine 38 in p65/NF- κ B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. *J. Biol. Chem.*: 276: 39713.
- Ghantous A, Gali-Muhtasib H, Vuorela H, Saliba NA, Darwiche N. (2010) What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discov Today*. 15(15-16):668-78.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 13(15):1899-911.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.
- Hehlhans S, Haase M, Cordes N. (2007) Signalling via integrins: Implication for cell survival and anticancer strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1775:163-180.
- Hem A, Smith AJ, Solberg P. (1998) Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Lab Anim*. 32(4):364-8.
- HemaIswarya S and Doble M. (2006) Potential Synergism of Natural Products in the Treatment of Cancer. *Phytotherapy Research*, 20:239-249.
- His LC, Back SJ, Eling TE. (2000) Lack of cyclooxygenase-2 activity in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *Experimental Cell Research*, 256 (2): 563-70.
- Holbeck SL. (2004). Update on NCI in vitro drug screen utilities. *Eur J Cancer*, 40: 785-793.
- Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG Jr. (1995) Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nature: Medicine*, 1(8): 822-6.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA). (2012) <http://www.inca.gov.br>
- Issa, A.Y., Volate, S.R., Wargovich, M. J. (2006) The Role of phytochemicals of cancer and inflammation: New directions and perspective. *J. Food Comp. Anal*. 19: 405-19.
- Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. (2011) Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 10(3):221-37.

- Kim, S.H., Kang, S.N., Kim, H.J., Kim, T.S. (2002) Potentiation of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation of human promyelocytic leukemia cells into monocytes by costunolide, a germacranolide sesquiterpene lactone. *Biochem. Pharmacol.*, 64: 1233-1242.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P. Abrams, J. Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M. Knight, R.A., Kumar, S., Lipton S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* 16: 3 – 11.
- Lee CS, Kim YJ, Lee SA, Myung SC, Kim W. (2012) Combined Effect of Hsp90 Inhibitor Geldanamycin and Parthenolide via Reactive Oxygen Species-Mediated Apoptotic Process on Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* Mar 21 *in press*.
- Lee HJ, Jung H, Kwon J, Li H, Lee da Y, Lim HJ, Kim MR, Moon DC, Ryu JH. (2011) A germacranolide sesquiterpene lactone suppressed inducible nitric oxide synthase by downregulating NF- κ B activity. *Can J Physiol Pharmacol.* 89(3):232-7
- Leist, M., Jäättelä, M. (2001) Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews – Mol. Cell Biol.* 2: 1-10.
- Lesiak K, Koprowska K, Zalesna I, Nejc D, Döchler M, Czyz M. (2010) Parthenolide, a sesquiterpene lactone from the medical herb feverfew, shows anticancer activity against human melanoma cells in vitro. *Melanoma Res.* 20(1):21-34.
- Li HM, Fujikura D, Harada T, Uehara J, Kawai T, Akira S, Reed JC, Iwai A, Miyazaki T. (2009) IPS-1 is crucial for DAP3-mediated anoikis induction by caspase-8 activation. *Cell Death Differ.* 16(12):1615-21
- Liscovitch M and Ravid D. (2007) A case study in misidentification of cancer cell lines: MCF-7/AdrR cells (re-designated NCI/ADR-RES) are derived from OVCAR-8 human ovarian carcinoma cells. *Cancer Letters*, 245:350–352.
- Loeb WF & Quimby F W. (1999) *The Clinicom Chemistry of Laboratory Animals*. 2^a Ed. 1999. Ed. Taylor & Francis.

-
- Maeda S, Omata M. (2008) Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci.* 99(5):836-42.
 - Maggi ME, Mangeaud A, Carpinella MC, Ferrayoli CG, Valladares GR, Palacios SM. (2005) Laboratory evaluation of *Artemisia annua* L. extract and artemisinin activity against *Epilachna paenulata* and *Spodoptera eridania*. *J. Chem. Ecol.*: 31: 1527.
 - Mann J. (2002) Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature Reviews: Cancer*, 2:143-148.
 - Mao ZG, Jiang CC, Yang F, Thorne RF, Hersey P, Zhang XD. (2010) TRAIL-induced apoptosis of human melanoma cells involves activation of caspase-4. *Apoptosis*. 15(10):1211-22.
 - Marchetti GM. Atividade anticancer do extrato bruto e frações das folhas de *Calea pinnatifida* Banks. Dissertação de Mestrado. Unicamp, Instituto de Biologia, 2008.
 - Matsuura N, Yamada M, Suzuki H, Hasegawa N, Kurosaka C, Ubukata M, Tanaka T, Inuma M. (2005) Inhibition of Preadipocyte Differentiation by Germacranolides from *Calea urticifolia* in 3T3-L1 Cells. *Bioscience Biotechnological Biochemical*, 69 (12): 2470-2474.
 - McLaughlin N, Annabi B, Bouzeghrane M, Temme A, Bahary JP, Moundjian R, Béliveau R. (2006) The Survivin-mediated radioresistant phenotype of glioblastomas is regulated by RhoA and inhibited by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Brain Res.* 1071(1):1-9
 - Montero A, Fossella F, Hortobagvi G, Valero V. (2005) Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *Lancet Oncology*, 6: 229.
 - Nakagawa, Y., Inuma, M., Matsuura, N., Yi, K., Naoi, M., Nakayama, T., Nozawa, Y., Akao, Y. (2005) A potent apoptosis-inducing activity of a sesquiterpene lactone, arunanolide, in HL60 cells: a crucial role of apoptosis-inducing factor. *J. Pharmacol. Sci.*, 97:242-252.
 - Nascimento AM, Salvador MJ, Candido RC, Albuquerque S, Oliveira DCR. (2004b) Trypanocidal and antifungal activities of p-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea uniflora* (Heliantheae, Asteraceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56: 663-669.

- Nascimento AM, Salvador MJ, Candido RC, Ito IY, Oliveira DCR. (2004a) Antimicrobial activity of extracts and some compounds from *Calea platylepis*. *Fitoterapia*, 75:514-519.
- Newman DJ, Cragg GM.(2012) Natural products as Sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*. 75: 311-335.
- Organização Mundial da Saúde (OMS), www.who.int, 2011.
- Pajak B, Gajkowska B, Orzechowski A. (2008) Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 46: 129.
- Parada-Turska J, Paduch R, Majdan M, Kandefler-Szerszen M, Rzeski W. (2007) Antiproliferative activity of parthenolide against three human cancer cell lines and human umbilical vein endothelial cells. *Pharmacol. Reports*, 5: 233.
- Park JW, Lee SY, Yang JY, Rho HW, Park BH, Lim SN, Kim JS, Kim HR (1997). Effect of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) on the dimerization of lipoprotein lipase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1344 (2): 132–8.
- Plas DR and Thompson CB. (2002) Cell Metabolism in the Regulation of Programmed Cell Death. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13 (2), 74-78.
- Projeto GLOBOCAN, Agencia Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), www.globocan.iarc.fr, 2012
- Pruski JF and Urbatsch LE. (1988) Five new species of *Calea* (Compositae: Heliantheae) from Planaltine Brazil. *Brittonia* 40: 341-356.
- Rates SMK. (2001) Plants as Source of Drugs. *Toxicon*, 39: 603-13.
- Ribeiro VL, dos Santos JC, Martins JR, Schripsema J, Siqueira IR, von Poser GL, Apel MA. (2011) Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol*. 179:195-198;
- Rivero, A., Quintana, J., Eiroa, J.L., López, M., Triana, J., Bermejo, J., Estévez, F. (2003) Potent induction of apoptosis by germacranolide sesquiterpene lactones on human myeloid leukemia cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 482: 77-84.

- Rosenfeldt MT & Ryan KM. (2011) The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis*. 32(7):955-63.
- Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J. (2008) Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell. Mol. Life Sci.*: 65: 2979-2999.
- Schuller HM, Falzon M, Gazdar AF, Hegedus T. (1987) Cell type-specific differences in metabolic activation of N-nitrosodiethylamine by human lung cancer cell lines. *IARC Science Publications*, 84, 138-40.
- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu H, Zhang Y, Nair MG, Heber D. (2005) In vitro Antiproliferative, Apoptotic and Antioxidant Activities of Punicalagin, Ellagic Acid and a Total Pomegranate Tannin Extract are Enhanced in Combination with Other Polyphenols as found in Pomegranate Juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 360-367.
- Shoemaker RH. (2006) The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer*. 6: 813.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D. (1990) New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening, *J. Nat. Cancer Inst.*, 82: 1107.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. (2001) Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med.*: 344: 783-792.
- Smith CC, Yellon DM. Necroptosis, necrostatins and tissue injury. *J Cell Mol Med*. 2011 Sep;15(9):1797-80
- Smith JA, Ngo H, Martin MC, Wolf JK. (2005) An Evaluation of Cytotoxicity of the Taxane and Platinum Agents Combination Treatment in a Panel of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. *Gynecologic Oncology*, 98: 141-145.
- Srivasta V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja PS. (2005) Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13: 5892-5908.

- Suggit, M. and Bibby, M.C. (2005) 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. *Clinical Cancer Research*, 11: 971-981.
- Sur R, Martin K, Liebel F, Lyte P, Shapiro S, Southall M. (2009) Anti-Inflammatory Activity of Parthenolide-Depleted Feverfew (*Tanacetum parthenium*). *Inflammopharmacology*, 17: 42.
- Sweeney CJ, Mehrotra S, Sadaria MR, Kumar S, Shortle NH, Roman Y, Sheridan C. (2005) The sesquiterpene lactone parthenolide in combination with docetaxel reduces metastasis and improves survival in a xenograft model of breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 4: 1004.
- Takahashi T, Kozaki K, Yatabe Y, Achiwa H, Hida T. (2002) Increased expression of COX-2 in the development of human lung cancers. *J. Environm. Pathol., Toxicol. Oncol.* 21(2): 177-81.
- Takimoto CH. (1997) Topoisomerase Interactive Agents. In: DeVita Jr VT, Helman S, Rosenberg SA. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 5th Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 453-466.
- Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. (1998) IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 58(23):5315-20.
- Thiede MA, Strewler GJ, Nissenson RA, Rosenblatt M and Rodan GA. (1988) Human renal carcinoma expresses two messages encoding a parathyroid hormone-like peptide: evidence for the alternative splicing of a single-copy gene. *Proceedings of the National Academic of Science of USA*, 85(13): 4605-9.
- van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS. (2003) Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate*, 57 (3): 205-25.
- Venegas-Flores H, Segura-Cobos D, Vázquez-Cruz B. (2002) Antiinflammatory Activity of aqueous Extract of *Calea zacatechichi*. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 45:110-111.
- Vignesh S, Raja A, James RA. (2011). *Marine Drugs: Implication and Future Studies.* *Int. J. Pharmacol.* 7: 22-30

- Weinberg RA. (2008). A biologia do câncer. Porto Alegre: Artmed.
- Weinstein-Oppenheimer CR, Burrows C, Steelman LS, McCubrey JA. (2002) The effects of beta-estradiol on Raf activity cell cycle progression and growth factor synthesis in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cancer Biology Therapeutics*, 1 (3): 256-62.
- Wen J, You KR, Lee SY, Song CH, Kim DG. (2002) Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *J Biol Chem*. 277(41):38954-64.
- Wu H, Fronczek FR, Burandt CL Jr, Zjawiony JK. (2011) Antileishmanial Germacranolides from *Calea zacatechichi*. *Planta Med*. 77:749-753
- Xu D, Ye D, Fisher M, Juliano RL. (2002) Selective inhibition of P-glycoprotein expression in multidrug-resistant tumor cells by a designed transcriptional regulator. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302 (3): 963-71.
- Yamada, M., Matsuura, N., Suzuki, H., Kurosaka, C., Hasegawa, N., Ubukata, M., Tanaka, T., Inuma, M. (2004) Germacranolides from *Calea urticifolia*. *Phytochemistry*, 65:3107-3111.
- Yang L, Mashima T, Sato S, Mochizuki M, Sakamoto H, Yamori T, Hara T, Tsuruo T. (2003B) Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Research*, 63(4): 831-7.
- Yang LX, Zhu J, Wang HJ, Holton RA. (2003A) Enhanced apoptotic effects of novel paclitaxel analogs on NCI/ADR-RES breast cancer cells. *Anticancer Research*, 23(4): 3295-301.
- Yao Z, Che XC, Lu R, Zheng MN, Zhu ZF, Li JP, Jian X, Shi LX, Liu JY, Gao WY. (2007) Inhibition by tyrosinase inhibitor (YSL) on the invasion and adhesion of the mouse melanoma cell. *Mol. Med.*: 13(1-2): 14.
- Yuan J, Kroemer G. (2010) Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev*. 24(23):2592-602.

Referências Bibliográficas

- Zanotto-Filho A, Braganhol E, Schröder R, de Souza LH, Dalmolin RJ, Pasquali MA, Gelain DP, Battastini AM, Moreira JC. (2011) NFκB inhibitors induce cell death in glioblastomas. *Biochem Pharmacol.* 81(3):412-24.
- Zhang S, Choon-Nam Ong, Han-Ming Shen. (2004) Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis.

Anexos

Aprovação do Comitê de Ética Animal – CEEA



UNICAMP

CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

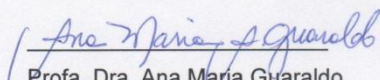
CERTIFICADO

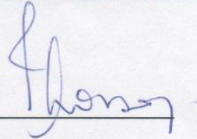
Certificamos que o Protocolo nº 1438-1, sobre "Atividade anticâncer e identificação do princípio ativo da *Calea pinnatifida*", sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Gabriela Menezes Marchetti, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 11 de fevereiro de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1438-1, entitled "Anticancer activity and identification of the active principles of *Calea pinnatifida*", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on February 11, 2008.

Campinas, 11 de fevereiro de 2008.


 Profa. Dra. Ana Maria Guaraldo
 Presidente


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
 Caixa Postal 6109
 13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
 E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Aprovação do Comitê de Ética Animal – CEEA



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

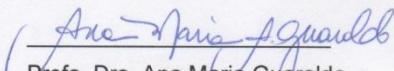
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1439-1, sobre "Atividade anticâncer e identificação do princípio ativo da *Calea pinnatifida*", sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Gabriela Menezes Marchetti, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 11 de fevereiro de 2008.

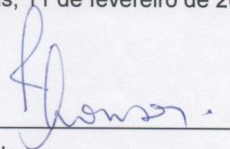
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1439-1, entitled "Anticancer activity and identification of the active principles of *Calea pinnatifida*", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on February 11, 2008.

Campinas, 11 de fevereiro de 2008.



Prof. Dra. Ana Maria Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>