

MÁRCIA APARECIDA ANTÔNIO

**ATIVIDADE ANTITUMORAL, ISOLAMENTO E
IDENTIFICAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS DA *Gaylussacia*
brasiliensis (Spreng.) Meisn. (Ericaceae)**

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

CAMPINAS
2004

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

MÁRCIA APARECIDA ANTÔNIO

**ATIVIDADE ANTITUMORAL, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS
PRINCÍPIOS ATIVOS DA *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.
(Ericaceae)**

Tese de Doutorado apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Clínica Médica da
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Doutor em Clínica
Médica na Área de Ciências Básicas.

Orientador
Prof. Dr. Paulo Eduardo Pizão
CPQBA/UNICAMP

CAMPINAS

UNIDADE	DC
Nº CHAMADA	
TI UNICAMP	
An 88a	
V	EX
TOMBO BC	66419
PROC	6.00086.05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	30/01/05
Nº CPD	

BIB ID : 373882

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

An88a Antônio, Márcia Aparecida

Atividade antitumoral, isolamento e identificação dos princípios ativos da *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. (Ericaceae) / Márcia Aparecida Antônio. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Paulo Eduardo Pizão

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Plantas medicinais. I. Paulo Eduardo Pizão. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Orientador(a): *Prof. Dr. Paulo Eduardo Pizão*



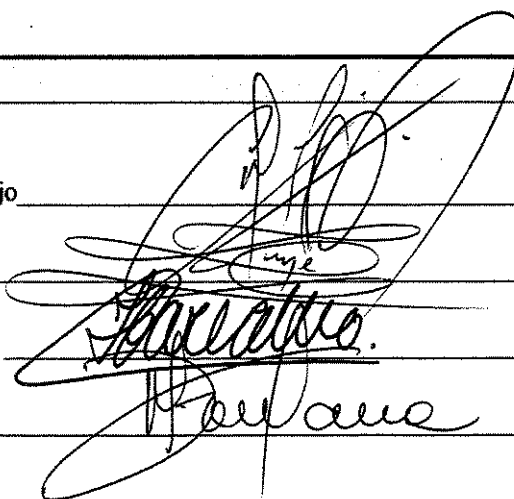
Membros:

1. Prof. Dr. Carlos Eduardo Pulz Araujo

2. Profa. Dra. Luciane Cruz Lopes

3. Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

4. Prof. Dr. Marcos Dias Fontana



**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 07/05/2004

Figure 3. Scanning electron microscopy of OVCAR-03 cells after the following treatment: A, B: non-treated cells; C to H: cells exposed to increasing concentration of triterpene active compound; C (2,5 $\mu\text{g/mL}$), D (25 $\mu\text{g/mL}$), E, F (50 $\mu\text{g/mL}$) G, H (250 $\mu\text{g/mL}$). Bar Scale: A,B,C, D: 40 μm and E, F, G, H: 16 μm . (arrow: membrane blebbing; p: pits).....102

Estropeie o homem e você terá o seu Walter Scott;
Enterre-o nas neves de Belinfort, e você terá um George Washington;
Eduque-o em pobreza abjeta e você terá um Abraham Lincon;
Atinja-o com poliomielite e ele se torna um Franklin Rossvelt;
Ensurdeça-o e você terá um Ludwig Van Beethoven;
Chame-o de aprendiz lerdo e retardado e dispense-o por ser incapaz de aprender e
você terá um Albert Eisten!

(Tedd Angstron)

Do que você tem medo? A única coisa que devemos temer é o medo.
A eficiência e a grandeza aguardam aqueles que se recusam a correr de medo.
O medo é o microscópio que aumenta o perigo!
(Franklin Rossvelt)

Reconheçamos a força propulsora de um sonho e que continuemos sonhando, pois, de certo modo, o sonho é como uma semente.

E o poder de uma semente nunca deve ser subestimado, pois em uma semente podemos encontrar uma floresta, já que em cada semente há uma árvore e em cada árvore há frutos e sementes que germinarão em outras árvores com frutos e sementes.

Em síntese, o que nós vemos na semente não é tudo que existe. Isto é chamado de **potencial**, ou seja, não se trata do que é, mas do que poderá vir a ser.

Aos meus pais:

Ignéz Agostini Antônio e José Antônio

Obrigada por plantar e cuidar da semente!

Proteger a floresta!

Regar a árvore!

Estimular o potencial

Fazer deste trabalho um sonho realizado!

Obrigada por tudo!

Por vocês existirem dentro do meu coração,

Por terem me permitido ser parte de vocês.

Pelo primeiro incentivo a ciência.

Este trabalho é dedicado a vocês.

Ao meu marido Sidemar Luís da Silva, pelo amor, carinho e dedicação nas horas difíceis, mas também naquelas alegres! Obrigada inspirar-me. Por revitalizar minha imaginação e ajudar-me a abrir caminho para a ela. Obrigada por confiar na viabilidade do possível. Obrigada por estar sempre ao meu lado, pois sozinha eu não teria a coragem de começar nem a persistência de chegar ao fim. Obrigada por aceitar, voluntariamente, os riscos deste desafio!

Ao meu filho Vitor Antônio Silva, por fazer-me entender que a vida vale a pena.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Pizão

O empurrão é o maior presente que a águia pode oferecer aos seus filhotes, é o seu supremo ato de amor. A águia sabe que enquanto os filhotes não descobrirem suas asas, não haverá propósito para a sua vida; enquanto eles não aprenderem a voar, não compreenderão o privilégio que é nascer uma águia. Obrigada por estimular-me a exercer a independência profissional, a buscar novas oportunidades, aceitar os desafios.

“O professor sempre afeta a eternidade, ele nunca sabe onde sua influência termina!”.

(Hanry Adams)

Agradecimentos especiais

Você não é um acaso... Você é uma realidade.

Nada nesta vida acontece por acaso. Ninguém chega até nós por um simples acaso.

Um dito popular muito sábio diz: "As pessoas se encontram por acaso, mas não permanecem em nossa vida por causa desse simples acaso". Agradeço a todos que, por acaso, compartilharam este trabalho comigo.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, pela acolhida na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA / UNICAMP, bem como pelas orientações, ensinamentos, oportunidades, e acima de tudo a amizade a mim dedicada. Obrigada por apoiar-me quando a estrada parecia íngreme demais, ensinando-me a descansar quando for preciso, mas não desistir, pois a vida tem suas exigências, que devem ser cumpridas.

A Dra. Mary Ann Foglio, pela orientação no processo de isolamento e identificação dos princípios ativos da *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn., bem como por estar ao meu lado, de forma surpreendente, nos momentos mais importantes, que me marcaram, transformaram, comoveram. Agradeço pela amizade, apoio e dedicação imensuráveis e por me ensinar, muitas vezes, como crescer.

A Ana Possenti, pela colaboração na realização dos experimentos e pelo carinho indispensável nos momentos difíceis. Obrigada por ensinar-me a viver com amor e intensamente cada minuto de minha existência.

A Ms. Luciana Konecny Kohn, pela parceria, indispensável realização de todo o trabalho e pela crescente amizade cultivada de maneira tão singular. Obrigada por ajudar-me a soprar aos ventos os meus sonhos, fazendo com que eles se espalhassem pelos ares e voltassem para mim em forma de realidade.

A Ms. Patrícia Corrêa Dias, contemporânea, amiga querida. Pela sua presença, pela sua colaboração e parceria sempre presente que tanto estimo. Obrigada por ensinar-me a olhar no espelho e, diante de minha própria imagem refletida, comprometer-me com minha própria essência e com a profundidade de meu ser.

A Sirlene Valério Tinti, por todo auxílio prestado e pela sincera amizade. Acima de tudo por incentivar-me, no dia-a-dia, a ouvir meu próprio coração e cultivar o silêncio da paz interior, buscando transformar nossa alma para que seja um reduto de harmonia, luz e amor.

A Ms.Aparecida Erica Bighetti, por toda dedicação e pela amizade conquistada. Obrigada por compartilhar comigo a idéia de que todos os nossos sonhos poderão transformar-se em realidade e que nós somos um exemplo vivo disto!

A Karin Maia Monteiro Ciampi, pelo apoio certo nas horas incertas, bem como pelas palavras de entusiasmo quando tudo parecia perdido, e acima de tudo por ajudar-me a enxergar que a estrada para o sucesso não é uma reta e que há uma curva chamada fracasso e um trevo chamado confusão, mas que também há uma placa chamada “amigo” que nos orientar a chegar até o sucesso!

Todos somos ilhas, mas fazemos parte de um grande arquipélago, onde interagimos uns nos outros, indistintamente. Por isso agradeço aos amigos Alik Teixeira Fernandes, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, Bruno Guena Fiorentini, Carina Denny, Carolina Salgado, Cristina Madjarof, Juliana Lessa Sacoman, Luciana Jankowsky, Luiz Augusto dos Santos, Maria Carolina Bayeux Leme Oliveira, Marília Mitie Inafuku, Marina Siqueira, Mário Sérgio e Orlando Alves Júnior pela agradável convivência do dia a dia.

Aos farmacêuticos Luiz Humberto de Almeida Júnior e Ricardo Francisco Pereira Argentin pelo prestimoso auxílio durante o processamento fitoquímico da espécie vegetal em estudo, bem como pelo entusiasmo sempre apresentado.

A Profa. Dra M. Carmo E. do Amaral e Prof. Dr. Volker Bittrich, botânicos do Instituto de Biologia / UNICAMP, pela coleta e identificação botânica da espécie vegetal.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Pulz Araújo pela compreensão e auxílio nos momentos necessários.

Aos colegas do CPQBA / UNICAMP pela convivência tão agradável e pela amizade a mim dedicada.

A Direção, funcionários e professores do Curso de Farmácia da Universidade São Francisco, pela acolhida e amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, que de alguma forma colaboraram para obtenção deste título.

Ao CPQBA pelo oferecimento de sua infra-estrutura o que proporcionou a plena execução deste trabalho.

A FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos os amigos que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho.

Os que conquistam são os que acreditam

que podem conquistar!

(Virgílio)

“....já vi cavaleiros de armadura entrarem em pânico a primeira vista da batalha, vi um humilde escudeiro desarmado arrancar uma lança de seu próprio corpo para defender um cavalo agonizante. A nobreza não é um direito inato, ela é definida pelos atos da pessoa.”

(Kevin Costner, como Robin Wood,
em Robin Wood, o príncipe dos ladrões).

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	05
CAPÍTULO 1: Introdução Geral	09
1. Dados Epidemiológicos.....	10
2. O Desenvolvimento Tumoral.....	14
2.1. O Desenvolvimento Tumoral e o ciclo celular.....	15
2.2. Desenvolvimento Tumoral e a Metástase.....	17
2.3. Desenvolvimento Tumoral e o Processamento Angiogênico.....	19
2.4. Desenvolvimento Tumoral e a Ciclooxigenase (COX)	21
2.5. Desenvolvimento Tumoral e o Óxido Nítrico (NO)	22
2.6. Desenvolvimento Tumoral e a Apoptose.....	24
3. Estratégias de Tratamento.....	25
3.1. Perspectivas Futuras.....	28

4. Pesquisa e Desenvolvimento de Agentes Antineoplásicos.....	33
5. Contribuição das Espécies Vegetais na Obtenção de Drogas Anticâncer.....	37
6. A espécie vegetal <i>Gaylussacia brasiliensis</i> (Spreng.) Meisn.	39

CAPÍTULO 2: Antiproliferative activity, isolation and identification of <i>Gaylussacia brasiliensis</i> (Spreng.) Meisn. (Ericaceae) active compound.....	42
---	----

CAPÍTULO 3: Triperpene isolated from <i>Gaylussacia brasiliensis</i> (Spreng.) Meisn. (Ericaceae): the correlationship between its antiproliferative activity and COX inhibition	57
--	----

CAPÍTULO 4: Triperpene isolated from <i>Gaylussacia brasiliensis</i> (Spreng.) Meisn. (Ericaceae): antiproliferative activity and its action mechanism.....	82
---	----

CONCLUSÃO GERAL.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
APÊNDICE 1: Processamento fitoquímico da espécie vegetal <i>Gaylussacia</i> <i>brasiliensis</i>	129

Lista de Tabelas

Capítulo 2:

Table 1: Efficacies of crude dichlorometanic extract (CHD), fraction C (FC), isolated compound from <i>Gaylussacia brasiliensis</i> (Spreng.) Meisn. (Compound 1) and positive controls (doxorubicin (DOX) and tamoxifen (TAM)) against human tumoral cell lines.....	056
--	-----

Capítulo 3:

Table 1: Efficacies of crude dichloromethanic extract (CHD) and the isolated compound from <i>Gaylussacia brasiliensis</i> (Spreng.) Meisn. (Compound 1) as well as positive controls doxorubicin (DOX) and indomethacin (IND) against human tumoral cell lines.....	077
---	-----

Table 2: Efficacy of crude dichloromethanic extract (CHD) from <i>Gaylussacia brasiliensis</i> (Spreng.) Meisn. over the synthesis of prostaglandin E ₂ in the gastric mucosa of treated rats, with and without previous administration of indomethacin.....	078
--	-----

Table 3: Efficacies of Compound 1 isolated from <i>Gaylussacia brasiliensis</i> (Spreng.) Meisn. and indomethacin (250 µg/mL) over the synthesis of prostaglandin E ₂ in human cancer HT-29 cell line.....	079
--	-----

Lista de Figuras

Capítulo 3:

Figure 1: Molecular structure of isolated Compound 1 (2 β , 3 β , hydroxy-Urs-12-ene-28-oic acid) from *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.....080

Figure 2: Effect of oral administration of crude dichloromethanic extract (CHD, 1000 mg/kg, po) from *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. and indomethacin (10 mg/kg, po) on carrageenin induced paw edema in rats. ANOVA: 30min: $F_{(2,11)} = 1,16$ $p > 0,05$; 1h: $F_{(2,11)} = 3,84$ $p > 0,05$; 2h: $F_{(2,11)} = 20,24$ $p < 0,001$; 3h: $F_{(2,11)} = 13,08$ $p < 0,01$; 4h: $F_{(2,11)} = 20,89$ $p < 0,01$; 5 h: $F_{(2,10)} = 17,96$ $p < 0,001$. Duncan's test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$081

Capítulo 4:

Figure 1. Antiproliferative activity of triterpene active compound and 5-fluorouracil (5-FU) at 25 μ g/mL over the growth of human ovary cancer cell line OVCAR-03, throughout a 120-hour exposure.....100

Figure 2. Cytochemical analysis at optical microscopy of OVCAR-03 cells were stained by toluidine blue after 48 hours of the following treatment: A, B: non-treated cells; C to I: cells exposed to increasing concentrations of triterpene active compound: C (2,5 μ g/mL); D, E (25 μ g/mL); F,G (50 μ g/mL) H, I (250 μ g/mL). Bar Scale: A: 40 μ m and B to I: 16 μ m. (*: cytoplasmatic vacuolization; head of arrow: multinucleation; arrow: nuclear fragmentation; double arrow: cellular fragmentation).....101

Resumo

Resumo

Gaylussacia brasiliensis (Spreng.) Meisn. (Ericaceae), popularmente conhecida como "camarinha", é usada na medicina popular brasileira no tratamento de processos inflamatórios. Os objetivos deste trabalho foram: (1) avaliar a atividade antitumoral de extratos brutos obtidos desta espécie vegetal em modelo "*in vitro*" de cultura de células tumorais humanas; (2) determinar as frações ativas farmacologicamente nos modelos de cultura de células tumorais humanas e isolar e caracterizar quimicamente o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(eis) por esta atividade; (3) avaliar a correlação entre o mecanismo responsável pela atividade antitumoral do princípio ativo isolado de *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. e a inibição da enzima ciclooxigenase em modelos "*in vitro*" e "*in vivo*" e, (4) avaliar o mecanismo responsável pela atividade antitumoral do princípio ativo isolados de *Gaylussacia brasiliensis* Meiss. em modelo "*in vitro*". A atividade antiproliferativa do extrato bruto diclorometânico (EBD) foi avaliada no ensaio da

sulforrodamina B em quatro concentrações (250, 25, 2.5, 0.25 µg/mL), após 48 horas de incubação. EBD inibiu o crescimento de todas as linhagens celulares, de forma concentração-dependente, com melhor atividade citocida sobre a linhagem celular NCI-ADR. Então, EBD foi pré-purificado em coluna cromatográfica seca em silica-gel fornecendo 5 frações. Dentre estas, a fração C (FC) foi a mais ativa, inibindo todas as células na concentração de 25µg/mL. FC foi fracionada em silica-gel com uma mistura de hexano-acetato de etila, originando o composto puro MAA-266. Este composto foi identificado com base em experimentos 2D-NMR como um triterpeno (ácido 2β, 3β dihidroxi-urs-12-ene-28-oic). MAA-266 apresentou atividade antiproliferativa concentração-dependente e seletividade para as linhagens celulares 786-0 e MCF-7; o menor valor de IC₅₀ foi de 6 µg/mL para a linhagem celular NCI-ADR. Vários trabalhos têm demonstrado a participação do ácido acetilsalicílico na redução dos riscos de câncer de cólon intestinal e estudos *in vitro* e *in vivo* tentam avaliar o mecanismo de ação antiproliferativo dos inibidores específicos da COX-2, provavelmente relacionado à indução da apoptose celular e o bloqueio da produção de PGE₂. A avaliação de uma ação inibitória de EBD sobre a síntese da PGE₂ em mucosa gástrica de ratos e de MAA-266 sobre a síntese da PGE₂ em célula tumoral humana HT-29, sugeriu que o mecanismo de ação antiproliferativo poderia envolver a biossíntese dos eicosanóides. Por outro lado, foram analisadas outras hipóteses a fim de evidenciarmos qual o mecanismo de ação responsável pela atividade antiproliferativa do composto MAA-266 obtido de *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn., como possíveis ações no DNA e na indução da apoptose. Assim, investigamos se a atividade antiproliferativa de MAA-266 era dependente do tempo de exposição da célula ao mesmo, inferindo que a citotoxicidade de um fármaco por interferência com o metabolismo dos ácidos nucleicos fosse um processo lento. Quando a célula tumoral humana OVCAR-03 foi exposta, em diferentes períodos de tempo, ao

composto MAA-266, não foi demonstrado um incremento do efeito antiproliferativo dependente do tempo de exposição, o que pode sugerir que MAA-266 não deva interferir em rotas metabólicas das bases púricas e pirimidínicas, funcionando como um antimetabólito. Além disso, a estrutura química do composto MAA-266 não apresenta similaridade com os metabólitos endógenos. Para investigar a hipótese de que o mecanismo de ação antiproliferativo do composto MAA-266 envolvesse a intercalação nos ácidos nucléicos, realizados o ensaio denominado “Teste do DNA-methylgreen”. Os resultados obtidos demonstraram que o composto MAA-266 foi inativo, enquanto que a doxorubicina foi capaz de reduzir a absorbância em 48%, sugerindo que o mecanismo de ação antiproliferativo de MAA-266 não deva envolver a intercalação do DNA. Finalmente, o efeito pró-apoptótico de MAA-266 foi avaliado através da análise morfológica de células da linhagem OVCAR-03, em microscopia ótica e eletrônica e varredura, expostas a diferentes concentrações deste composto (250, 50, 25 e 2,5 µg/mL), por 48 horas. A análise microscópica ótica revelou fragmentação nuclear, vacuolização citoplasmática, multinucleação e células gigantes. Já na microscopia eletrônica de varredura foi observado formação de vesículas na membrana celular com redução do volume da mesma, características estas associadas ao perfil apoptótico. A correlação entre os achados morfológicos e o mecanismo antiproliferativo está atualmente sendo investigado através do teste da anexina V, assim como o isolamento de outros compostos ativos presentes nesta espécie vegetal.

Abstract

Abstract

Gaylussacia brasiliensis (Spreng.) Meisn.(Ericaceae), popularly known as "camarinha", is used in Brazilian folk medicine for treatment of several inflammatory processes and as healing agent. The first scope of this work was to evaluate the antiproliferative activity of the crude dichloromethanic extract (CHD) obtained from *G. brasiliensis* and to identify the active compound(s) responsible for this activity. CHD was evaluated on sulforhodamine B antiproliferative assay in four-level concentration (250, 25; 2.5; 0.25 $\mu\text{g/mL}$) for 48 hours incubation. CHD showed a concentration-dependent inhibition on all cell lines, but had better cytotoxic activity for NCI-ADR cell line. Therefore, CHD was submitted to column chromatography on silica-gel providing fractions that revealed activity on the antiproliferative assay employed. CHD was pre-purified by dry column chromatography over silica-gel affording

five fractions. Among these, fraction C (FC) was the most active inhibiting all cells line at 25µg/mL. FC was further fractionated over silica-gel with hexane-ethyl acetate mixtures affording pure Compound 1. This compound was identified on basis of 2D-NMR experiments. Compound 1 showed concentration-dependent activity and selectivity for 786-0 and MCF-7 cancer cell lines; the lowest IC₅₀ was for NCI-ADR line with 6 µg/mL. Based on experimental evidence that inhibition of COX 2 causes tumor regression, the second scope of this work was to evaluate the correlationship between CHD and Compound 1's antiproliferative activity and COX inhibition. The CHD *in vivo* anti-inflammatory activity was analyzed through the antiedematogenic model induced by carrageenin in rats. CHD (1000 mg/kg, po) inhibited paw edema and its maximum inhibitory effect (44%) was obtained after 5h of the carrageenin injection. Indomethacin (10 mg/kg, po) started to reduce the paw edema on the second hour after the edema induction and a maximum inhibitory effect (64%) was obtained after 4h of the injection. The systemic effect of CHD (500 mg/kg, po) over the synthesis of PGE₂ in the gastric mucosa of rats, with or without previous indomethacin (5 mg/kg, sc) treatment, was measured. CHD inhibited 50% of its PGE₂ synthesis, which was potentiated (82%) of indomethacin previous administration. To evaluate the same pharmacological activity of Compound 1 (250µg/mL), the amount of PGE₂ in human cancer cell lines (HT-29 - colon) was measured, for 48 h. Both Compound 1 and indomethacin reduced the synthesis of PGE₂ *in vitro*, at 64 and 57%, respectively. Overall, experimental data suggest that the Compound 1 antitumor mechanism is related to COX inhibition. The third scope of this work was to evaluate the antiproliferative activity mechanism of Compound 1 (2β, 3β dihydroxy-urs-12-ene-28-oic acid) isolated from *G. brasiliensis* (Spreng.) Meisn. (Ericaceae), employing the sulforhodamine B antiproliferative assay using OVCAR-03 (human ovary cancer) cell line. Its possible pharmacological

mechanisms of action were investigated including DNA synthesis, cell division interference and its capacity to induce *in vitro* cellular transformation. The DNA-MG bioassay revealed no signs of DNA intercalation. The time-independent (exposure from 4 to 120 hours) antiproliferative activity over OVCAR-03 cell line exposed to this compound together with the morphological analysis revealed an apoptotic phenotype. These results suggest that the triterpene's both cytotoxicity and ability to induce cellular transformation lead to apoptosis. The correlation between the morphological findings with changes in the optical properties of the cultures is currently being carried out using the annexin V test as well as a bioassay guided isolation of other active components present in this plant.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL

Introdução Geral

1. Dados Epidemiológicos

Atualmente, mais de cem tipos de câncer são conhecidos, diferenciados pela etiologia, história natural, terapêutica e prognóstico. Apesar da grande evolução no conhecimento sobre o desenvolvimento tumoral, pouco sucesso foi obtido no desenvolvimento de técnicas eficientes para sua prevenção e cura (VERDECCHIA et al., 2001; VERWEIJ e JONGE, 2000).

A distribuição das taxas de incidência e mortalidade de tumores malignos tem sido, em muitos países, de grande importância para o estabelecimento de diretrizes políticas públicas e o planejamento de ações de prevenção e controle do câncer e de assistência paliativa (PARKIN et

al., 1997). Na maioria dos países desenvolvidos o câncer se constitui na segunda causa de morte da população, superado somente pelas doenças do sistema cardiovascular. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) surgem a cada ano nove milhões de novos casos e cinco milhões de pessoas vão a óbito em decorrência do câncer. No entanto esses valores são subestimados pelas dificuldades de registro dessa patologia em muitos países. O aumento da incidência de câncer é, principalmente, consequência do aumento da expectativa de vida da população, pois o aparecimento dessa patologia é favorecido com o envelhecimento do organismo (CAIRNS, 1981; OSBORNE et al., 1997).

Dados epidemiológicos brasileiros evidenciaram que nos homens o câncer de pulmão está entre os mais freqüentes, tendo sua incidência aumentada nos últimos anos e estando relacionado ao hábito de fumar. Os carcinomas gastrointestinais, como os de colorretal e de estômago também apresentam grandes índices de incidência entre os homens. Já nas mulheres, o câncer mais comum é o de mama, mais freqüente que o de colo uterino (COELHO et al., 1998).

O câncer de pulmão continua a ser o câncer mais incidente no mundo (12,3% de todos os casos novos de câncer) e também é a causa de morte por câncer mais freqüente (FERLAY, 1998; PISANI, 1999; PARKIN et al., 2001). No Brasil, o câncer de pulmão é a primeira causa de morte por câncer em homens e a segunda em mulheres. Apesar da alta efetividade da prevenção primária, através da prevenção e do controle do tabagismo, a sua incidência também permanece elevada. O Ministério da Saúde, por intermédio do Instituto Nacional do Câncer (INCA), dentre as ações voltadas para vigilância de fatores de risco de câncer, desenvolveu em 2001 uma pesquisa sobre tabagismo no município do Rio de Janeiro, quando foi observado uma prevalência de fumantes de cerca de 23% e a idade média de iniciação foi mais precoce em mulheres, o que

ênfatiza a importância de reforçar ações de combate ao tabagismo, principalmente entre mulheres e jovens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Mundialmente, o câncer de cólon e reto é a quarta neoplasia mais incidente em ambos os sexos. A sua mortalidade é considerada baixa, refletindo um prognóstico relativamente bom. A sobrevida global em cinco anos é de 40-50% e não são observadas diferenças muito grandes entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (PARKIN et al., 2001). No Brasil, este câncer figura entre as cinco primeiras causas de morte por câncer, tendo-se observado um aumento consistente de suas taxas de mortalidade ao longo das últimas décadas. Estudos epidemiológicos desenvolvidos, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, tem apontado fortemente para um alto risco de câncer de cólon e reto em pessoas sob dieta alimentar pobre em vegetais e fibras, e rica em carne vermelha. Esses mesmos estudos sugerem que a atividade física regular atuaria como fator de proteção, talvez através da prevenção da obesidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Já o câncer de estômago permanece como a segunda causa de óbito mais ocorrente no mundo (FERLAY, 1998; PARKIN, 1999); contudo, tem sido observado uma queda nas suas taxas de mortalidade e incidência. No Brasil, também se constata uma diminuição temporal das taxas de mortalidade por este tumor. O mesmo decréscimo parece também estar ocorrendo com relação à incidência, possivelmente refletindo mudança de hábitos alimentares da população e de facilidades para a conservação dos alimentos, ou uma diminuição da prevalência do possível agente causal, *Helicobacter pylori*. Vale ressaltar que a possível melhoria da qualidade do diagnóstico do câncer primário de estômago, com o resultante aumento de sua identificação, pode

ter levado à subestimação da magnitude do declínio temporal observado nas taxas de mortalidade e incidência nas últimas décadas (PISANI, 1999).

No mundo, o câncer de mama, entre as mulheres, apresenta-se como a segunda neoplasia maligna mais incidente, assim como uma causa relevante de mortes por câncer (PARKIN et al., 2001). Não existem medidas práticas específicas de prevenção primária do câncer de mama aplicáveis à população, embora estudos observacionais tenham sugerido que a prevenção do tabagismo, alcoolismo, obesidade e sedentarismo reduzam o risco de câncer de mama. Avanços tecnológicos têm sido direcionados ao diagnóstico e tratamento precoces, no sentido de melhorar a sobrevida das pacientes. Os estudos internacionais têm apresentado um aumento global na sobrevida das mulheres com câncer de mama, principalmente para os casos em que esta doença se encontra em estágios clínicos iniciais. Segundo Parkin, na Europa, a sobrevida cumulativa é de 91% após um ano e de 65% após cinco anos; já nos Estados Unidos, a sobrevida é de 96,8%, no primeiro ano (PARKIN et al., 2001).

Ao contrário do que ocorre nos países mais desenvolvidos, as taxas de mortalidade por câncer do colo do útero continuam moderadamente altas no Brasil e, do ponto de vista temporal, vem aumentando. O câncer do colo do útero ainda é relevante, em termos de casos novos e de morte por câncer no mundo, principalmente por conta das estatísticas referentes aos países em desenvolvimento, sendo 80% dos casos novos ocorrem nestas localidades (PARKIN, 2001). Tem sido observado, entretanto, que, mesmo sendo uma causa relevante de morte no Brasil e em outros países em desenvolvimento, a magnitude das taxas de mortalidade são bem menores que as de incidência (PARKIN, 2001). A infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) tem sido descrita como fator necessário para a ocorrência do câncer do colo do útero. Entre os co-fatores

que se associam a um elevado risco de desenvolver este câncer se encontram idade prematura de início da vida sexual, multiplicidade de parceiros, co-infecção pelo HIV e o tabagismo. Portanto, a prevenção primária "radical" está focalizada na mudança do comportamento sexual e na erradicação do tabagismo. Para a prevenção primária do câncer do colo do útero, assim como para a prevenção secundária de seus estádios iniciais, a estratégia atualmente reconhecida é a detecção precoce por meio do exame preventivo de Papanicolaou (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

De forma geral, o desenvolvimento do processo tumoral vai depender da maior ou menor exposição da população aos agentes carcinogênicos. Portanto, o aumento da incidência do câncer é, praticamente, consequência do aumento da expectativa de vida da população, pois o aparecimento dessa patologia é favorecido com o envelhecimento do organismo associado a exposição a agentes carcinogênicos (VERWEIJ e JONGE, 2000).

2. O Desenvolvimento Tumoral

A definição de neoplasia mais aceita foi elaborada em 1930 pelo patologista inglês Rupert Willis (COTRAN et al., 1999) que a define como uma massa tumoral anormal de tecido, cujo crescimento excede e não está coordenado ao crescimento dos tecidos normais e que persiste mesmo cessada a causa que a provocou. Desta forma, a célula cancerígena caracteriza-se pela perda de função em consequência da ausência de diferenciação, proliferação incontrolada, invasividade dos tecidos adjacentes e metástase. A origem dessa célula é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela

apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos (BRENTANI et al., 1998; SIMPSON et al., 1998).

Essas alterações gênicas podem ser produzidas por diversos mecanismos, tais como: (1) inativação dos genes supressores de tumor (DPC4, p15, NF-1), (2) ativação de oncogenes (myc, myb, src, ras, fes, jun, fos), (3) inativação dos genes responsáveis pela apoptose (p53, RB) e (4) mutações por agentes químicos, físicos e biológicos (SIEBER, HEINIMANN e TOMLINSON, 2003).

2.1. O Desenvolvimento Tumoral e Ciclo Celular

Organismos eucarióticos dependem de um intrincado e evolutivamente conservado ciclo celular de controle da divisão de suas células. O ciclo de eventos que leva a divisão celular é regulado por famílias de proteínas, estando, portanto, sob controle genético (SWANTON, 2004).

A proliferação celular e a morte celular estão mantidas em um equilíbrio em tecidos normais e saudáveis. Na hiperplasia há um aumento tecidual, com manutenção de estrutura e função normais, enquanto que na displasia, as células diferem das normais em forma e tamanho do núcleo. Os ciclos de crescimento de algumas dessas células são anormais e células em processos de divisão aparecem em porcentagem maior da população total celular. Já no carcinoma *in situ* as alterações celulares começam a ser mais pronunciadas, sendo que as células apresentam-se como células tumorais, com características de perda da função, proliferação incontrolada, invasão e metástase (RANG, RITTER e DALE, 2004).

Com relação ao ciclo celular, as células quiescentes estão na fase G0, sendo que durante este período não ocorre divisão, mas pode ocorrer diferenciação através de processos de maturação, com início da função biológica como um tipo celular maduro. Entretanto, quando as células recebem sinais externos são estimuladas a voltar ao ciclo celular, ingressando na fase G1. Durante esta fase as células sintetizam componentes celulares, assim como o RNA e proteínas, preparando-se para a divisão celular. Na sequência, as células promovem duplicação do seu DNA, na fase S. Durante a próxima fase, denominada G2, as células continuam a sintetizar proteínas e RNA. Finalmente as células ingressam na fase M, durante a qual cada célula-filha recebe o genoma celular, assim como todos os constituintes necessários para sua função e maturação (HARTWELL e KASTAN, 1994).

Durante este ciclo celular existem “pontos de restrição”, sendo que a proteína codificada pelo gene p53 constitui um destes pontos. Assim, quando uma célula entra na fase S e seu DNA apresenta-se danificado, o ciclo é interrompido a fim de permitir o reparo do mesmo. Caso esse dano seja severo ou irreversível e não possa ser corrigido, a célula é encaminhada para o processo de apoptose (COOPER, 2003).

Mutações no gene p53 ou outros genes regulatórios, que codificam proteínas que corrigem danos no DNA podem alterar o ciclo celular, de tal forma que estas alterações podem levar a célula a prosseguir no ciclo com DNA defeituoso, o que contribui para anormalidades cromossômicas, levando à futura desregulação do ciclo celular, como proliferação excessiva e apoptose diminuída, que é basicamente a situação no câncer (PARDEE, 1974).

Desta forma, falhas no “ponto de restrição” estão associadas ao processo tumoral, sendo que a progressão da célula no ciclo celular é regulada por duas famílias de ciclinas, a família da ciclina tipo D (D1, D2 e D3) e a família da ciclina tipo E (E1 e E2). A atividade de ambas ciclinas tipo D e E é requerida para regular a progressão celular da fase G1 para a fase S, o que é mediado, parcialmente, por fosforilação coordenada do substrato de retinoblastoma (Rb). Desta forma, a regulação da atividade do sistema ciclina/cdks (ciclina dependente da quinase) é extremamente importante para a função do “ponto de restrição” (SWANTON, 2004).

Fatores de crescimento e sinais mitogênicos estimulam a expressão da família das ciclinas D, promovendo o ingresso na célula no ciclo celular. A ciclina D constitui o primeiro integrador dos sinais que iniciam a progressão da célula da fase G1. Os caminhos sinalizadores que controlam a transcrição, translação e localização nuclear da ciclina D constituem alvos terapêuticos para inibir a proliferação celular (TETSU e McCORMICK, 1999). Do ponto de vista clínico, a expressão excessiva da ciclina E em câncer de mama está associada com baixa sobrevida dos pacientes (PORTER et al., 1997).

2.2. Desenvolvimento Tumoral e Metástase

Para muitos tipos celulares tumorais, a habilidade de sofrer metástase configura, clinicamente, uma doença incurável. Apesar da importância do processo metastático, o conhecimento, no âmbito bioquímico e molecular, das etapas envolvidas ainda é incompleto (FIDLER, 2003). Entretanto, é sabido que este processo envolve complexas funções celulares, muitas das quais podem ser iniciadas por múltiplos e redundantes estímulos (STEEG, 2003).

Para que a célula neoplásica possa adquirir habilidade invasiva são necessárias mudanças na adesão celular, promoção de motilidade e proteólise da matriz extracelular (CHAMBERS, GROOM e MacDONALD, 2002). Assim, quando ocorre a invasão dos tecidos circunvizinhos, células metastáticas penetram no tecido conectivo da lâmina basal e estroma e produzem alterações das funções orgânicas. Para isso as células empregam proteases, que degradam a matriz extracelular (colágeno e tecido conectivo), podendo invadir os tecidos e alcançar a circulação. A invasão e metástase são processos que letalmente espalham células pelo organismo. Inicialmente as células destacam-se a partir do sítio primário, digerem a matriz extracelular, podendo penetrar na membrana basal próxima aos vasos sanguíneos. As células estão livres na circulação e eventualmente podem alcançar um capilar sanguíneo e então expressar moléculas de adesão, promovendo sua aderência à parede celular, gerando um tumor secundário (CHAMBERS et al., 2001).

O processo metastático é reconhecidamente um processo ineficaz, já que poucas das dez mil células que escapam do tumor primário sobrevivem para colonizar um tumor secundário (WEISS, 1990). Dentre as etapas cruciais envolvidas na formação do tumor secundário podemos destacar a adesão celular, a qual é considerada vital para a migração das células tumorais. Foram descritos dois tipos de adesão, ou seja, a adesão célula – célula e a adesão célula – matriz extracelular. Se uma célula não aderir à outra, ela pode tornar-se mais invasiva e migrar através da matriz extracelular; entretanto, se uma célula não aderir à matriz extracelular, ela pode destacar-se do tecido primário. Por outro lado, se uma célula normal falhar em aderir à matriz extracelular ou aderir à uma matriz extracelular errônea, ela morre através da apoptose (SUGARBAKER, 1993).

O padrão de metastáse pode ser explicado, em parte, pela arquitetura do sistema circulatório (PAGET, 1989). Tumores de pele e muitos outros tecidos freqüentemente colonizam o pulmão. Em contraste, devido a circulação porta-hepática, o fígado é o sítio primário de metastáse colorretal. Entretanto, a circulação não é o único fator que determina a colonização do tumor secundário, já que existe um tropismo de algumas células metastáticas por determinados tecidos, devido à expressão de moléculas de adesão específicas. Um exemplo é a colonização do tecido ósseo por células neoplásicas provenientes de tumor prostático, devido à afinidade entre estes tecidos (CHAMBERS, GROOM e MacDONALD, 2002).

2.3. Desenvolvimento Tumoral e Processos Angiogênicos

A angiogênese é o crescimento de novos capilares sanguíneos. Constitui uma etapa essencial no desenvolvimento tecidual pré e pós-natal e também participa na cicatrização, reprodução, doenças inflamatórias e degenerativas, distúrbios metabólicos e neoplasia. A angiogênese associada aos tumores sólidos é um processo em que novos capilares são formados no estroma tumoral a partir de células endoteliais do hospedeiro. Isto permite o crescimento do tumor além de 2-3 mm, através da perfusão de oxigênio e nutrientes e remoção de metabólitos tóxicos, ao invés da simples difusão no espaço extracelular que mantém o tumor restrito e com uma pequena população celular (FOLKMAN, 1971).

Evidências experimentais demonstram que a angiogênese também contribui com o processo metastático, pois à medida em que há expansão da vascularização, maior é a superfície para o escape de células tumorais na circulação, o que também pode ser facilitado pela imaturidade dos novos vasos formados. Desde a demonstração pioneira por Folkman, em 1971, o crescimento

tumoral é considerado angiogênese-dependente, a partir do isolamento do “fator de angiogênese do tumor”. Desde então, numerosos fatores angiogênicos foram identificados e os mais freqüentemente encontrados em tumores são o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Estes são liberados pelas células tumorais, células endoteliais ou pela matriz extracelular. A formação de novos vasos sangüíneos requer a inibição dos fatores inibidores da angiogênese, tais como: trombospondina-1, fator plaquetário 4, inibidores teciduais das metaloproteinases, prolactina, angiostatina, fator de crescimento do fibroblasto (bFGF), fator transformador de crescimento β (TGF β) e interferon (FOX, GASPARINI e HARRIS, 2001).

O papel da angiogênese na progressão do tumor primário e sua associação com metástases hematogênicas e sobrevida tem sido extensamente estudado – principalmente no carcinoma de mama – com a maioria dos estudos publicados em tumores de pulmão, trato gastrointestinal e genitourinário demonstrando associação estatisticamente significativa entre a intensa neovascularização e pior prognóstico (RANG, RITTER e DALE, 2004).

Drogas antiangiogênicas podem bloquear a formação de novos vasos e conseqüentemente destruir a massa tumoral, sendo que este tipo de droga já está sendo utilizado em ensaios clínicos. Exemplos destas novas drogas compreendem angiostatina, inibidores da protease (batimistar, marimistat), fator plaquetário 4, anticorpos aos fatores angiogênicos específicos, antagonista do receptor dos fatores angiogênicos específicos, Cm101, tetraciclinas, endostatina, talidomida, interferons, TNP-470 e inibidores da quinase (suramina, genesteina). Além disso, novas gerações de drogas antiangiogênicas potentes tais como a endostatina e angiostatina podem ser utilizadas

na regressão tumoral. Esta abordagem parece apresentar melhores resultados quando administrada precocemente no tratamento adjuvante e, preferencialmente, associada à terapêutica citotóxica convencional, necessitando ser administrada a longo prazo (meses ou anos) porque a regressão do leito vascular é um processo mais lento do que a lise celular tumoral. (HU e KAVANAGH, 2003).

2.4. Desenvolvimento Tumoral e Ciclooxygenase (COX)

A ciclooxygenase (COX), enzima que catalisa a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas, está envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos, sendo duas isoformas conhecidas. A COX-1 é expressada pela maioria dos tecidos e produz prostaglandinas envolvidas na manutenção da mucosa gástrica, regulação do aporte sanguíneo renal e agregação plaquetária (DANNENBERG et al., 2001). A isoforma induzível, COX-2, é expressada tanto pelos tecidos inflamados como pelos tumorais sendo, portanto, estimulada por fatores pró-inflamatórios e mutagênicos, tais como: fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (β -FGF) e citocinas (fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucinas 1 α e 1 β (DIAZ et al., 1998).

Acredita-se que as prostaglandinas participam de um amplo espectro de processos fisiológicos e patológicos: respostas reprodutivas, imunológicas, endócrinas, tumorigênicas, cardiovasculares (KLEIN et al., 2004) e ainda na citoproteção gástrica (EBERHART e DUBOIS, 1995). Com relação à citoproteção gástrica, os prostanóides PGE₁ e PGI₂ protegem a mucosa gástrica através de muitos mecanismos, tais como a redução da secreção gástrica e aumento da produção de

bicarbonato e muco. As prostaglandinas também aumentam o fluxo sanguíneo em mucosas (KATORI e MAJIMA, 1997). Fatores como estresse, uso crônico de antiinflamatórios e bebidas alcoólicas representam algumas das principais causas de úlceras gástricas (BAROCELLI et al., 1997).

Pesquisas recentes apontam a influência da COX-2 no câncer, participando dos processos de hiperproliferação, transformação celular, crescimento tumoral, invasão e metástase (DANNENBERG et al., 2001). Diversas prostaglandinas, tais como a PGE₂, regulam a produção de linfocinas, proliferação de células T e B, atividade citotóxica de células NK (*natural killers*) e secreção de TNF α e interleucina 10 (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). Foi demonstrada uma estreita correlação entre PGE₂ e sistemas de sinalização envolvendo receptores EGF. A PGE₂ promove a ativação das metaloproteinases MMP2 e MMP9, aumenta a expressão de TNF α , ativa o receptor EGF e aciona a sinalização mitogênica nas células neoplásicas do epitélio gástrico. Este fato também se repete nas células da mucosa gástrica de ratos submetidos a ensaios experimentais (GASPARINI et al., 2003).

A literatura revela fortes evidências de que a inibição da COX-2 induz regressão tumoral. Estudos farmacodinâmicos descreveram diversos mecanismos de ação para os efeitos antineoplásicos de drogas antiinflamatórias COX-2 seletivas: bloqueio da angiogênese, indução de apoptose, modulação das respostas imune e inflamatória, entre outros (MASFERRER et al., 2000; LIU et al., 2000; SJÖDAHL, 2001; GASPARINI et al., 2003).

2.5. Desenvolvimento Tumoral e Óxido Nítrico (NO)

Óxido nítrico (NO) é uma importante molécula sinalizadora em numerosos processos fisiológicos e condições patológicas, sendo produzida quando a enzima óxido nítrico sintase (NOS) cataliza a conversão de L-arginina a L-citrulina. Existem três isoformas de NOS, sendo que duas constitutivamente expressas pelo tecido endotelial e neuronal, que são responsáveis pela produção basal de NO, sendo dependentes de cálcio. Já a terceira isoforma, denominada NOS induzível, é cálcio-independente, não é expressa na maioria dos tecidos sob condições normais, mas pode ser estimulada por lipopolissacarídeos e várias citocinas (ABRAMSON et al., 2001).

Recentemente, o NO foi reportado por apresentar atividade antitumoral e também propriedades pró-tumorais, na dependência da concentração e do tempo de exposição, assim como do tipo de tecido (WINK et al., 1998). Baixas concentrações de NO podem estimular o crescimento celular e proteger vários tipos celulares do processo apoptótico, enquanto que altas concentrações podem inibir o crescimento celular e induzir à apoptose (KIM et al., 2002).

Aparentemente, a morte celular mediada por NO ocorre tanto por necrose como por apoptose (ALBINA et al., 1989; KRONCKE et al., 1997). Os efeitos pró-apoptóticos parecem estar mais relacionados a condições fisiopatológicas, quando grandes quantidades de NO são produzidas por síntese induzida de NO. Em contraste, a liberação contínua de NO pelo endotélio inibe a apoptose e pode contribuir para a função antiaterosclerótica do NO (DIMMELER e ZEIHNER, 1997). O NO pode afetar a expressão e a atividade de proteínas críticas no ciclo celular e, por sua vez, também ser alvo das mutações do DNA celular. A exposição das células aos doadores de NO pode

resultar em supra-regulação do gene supressor de tumor, o p53, possivelmente em resposta ao dano do DNA mediado pelo NO (WINK et al., 1998).

O desenvolvimento tumoral, sua vascularização e seu potencial invasivo estão relacionados a reduzidas concentrações de NO produzidas pelas células tumorais (JENKINS et al., 1995). Em lesões pré-malignas e em tumores intestinais, a síntese de NO está reduzida ou ausente, ao passo que altos níveis de NO foram encontrados em tumores ginecológicos (CHHATWAL et al., 1996). Correlação inversa entre o potencial metastático de tumores e a produção de NO foi observada por muitos pesquisadores (JENKINS et al., 1995; HAJRI et al., 1998).

Em estudo recente, Gasparini e colaboradores (2003) descreveram uma possível interação entre a COX e o óxido nítrico, considerando-se que um aumento no ânion superóxido pela enzima óxido nítrico sintase é um potencial ativador da COX. Um carreador biológico de NO, o qual serve como um fonte do mesmo, o S-nitrosoglutitiona (GSNO), aumenta a produção de PGE₂ e induz a expressão de COX-1 e COX-2, dependendo do tempo de exposição das células assim como da concentração do mesmo. Por outro lado, altas concentrações de GSNO inibem o crescimento tumoral e induzem a morte celular, provavelmente por apoptose (LUI, CHAN e MAHENDRAN, 2003).

2.6. Desenvolvimento Tumoral e Apoptose

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo fisiológico o qual ocorre durante o desenvolvimento embrionário assim como na manutenção da homeostase tecidual (HU e KAVANAGH, 2003). O processo apoptótico é um processo biológico geneticamente regulado.

As células apoptóticas são caracterizadas pela perda de volume, condensação nuclear, agregação da cromatina e quebra internucleossomal do DNA. Essas alterações celulares ocorrem após uma cascata de sinalização celular e eventos mediados pelas caspases, enzimas que regulam a liberação de proteínas apoptóticas e antiapoptóticas (JAATTLEA, 2002).

Através de um mecanismo ainda desconhecido, o estímulo apoptótico ativa a expressão de "genes letais" que induzirão a síntese e ativação de uma endonuclease Ca^{+2} e Mg^{+2} dependente e de uma transglutaminase. A endonuclease causará a fragmentação internucleossômica do DNA, levando ao clássico "padrão em escada" na eletroforese em gel de agarose. A transglutaminase aumenta as ligações cruzadas das proteínas celulares, aumentando a estabilidade da membrana plasmática, limitando assim o vazamento de constituintes citoplasmáticos durante a fragmentação celular em corpos apoptóticos (WILLINGHAM, 1999).

3. Estratégias de Tratamento

Com relação às estratégias terapêuticas, de uma forma geral, podem ser empregadas a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. De acordo com o tipo e estágio da moléstia, o sucesso do tratamento geralmente é conseguido com a associação desses três tipos de tratamento. No entanto, a quimioterapia é o tratamento que oferece as menores chances de cura, pois, em consequência da baixa seletividade dos antineoplásicos, o aparecimento de efeitos colaterais tóxicos é muito freqüente. Outro problema da quimioterapia é o aparecimento de resistência aos medicamentos, que conduz o tratamento para o uso combinado de drogas aumentando a probabilidade efeitos colaterais tóxicos (CALABRESI e CHABNER, 1996).

O fator inicial e decisivo na escolha o tratamento é o diagnóstico histológico da doença. Cada tipo patológico tem história natural a resposta à quimioterapia particulares. Por exemplo, com relação ao câncer de pulmão, os carcinomas (pequenas células) são altamente sensíveis aos quimioterápicos, ao passo que carcinomas epidermóides geralmente são refratários à quimioterapia. Assim o tratamento empírico deve ser proscrito e o diagnóstico histológico sempre exigido (RANG, RITTER e DALE, 2004).

O segundo fator determinante da terapia é o estadiamento da doença, que permite ao oncologista clínico decidir se o tumor deverá ser tratado com medidas locais, como a cirurgia e radioterapia, ou se será necessário tratamento sistêmico com quimioterápicos. Foram criadas convenções internacionais para uniformizar o estadiamento de diferentes neoplasias, denominada sistema TNM (T: tumor; N: nódulo e M: metástase). A determinação do estadiamento inicial da neoplasia também será útil para definir, posteriormente, a resposta ao tratamento (CALABRESI e CHABNER, 1996).

Além disso, demais fatores prognósticos específicos a cada caso devem ser estabelecidos através de estudos citogenéticos, bioquímicos, imunológicos e moleculares. Por exemplo, em pacientes com carcinoma de mama estágio I (tumor menor que dois centímetros com linfonodos axilares negativos), certos fatores adversos como a ausência de receptores estrogênicos e alta expressão de oncogene c-erb-2 / HER-2-new podem ser indicativos para realização de quimioterapia adjuvante (RANG e DALE, 2004).

Finalmente, a avaliação clínica geral do paciente, incluindo idade e doença concomitantes também é decisiva na determinação da estratégia de tratamento. Nesse sentido o conhecimento da

farmacologia clínica dos diferentes agentes antineoplásicos permite melhor julgar a relação risco x benefício da terapia para cada paciente específico (CALABRESI e CHABNER, 1996).

De posse destas informações (diagnóstico histológico, estadiamento da doença, estudos citogenéticos, bioquímicos, imunológicos e moleculares e avaliação clínica geral do paciente), o oncologista clínico deve determinar o objetivo do tratamento, se curativo ou paliativo, definindo o papel da quimioterapia. Desta forma, em caso de possibilidade de cura, podem ser prescritos agentes que envolvem alto grau de toxicidade e riscos, os quais não teriam sentido num tratamento paliativo (FUCHS e WANNMACHER, 1998).

A quimioterapia é referida como adjuvante quando realizada após tratamento local (cirurgia ou radioterapia) objetiva menos risco de recorrências sistêmicas da doença eliminando eventuais micro metástases não identificadas no diagnóstico. Esta estratégia tem sido largamente empregada em carcinoma de mama ou cólon de pacientes com doença localizada, nas que tem alto risco de recorrência (FUCHS e WANNMACHER, 1998).

Já a quimioterapia neo-adjuvante ou primária é a terapia realizada antes do tratamento local definitivo (cirúrgico ou radioterápico). Objetiva reduzir massa tumoral e a maior possibilidade de ressecção cirúrgica completa. Outras vantagens desta estratégia incluem: menor morbidade e seqüelas do ato cirúrgico, erradicação de micrometastases e fácil identificação da quimiosensibilidade do tumor. Esta estratégia tem sido empregada em tumores de cabeça e pescoço, câncer esofágico, carcinoma de pulmão (não pequenas células), os osteosarcomas de partes mole e carcinoma de mama local e avançado. Por outro lado, a quimioterapia de indução é

administrada em neoplasias avançadas, podendo ser paliativa, aumentar a sobrevida ou ser curativa (RANG, RITTER e DALE, 2004).

A avaliação da resposta ao tratamento pode ser classificada como completa, quando do desaparecimento de todos os sinais e sintomas por pelo menos um mês; parcial, quando é observada redução de pelo menos 50% das lesões e ausência de progressão da doença ou aparecimento de qualquer nova lesão; estável, quando da ausência de alterações em tamanho tumoral ou sinais e sintomas da doença e progressão tumoral, com aumento de pelo menos 25% do tumor ou surgimento de nova lesão (KATZUNG, 2003).

3.1. Perspectivas Futuras

Embora a terapia atual para o câncer dependa principalmente do uso de cirurgia, irradiação e quimioterapia, a evolução na compreensão da biologia da transformação maligna e das diferenças no controle da proliferação da célula normal e cancerosa proporcionaram a descoberta de novos alvos possíveis para o tratamento do câncer. É improvável que novas terapias venham a substituir totalmente as drogas existentes, uma vez que estas drogas tornaram-se mais eficazes e suas toxicidades, mais tratáveis e previsíveis, nos últimos anos. No entanto, uma combinação de drogas existentes, novas abordagens e a obtenção de um perfil molecular / genético de cada tumor fariam com que todo o paciente tivesse um tratamento individualizado e específico para o seu caso, aumentando a eficácia do tratamento e diminuindo a incidência de efeitos colaterais (EVAN, 2001).

Até recentemente, o tratamento medicamentoso do câncer baseava-se exclusivamente na utilização de drogas citotóxicas. Entretanto, atualmente diversas abordagens moleculares estão em fase de investigação, sendo que cerca de 200 novas drogas estão em fase III de estudo clínico. A maioria delas, baseadas nos progressos realizados no conhecimento da biologia da célula cancerosa, referem-se ao uso de alvos seletivos para atuação dos agentes antitumorais. Dentre as abordagens promissoras da terapia anticâncer podemos destacar as drogas que visam alteração da expressão gênica / terapia gênica, os inibidores da transdução de sinal, os inibidores da invasão do tumor e metástases, os inibidores de angiogênese, os agentes diferenciadores, os inibidores imunogênicos, os reversores de resistência induzida por drogas e as novas drogas citotóxicas e indutores de apoptose (NYGREN e LARSSON, 2003)

Um desafio significativo no campo da terapia antineoplásica envolve estratégias de manipulação gênica visam a restauração dos mecanismos protetores como p53; a inativação da expressão de oncogenes, o fornecimento de um gene para células malignas, tornando-as sensíveis às drogas, o fornecimento um gene às células hospedeiras sadias para protegê-las da quimioterapia e a marcação de células cancerosas com genes para torná-las imunogênicas. A identificação de alterações moleculares relacionadas ao câncer dirige parte da pesquisa atual para estratégias que visam a correção da alteração gênica expressa pelos diferentes tipos de neoplasias, através de manipulação genética (ARAJ, OGSTON e BEARD, 2001).

A utilização de oligonucleotídeos, pequenos segmentos sintéticos de DNA de filamento único que são complementares a uma porção do mRNA e que podem ligar-se à sua sequência correspondente no mRNA, permite o bloqueio da expressão de um oncogene. Desta forma, é possível bloquear a expressão de um oncogene que sofreu mutação, sem, contudo, atingir a

expressão do proto-oncogene, como foi mostrado para o oncogene Ras, abrindo a possibilidade para um tratamento totalmente ausente de efeitos colaterais. É importante mencionar, no entanto, que este tipo de tratamento exigiria um conhecimento bastante específico das alterações genéticas de cada paciente acometido de câncer, mas a simplificação dos métodos de sequenciamento está abrindo esta possibilidade para um futuro não muito distante (BRUMMELKAMP et al., 2003).

Dentre os inibidores da transdução de sinal incluem-se, os inibidores da ligação dos fatores de crescimento ao receptor. Quando fatores de crescimento, como por exemplo, EGF (fator de crescimento epidermal), ligam-se às proteínas de membrana chamadas Her-2, essas se dimerizam e enviam ao núcleo sinais pró-mitóticos. Esse mecanismo ocorre em células normais, mas uma diferença das células normais para as células malignas é que, na superfície das células tumorais, a proteína está presente em quantidades tão grandes, que as moléculas, mesmo sem fatores de crescimento, se unem em dímeros, de modo que a mitose ocorre constantemente. O ZD 1839 é uma nova molécula em estudo que tem por mecanismo de ação impedir que as células formem dímeros. Dessa forma, o processo de multiplicação das células tumorais é reduzido (TZA HAR et al., 1998). Baseado nesse mesmo raciocínio, há outros inibidores de RTKs, sendo testados com a finalidade de interferir nos mecanismos de transdução de sinal envolvidos na proliferação celular (NYGREN e LARSSON, 2003; PEGGS e MACKINNON, 2003).

A este grupo pertencem, também, os inibidores de Ras (proteína de ligação de guanina-nucleotídeos com atividade de GTPase) e vias por ela ativada. Esses inibidores bloqueiam a capacidade que tem os genes Ras mutantes de se tornarem células malignas. Nas células normais, a proteína Ras, uma vez sintetizada, migra para a membrana celular, à qual se fixa por uma espécie de “gancho molecular” (um grupo farnesil). Este grupo é adicionado à proteína pela

enzima farnesiltransferase. Recentemente, foram produzidos compostos que inibem esta enzima, como o RI 15777. Foi demonstrado, por testes *in vitro* e *in vivo* (Fase Clínica III), que esse composto reverte a transformação maligna em células cancerosas que contêm o oncogene ras, restaurando os padrões normais de crescimento, sem interferir na divisão celular das células normais (NYGREN e LARSSON, 2003).

Intervenções no sentido de mimetizar os inibidores da cdk têm sido estudadas. Triagem clínica de um fármaco que apresenta este mecanismo antitumoral, o falvopiridol, está sendo realizada. Já o modulador do ciclo celular, o UCN-01 apresenta um complexo mecanismo de ação, podendo promover e inibir a atividade cdk. Dados promissores provenientes de estudos de fase I e II destes agentes revelaram que os reguladores do ciclo celular podem promover interrupção da proliferação celular, indução de diferenciação ou apoptose. Entretanto, existem muitas questões relacionadas ao ciclo celular que ainda não foram respondidas, mas com o aprofundamento do conhecimento do mecanismo de ação de agentes citostáticos e sua intrincada regulação do ciclo celular, a oportunidade de oferecer um tratamento que poderá restaurar o controle normal do ciclo celular das células neoplásicas poderá transformar-se em realidade (SWANTON, 2004).

Recentemente, muita atenção tem sido direcionada à possibilidade de se impedir que a célula tumoral seja capaz de induzir degradação da matriz extracelular e invadir o estroma, ocasionando metástases. O uso de mecanismos de inibição de disseminação dessas células tem sido bem sucedido. As enzimas chamadas metaloproteinases, que são uma família de endopeptidases, estão envolvidas, tanto na invasão, quanto nas metástases dos cânceres, por terem a capacidade de degradar os componentes da matriz extracelular. Agentes que inibem essas enzimas, como, por

exemplo, o marimastat, já se encontram em estudos clínicos de Fase III (NYGREN e LARSSON, 2003).

Além disso, agentes antiangiogênicos, promissores coadjuvantes na quimioterapia, que bloqueiam a angiogênese, necessária para nutrição e conseqüente progressão do tumor. Há vários reguladores endógenos (positivos e negativos) que controlam a angiogênese, como a angiogenina e o fator de crescimento endotelial vascular. Os inibidores da angiogênese atuam nesses reguladores endógenos, a fim de impedir a irrigação do tumor, mas os mecanismos exatos são ainda controversos. Inclui-se, nesta categoria, a talidomida, medicamento usado, no passado, para enjoos, durante a gravidez (uso abolido devido a teratogênese causada), mas que, por mostrar atividade antiangiogênica, tem sido usada em estudos clínicos, nos Estados Unidos e Europa, no tratamento de diferentes tipos de tumores, em combinação com outros agentes (RAJE e ANDERSON, 2002; SEPP-LORENZINO et al., 2004).

Por outro lado, sabe-se que um dos processos que resultam na malignidade das células é a perda do processo de diferenciação. Estudos com o objetivo de induzir a diferenciação e tornar as células “normais” utilizam análogos da vitamina D3 e agonistas do receptor do ácido retinóico, mas as vias pelas quais esses compostos induzem a diferenciação ainda não estão bem descritas (NYGREN e LARSSON, 2003).

Além disso, anticorpos monoclonais (Mabs) são moléculas versáteis com potencial terapêutico e aplicações em várias enfermidades humanas, incluindo o câncer (COSTELLO et al., 2004). Estão sendo utilizados Mabs direcionados para fatores de crescimento, citocinas e outras moléculas ou receptores que controlam o crescimento e outras funções da célula tumoral e, também, Mabs anti-

idiotípicos como vacinas para gerar uma resposta imune. Ressalta-se que algumas vacinas geraram resultados negativos, mas que sua eficiência tem sido observada, principalmente quando administrada como adjuvante, observado em câncer colorretal em estudo de Fase Clínica III (NYGREN e LARSSON, 2003).

Dados da literatura demonstram que muitas drogas citotóxicas exercem seu efeito por indução de apoptose, porém muitas células adquirem resistência a essas drogas por modificações em elementos chaves da sinalização apoptótica. Assim, a conjugação de drogas citotóxicas a anticorpos (imunoconjugados) é uma alternativa muito promissora na terapia do câncer. Outra alternativa é o acoplamento de um anticorpo a uma enzima capaz de converter uma droga não tóxica em um metabólito de elevada toxicidade. Os anticorpos são direcionados a antígenos específicos do tumor, de modo que a droga é conduzida e concentra-se, no tumor, não afetando os tecidos normais das proximidades (RANG, RITTER E DALE, 2004).

Finalmente, desde o surgimento do emprego da quimioterapia para o câncer, foram identificados muitos de caminhos pelos quais as células cancerosas “escapam” do agente químico. No momento em que as células desenvolvem resistência a uma droga, elas podem também desenvolver resistência cruzada a outras drogas, química e fisicamente não relacionadas, em um fenômeno conhecido como resistência multi-droga (MDR). Muitas formas de MDR resultam da expressão de bombas de fluxo ATP-dependente com ação sobre diferentes substratos (NYGREN e LARSSON, 2003). Muitos estudos mostram o envolvimento de uma P-glicoproteína nessa resistência. Uma das estratégias consiste na utilização de drogas que inibam essa proteína transportadora, como verapamil e ciclosporina A (LACONI, PANI e FARBER, 2000).

4. Pesquisa e Desenvolvimento de Agentes Antineoplásicos

Nos últimos cinquenta anos a pesquisa de novas drogas anticâncer, introduziu na terapêutica cerca de 70 medicamentos. Quando se analisa a forma como essas drogas foram introduzidas, é possível indicar novos rumos para o desenvolvimento de métodos de triagem de substâncias anticâncer (BOYD, 1989, JOHNSON, 1990; CRAGG et al., 1994).

Os primeiros programas de pesquisa de novas drogas antitumorais utilizavam exclusivamente leucemias murinas como modelos de triagem *in vitro* laboratorial. Este tipo de metodologia foi selecionada por apresentar alta reprodutibilidade e produtividade, resultados quantitativos e baixo custo operacional (JOHNSON, 1990). Um dos importantes centros de pesquisa que adotou este programa de triagem foi o National Cancer Institute (NCI - Washington, USA). Nesta ocasião, a leucemia murina codificada como L1210 passou a ser empregada como o único modelo padrão para a seleção de novas drogas antitumorais.

Posteriormente, um novo protocolo de triagem de novas drogas *in vitro* foi implementado, utilizando a nova leucemia murina, a P388, por apresentar maior sensibilidade às drogas disponíveis na época (GRINDEY, 1990). Com isso, houve um grande desenvolvimento teórico e foram definidos importantes conceitos relativos à quimioterapia (HAMBURGUER, 1981), assim como várias drogas foram descobertas, as quais ainda são úteis na terapêutica antineoplásica atual (SHOEMAKER, 1986). Entretanto, esta leucemia murina apresentava uma alta sensibilidade às substâncias que interferem com a síntese de DNA e, conseqüentemente, ocorreu um repetitivo isolamento de substâncias com o mesmo mecanismo de ação, apesar de apresentarem estruturas químicas distintas (CORBETT, 1987).

Tal estratégia aparentemente gerou uma seleção tendenciosa (doença-orientada) de compostos ativos, principalmente contra aqueles tumores humanos que foram melhor representadas pelos modelos tumorais murinos (linfomas e leucemias), resultando em um baixo índice de eficiência e conseqüente estagnação no desenvolvimento de novas drogas antitumorais (GRINDEY, 1990).

Na tentativa de aprimorar a triagem antitumoral, foi implementada uma nova estratégia, que consistia em realizar uma pré-seleção com a leucemia murina P388 e em testes posteriores utilizar 5 linhagens celulares murinas (melanoma B16, pulmão Lewis, cólon 26, cólon 38 e mamário CD8F1) e 3 linhagens humanas (mama MX1, pulmão LX1 e cólon CX1) (GOLDIN et al., 1981).

A seguir, com o avanço das pesquisas de antibióticos e com o aprimoramento das técnicas de cultura de tecidos e de microorganismos, foram desenvolvidos modelos experimentais *in vitro*, tornando possível a avaliação da quimiossensibilidade de microorganismos, células normais e tumorais (HAMBURGUER, 1981).

Porém, os ensaios *in vitro* ainda apresentavam, no início da década de 70, vários problemas técnicos; tais como: crescimento celular em cultura inadequado ou ausente (apenas 66% das espécimes celulares se desenvolviam *in vitro*), contaminações freqüentes, ausência de padronização do tempo de exposição às drogas e de sua concentração utilizada e dificuldade na quantificação dos resultados (HAMBURGUER, 1981).

Através de uma análise de todos os resultados obtidos até a década de 80 foi possível o desenvolvimento de um novo painel de linhagens celulares utilizando modelos experimentais *in vitro* (GRINDEY, 1990). Este painel era formado por 60 linhagens celulares diferentes, oriundas de oito tipos de tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário, cérebro) e do sistema hematopoiético (leucemia). Dessa maneira, essa metodologia permitia a avaliação das drogas em diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade, buscando a representação de importantes neoplasias (MUGGIA, 1987; SKEHAN et al., 1990).

Segundo Grindey (1990), com a utilização dos ensaios *in vitro* foram identificadas 79 substâncias antineoplásicas, as quais foram inativas no modelo das leucemias murinas. A análise destes dados revelaram que os ensaios *in vitro* são mais específicos e sensíveis que aqueles das leucemias.

Atualmente, muitos dos problemas técnicos foram solucionados, entretanto o maior obstáculo para o desenvolvimento da oncologia experimental é a diversidade dos tumores. Muitas evidências demonstram que a grande maioria dos tumores são originários de uma única célula, sendo então classificados como tumores monoclonais (FEARON, 1987; ARNOLD, 1988). Por outro lado, uma pequena porcentagem das neoplasias pode ser considerada proveniente da proliferação de várias células transformadas independentemente, que são então classificadas como tumores policlonais (PONDER, 1986).

Independente da origem da neoplasia, quando esta se torna clinicamente detectável, suas células componentes são extremamente heterogêneas, já que as mesmas podem sofrer alterações

genéticas (falhas nos processos de transdução e transcrição dos ácidos nucleicos) durante o processo de replicação das células tumorais e geram populações diferentes de células originárias de um mesmo tumor (FOULDS, 1975; CAIRNS, 1975).

Assim, as distintas características genéticas e morfo-fisiológicas das células tumorais acarretam dificuldade de desenvolvimento de uma metodologia abrangente, que seja satisfatória para detectar a ação farmacológica de uma nova droga sobre qualquer tecido neoplásico (VON HOFF, 1985). Além disso, uma única metodologia não é capaz de detectar diferentes mecanismos de ação farmacológicos de agentes antitumorais (HAMBURGER, 1981).

Deste modo, para atender à grande variedade das características celulares, estão sendo desenvolvidos diversos modelos experimentais *in vitro* capazes de detectar a ação citotóxica ou citostática de um novo agente antineoplásico, pois de acordo com o contexto descrito é evidente a necessidade do aprimoramento das estratégias de triagem/seleção de novas drogas antineoplásicas, que apresentem mecanismo de ação inédito (CHABNER, 1990).

5. Contribuição das Espécies Vegetais na Obtenção de Drogas Anticâncer

Plantas são reconhecidas por sua habilidade de produzir metabólitos secundários e por séculos, espécies vegetais tem sido úteis para o tratamento de uma variedade de doenças (CRAGG et al., 1999; CRAGG e NEWMAN, 1999). Metabólitos secundários são biosintetizados nas plantas com diferentes propósitos, incluindo regulação do crescimento, interações inter e intra-espécies e defesa contra predadores e infecções. Muitos desses produtos naturais apresentam interessantes atividades biológicas e farmacológicas e tem sido utilizados como quimioterápicos ou fornecendo

moléculas precursoras para o desenvolvimento de novos medicamentos (VERPOORTE, 1998, 2000; PHILLIPSON, 2001).

Até meados do século XX os medicamentos de origem vegetal constituíam a base da terapia medicamentosa, quando o desenvolvimento da síntese química foi rapidamente introduzindo novas drogas. Atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e cerca de 25% são originários de plantas, isolados diretamente ou produzidos por síntese a partir de um precursor vegetal. No entanto, nos últimos anos o interesse pelos medicamentos de origem vegetal voltou a crescer, acompanhado de um aumento significativo nos investimentos em pesquisa (TOPLISS et al., 2002).

Entre os diversos fatores que impulsionaram esse retorno está a descoberta de drogas muito eficazes no tratamento do câncer. Um dos exemplos mais importantes é o da *Catharanthus roseus*, conhecida também como *Vinca rosea*, utilizada pela população de Madagascar no tratamento do diabetes. Durante os teste de atividade hipoglicemiante, os extratos dessa espécie produziram granulocitopenia em consequência da supressão da medula óssea dos animais, sugerindo avaliação em modelos de leucemias e linfomas. A confirmação da atividade nesses modelos levou ao isolamento dos alcalóides vimblastina e vincristina que, atualmente, são de grande utilidade no tratamento de leucemias, linfomas e câncer testicular (FELLOWS, 1995; CRAGG e NEWMAN, 1999).

No final de 1940 foram isolados dois alcalóides de espécies do gênero *Podophyllum*, que eram utilizadas pelas populações nativas da América e da Ásia no tratamento do câncer de pele e verrugas. No entanto os resultados experimentais com esses alcalóides não foram encorajadores.

Mais tarde foram obtidos por semi-síntese dois derivados desses alcalóides, a ectoposida e a teniposida, cujos estudos experimentais permitiram a introdução dessas drogas na terapia do câncer (CRAGG e NEWMAN, 1999).

Outra descoberta importante na área de câncer foi o paclitaxel, isolado da casca do teixo (*Taxus baccata* e *Taxus brevifolia*), em 1971 (WANI et al., 1971). Estudos clínicos revelaram que essa substância era capaz de regredir o câncer de mama e de ovário, resistentes à terapia tradicional (ROWINSKY et al., 1995). Como essa substância teria que ser extraída de espécies que levam décadas para o seu crescimento, a introdução dessa droga na terapêutica teve que esperar pelo desenvolvimento da síntese química, de extrema complexidade, e pela descoberta de precursores obtidos de fontes renováveis. Essas dificuldades adiaram a introdução do paclitaxel e do docetaxel na terapêutica para a década de 90. Além do tratamento do câncer de mama e ovário, essas drogas estão sendo avaliadas no câncer de pulmão, esôfago, cabeça e pescoço (NEWMAN, CRAGG e SNADER, 2003).

A camptotecina, um alcalóide extraído da árvore chinesa *Camptotoca acuminata*, testado em ensaios clínicos no início da década de 70 (WALL et al., 1966), foi o primeiro inibidor da enzima topoisomerase I, uma enzima do núcleo celular que está envolvida com a manutenção da estrutura topográfica do DNA durante o processo de translação, transcrição e mitose (ZIJLSTRA et al., 1990; BURRIS e FIELDS, 1994). Apesar de ter sua atividade antitumoral confirmada nestes estudos, a camptotecina apresentou toxicidade incontrolável e sua utilização foi interrompida (MUGGLIA et al., 1970). Todavia, este composto ainda é usado como molécula matriz no desenvolvimento de novos inibidores da topoisomerase I (POMMIER, 1996), como o topotecano e irinotecano, derivados semi-sintéticos da camptotecina que apresentam considerável

hidrossolubilidade (KINGSBURY et al., 1989; KINGSBURY et al., 1991), também capazes de promover a inibição da enzima topoisomerase I (CREEMERS et al., 1994; POTMESIL, 1994).

6. A espécie vegetal *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.

Nos últimos anos o CPQBA-Unicamp, através de projetos financiados pelo CNPq (nº 000521449/94), FAPESP (nº 95/09607-5) e verbas obtidas com a prestação de serviços, desenvolveu dois projetos de avaliação do potencial anticâncer de espécies vegetais da Amazônia e do Cerrado do Estado de São Paulo (FERRI, 1975; FERRI, 1980). Parte dos recursos obtidos foram utilizados para implantação de um Laboratório de Cultura de Células Tumorais Humanas. As linhagens tumorais foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) e dessa maneira foi possível o desenvolvimento da mesma metodologia utilizada por esse Centro de Pesquisas.

Esses extratos foram produzidos pelo Laboratório de Fitoquímica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e pela Divisão de Fitoquímica do CPQBA. No NCI tiveram sua atividade antiproliferativa avaliada no painel composto por sessenta linhagens tumorais humanas. Embora esses projetos tenham sido planejados para comparar a atividade de extratos obtidos de plantas desses ecossistemas (cerrado e floresta amazônica), os resultados mais significativos foram obtidos com as espécies do cerrado, sendo que foi selecionada para estudo neste projeto a *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn., considerando-se os parâmetros de especificidade celular, inibição do crescimento maior que 50% e presença de ação antiproliferativa de maneira dose dependente.

As partes aéreas da *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. foram coletadas na “Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu” em São Paulo, Brasil, sendo a exsicata depositada no Herbário do Instituto de Biologia / UNICAMP sob número de registro UEC-266.

A *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn., popularmente conhecida como camarinha, é uma planta arbustiva, muito encontrada nas restingas da mata atlântica, inclusive na Ilha do Mel, Município de Paranaguá - PR, Brasil, onde os moradores desta região usam seu fruto para produção de geléias e aromatização de aguardente, dentre outras finalidades. A propagação da camarinha ocorre naturalmente, por sementes, onde os pássaros têm fundamental papel na sua disseminação (CORRÊA, 1942).

O gênero *Gaylussacia* é conhecido por apresentar atividade antifúngica, provavelmente devido à presença de compostos fenólicos (CIPOLLINI e STILES 1992). Outros compostos conhecidos neste gênero incluem o estilbeno (ASKARI et al., 1972) e derivados das antocianinas (BALLINGTON et al., 1988). Uma revisão bibliográfica demonstrou que foi avaliada a atividade antiproliferativa do extrato bruto desta espécie em cultura de células mononucleares humanas sanguíneas, revelando ação citotóxica (SOUZA-FERNANDES et al., 2002).

Capítulo 2

**ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY, ISOLATION AND
IDENTIFICATION OF *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.
(Ericaceae) ACTIVE COMPOUND**

**ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY, ISOLATION AND IDENTIFICATION OF
Gaylussacia brasiliensis (Spreng.) Meisn. (Ericaceae) ACTIVE COMPOUND**

M.A. Antonio^{1,2}, L.K. Kohn^{1,3}, K.M.M. Ciampi¹, M.A. Foglio¹, R.F. Rodrigues¹, I.M.O. Sousa¹, R.F.P. Argentin¹, M.C.E. Amaral⁴, V.Bittrich⁴, J.E. Carvalho^{1,2,3} and P.E. Pizão^{1,2}

¹ Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas

² Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas

³ Departamento de Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas

⁴ Departamento de Botânica do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas

(Aceito para publicação em Fev/2004, Revista Phytomedicine)

Summary

Gaylussacia brasiliensis (Spreng.) Meisn. (Ericaceae), popularly known as "camarinha", is used in Brazilian folk medicine for treatment of several inflammatory processes and as healing agent. The scope of this study was to evaluate the antiproliferative activity of the crude dichloromethanic extract (CHD) obtained from *G. brasiliensis* and to identify the active compound(s) responsible for this activity. CHD was evaluated on sulforhodamine B antiproliferative assay in four-level concentrations (250, 25; 2.5; 0.25 $\mu\text{g/mL}$) with 48 hours incubation. CHD showed a concentration dependent inhibition on all cell lines, but had better cytotoxic activity for NCI-ADR cell line. Therefore, CHD was submitted to column chromatography on silica-gel providing fractions that revealed activity on the antiproliferative assay employed. CHD was pre-purified by dry column chromatography over silica-gel affording five fractions. Among these, fraction C (FC) was the most active inhibiting all cells line at 25 $\mu\text{g/mL}$. FC was further fractionated over silica-gel with hexane-ethyl acetate mixtures affording pure Compound 1. The compound was identified on basis of 2D-NMR experiments. Compound 1 showed concentration-dependent activity and selectivity for 786-0 and MCF-7 cancer cell lines; the lowest IC_{50} was for NCI-ADR line with 6 $\mu\text{g/mL}$. Investigation of the other fractions is also being carried out by using bioassay guided isolation of further active components.

Key words: *Gaylussacia brasiliensis*, antiproliferative, antitumor, medicinal plants, triterpenoids.

Introduction

Over the last years, the interest in research on natural products has increased focusing on new chemotherapeutic substances and resulting in the discovery of more efficient drugs for many diseases and especially on cancer treatment, playing an important role in the development of chemotherapy (Newman et al., 2003; Lee, 1999; Calixto, 2000; Rates, 2001; Phillipson, 2001).

One of the most important examples are the taxoid compounds (docetaxel and paclitaxel) (Schiff et al. 1979, Walker and Croteau 2001), obtained from *Taxus* genus species (Pezzuto, 1997; Mattos et al. 2001) and the camptotecin derivatives (irinotecan and topotecan), obtained from *Camptotheca acuminata* (Wall et al. 1966, Wall 1998, Chang, 2000).

Currently, over a hundred types of cancer are known, differentiated by etiology, natural history, therapeutic and procedures. Notwithstanding the great evolution of basic knowledge concerning this pathology, little was being achieved towards the development of efficient techniques of prevention and cure (Verdecchia et al. 2001; Verweij and Jonge, 2000).

In 1997, the Pluridisciplinary Chemical, Biological and Agricultural Research Center of the State University of Campinas (UNICAMP), with financial support from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), established a research program in order to identify natural products with potential antineoplastic activity. Therefore, a survey of several plant species from the Brazilian *cerrado* woods was carried out. This region was selected considering the great chemical variety encountered among this biodiversity, the relatively small amount of biologic knowledge and the rapid *cerrado* extinction areas (Ferri, 1969). *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. was selected throughout that screening program. This work evaluated the *in vitro* antiproliferative activity of extract and isolated compound from *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn., popularly known as “camarinha”. This plant, used in Brazilian folk medicine

for treatment of several inflammatory processes and as healing agent, is an arbust, which could be found in the Atlantic Forest (Ilha do Mel, Paranaguá - PR, Brazil) (Corrêa, 1942).

The genus *Gaylussacia* is known to present antifungal activity, probably due to the presence of phenolic compounds (Cipollini & Stiles 1992). Other known compounds in the genus include stilbene (Askari et al., 1972) and anthocyanin derivatives (Ballington et al., 1988). An update literature search has shown that the compounds present in this genus have not been evaluated for activity on the *in vitro* antiproliferative assay.

Material and Methods

General Experimental Procedures

The physical and spectral data (mass, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR) were recorded at 11,75 Tesla (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C) using INOVA 500 spectrometer, tetra -methylsilane was used as internal standard. Optical rotation on Polarimeter-Lep A₂ with sodium lamp; IR spectra recorded on Bomen MB series Hartmann & Braun-Michelson instrument TLC was performed on precoated aluminum sheets (Merck 5554). Compounds were visualized by spraying with p-anisaldehyde- H_2SO_4 -acetic acid (0,5:1:50 ml) followed by heating at 110-120°C to yield blue, pink or purple spots. For cc, Si 60 (70-230 mesh and 230-400 mesh, Merck) All solvents were analytical grade and redistilled before use.

Gas Chromatography / Mass Spectrometry analysis (GC/MS) were carried out using a HP-5890/5970 system equipped with a J&W Scientific CP-SIL 24 CB fused capillary column (30 m x 0,25mm x 0,25 m). Temperature program 150°C (2min)-(5°C/min.) – 240°C – (10°C/min)- 300°C (34 min). Injector 280°C and detector 300°C. Helium was used as carrier gas (0,7 bar, 1 mL/min). The MS were taken at 70eV. Scanning speed was 0,84 scans/s from 40 to 550. Sample volume was 1 µL.

Plant Material

The aerial parts of *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. were collected at “Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu” in São Paulo-Brazil by both botanist Prof^a. Dr^a M. Carmo E. do Amaral and Prof. Dr. Volker Bittrich. Voucher specimen is deposited at Instituto de Biologia/UNICAMP under registration number UEC-266.

Crude extract and fractions preparation

The material was grinded to a fine power prior to use. The powder (500 g) was submitted to dynamic maceration with dichloromethane (700 mL) during 4 h. This procedure was repeated 3 times with the same powder. After filtration, the solvent evaporated under vacuum at 40°C resulting the crude dichloromethanic extract (CHD) with 9,6% yield.

The crude extract was pre-purified by dry column chromatography on silica-gel 60 (Merck 7734) with chloroform/methanol 5% providing five different fractions. The active Fraction C was further fractionated (10 g) on successive column chromatography using Silica-gel (Merck 7734) (5 X 60 cm) with hexane/CH₂Cl₂ mixtures, affording Compound 1.

Cell Culture

The experiments were performed using the following human cancer cell lines: MCF-7 (breast), NCI-ADR (breast expressing the multidrug resistance phenotype), NCI-460 (lung), UACC-62 (melanoma), 786-0 (renal), OVCAR-03 (ovarian), PC-03 (prostate) and HT-29 (colon). The National Cancer Institute, Frederick MA/USA (NCI), kindly donated these cell lines and stock cultures were kept in liquid nitrogen.

Cells were cultured in 25 cm² flasks (Nunc Brand Products) containing 5 mL of RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies.) with 5% fetal bovine serum (Gibco BRL, Life Technologies). After the twentieth serial passages the cells were discarded and new flasks were unfrozen for use.

Biological Assays

All the adherent cell lines were detached from the culture flasks by addition of 0,5 mL of trypsin (Nutricell Nutrientes Celulares). Thereafter, trypsin was inactivated by addition of 5 mL of 5% serum in RPMI 1640 medium. Cells were separated into single-cell suspensions by a gentle pipetting action. After counting, the cells were diluted into appropriate seeding densities and inoculated onto 96-wells microtiter plates (Nunc Brand Products). Cells plating volume was 100 µL per well. Seeding densities varied among the cell lines as follows: 6,5 x 10⁴ (MCF-7), 5,0 x 10⁴ (NCI-ADR), 4,0 x 10⁴ (NCI-460), 3,0 x 10⁴ (UACC62), 5,0 x 10⁴ (786-0), 6,5 x 10⁴ (OVCAR-03), 4,5 x 10⁴ (PC-03) and 5,0 x 10⁴ (HT-29) cells per mL. Microtiter plates containing cells were pre incubated for 24 hours at 37°C in order to allow stabilization before the addition (100 µL) of the test substance (either crude extract, fractions or drugs). The plates were incubated with the test substance for 48 hours at 37°C and 5% CO₂ (Skehan et al., 1990). The positive control of these experiments were doxorubicin [(DOX) (Sigma Chemical Co.)] and tamoxifen [(TAM) (Sigma Chemical Co.)] (Chabner, 1995). These agents were tested at five 10-fold concentrations, starting from with maximum concentration of 10⁻⁴ M for DOX and 5µM for TAM in RPMI/FBS/gentamicin.

Solubilization and Dilution of Test Substance

For initial screening, the crude extracts were tested at 250 µg/mL. If antiproliferative activity was detected, the test substance was retested at four concentrations (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), and

each concentration was studied in triplicate wells. All samples were initially solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Chemical Co.) at 400 times the desired final maximum test concentration. Extracts stocks were stored frozen at -70°C . The concentrates were diluted with complete medium containing $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ gentamicin (Schering-Plough).

Assay Antiproliferative - Sulforhodamine B (SRB) Assay

Sulforhodamine B (SRB) is an aminoxantine with a bright pink color that has two sulfonic groups. Since it is an anionic dye in weak acid solution it is capable of bonding to protein's aminoacids basic terminals cells fixed with trichloroacetic acid. Therefore this non-clonogenic methodology permits a high sensitive protein with a straight relationship to cell culture (Skehan et al. 1990 and Johnson, 1990).

The SRB assay was performed according to the assay described by Skehan et al. (1990). Briefly, the cells were fixed by means of protein precipitation with 50 % trichloroacetic acid (TCA) (Sigma Chemical Co.) at 4°C ($50\text{ }\mu\text{L/well}$, final concentration 10%) for 1 h. The supernatant was then discarded and the plates were washed 5 times with tap water. The cells were stained for 30 minutes with 0.4% the SRB (Sigma Chemical Co.), dissolved in 1% acetic acid ($50\mu\text{L/well}$) (Sigma Chemical Co.) and subsequently washed 4 times with 1% acetic acid to remove unbound stain. The plates were dried and bound protein stain was solubilized with $150\text{ }\mu\text{L}$ of 10mM Trizma buffer (Sigma Chemical Co.). The optical density was read on an automated spectrophotometer plate reader (Molecular Devices Versa Max Microplate Reader) at 540 nm.

Data Calculations

The optical density data were calculated according to Excel[®] program (Microsoft Office Package) and the values for mean $\pm$ average standard error of data from replicated wells were calculated. The background optical measurements were subtracted from appropriated control well values and the appropriate drug-blank measurements. Cellular responses were calculated for growth stimulation, test substance effect and growth inhibition. Three measurements were run at: time zero (T₀) value of SRB protein content at the beginning of test substance incubation, control value (C) at the end of the test substance incubation, and a set of test substance-treated test values (T) at the end of the test substance incubation period. If T was greater than or equal to T₀ (cytostatic effect), the calculation was $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$. If T was less than T₀, cell killing (cytotoxic effect) occurred and was calculated from $100 \times [(T-T_0)/T_0]$. The IC₅₀ values (drugs concentration eliciting 50% inhibition) were determined by non-linear regression analysis. This results presented here refer to a representative experiment since all assays were run in triplicates the average standard error was always lower than 5%.

Results & Discussion

Plants are recognized for their ability to produce a wealth of secondary metabolites and, for centuries, mankind has used many species to treat a variety of diseases (Cragg *et al.* 1999; Cragg and Newman, 1999). Secondary metabolites are biosynthesized in plants for different purposes including growth regulation, inter and intra-specific interactions and defense against predators and infections. Many of these natural products have presented interesting biological and pharmacological activities and have been used as chemotherapeutic agents or served as the starting point in the development of modern medicines (Verpoorte 1998, 2000).

Our phytochemistry studies were biomonitored throughout the cell growth percentages analysis on the antiproliferative assay. The criteria selection for those extract and/or fractions was growth percentage lower than 50% (negative values meaning cell death) and/or selective activity on a type of cell line, with a profile of concentration-dependent antiproliferative activity. The positive controls were the chemotherapeutic doxorubicin (DOX) and the antiestrogen agent tamoxifen (TAM).

In this study, aerial parts from *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn were initially extracted with dichloromethane and sequentially with 70% ethanol. The crude extracts were tested at concentrations of 0,25 to 250 $\mu\text{g/mL}$, for 48 hours. The crude dichloromethanic extract (CHD) presented the highest antiproliferative activity, inhibiting all cell lines with cellular death for OVCAR -03 (ovarian), PC -03 (prostate) and 786-0 (renal) lines in a concentration-dependent relationship, whereas DOX showed no selectivity in its antiproliferative action (Table 1).

Subsequently, CHD was pre-purified by dry column chromatography over silica-gel affording five different fractions, from which fraction C (FC) was most active, inhibiting all cell lines at 25 $\mu\text{g/mL}$. Fraction C obtained from CHD presented antiproliferative activity in all cell lines studied and was more potent than CHD. The IC_{50} values for all cell lines are listed in Table 1.

FC was further fractionated over silica-gel with hexane-ethyl acetate mixtures affording Compound 1. Compound 1's EIMS (70 eV) mass spectrum showed $[\text{M}^+]$ at 470 corresponding to the formula $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$. Comparison of ^{13}C -NMR shifts with those of the urs-12-en type described by Mahato and Kundu (1994) suggested Compound 1 to be 2 β , 3 β dihydroxy-urs-12-ene-28-oic.

Compound 1 showed antitumoral activity with a concentration-dependent relationship, with cellular selectivity for 786-0 and MCF-7 cancer lines; the lowest IC_{50} was for NCIADR line with 6 $\mu\text{g/mL}$ (Table 1). The similarity of Compound 1 to steroidal compound's activity was

demonstrated by the inhibition of hormone-dependent lines (ovarian, prostate and breast). This compound presented cytotoxicity for all cell lines from 70 $\mu\text{g/mL}$ concentrations, in a straight concentration-dependent relationship, such as the positive control tamoxifen (Table 1). This result may suggest a possible connection of hormonal receptors and intracellular signalization with the pharmacological mechanism.

Some sterols such as the glucocorticoids are used in chemotherapy in order to prevent the proliferation of lymphocytes. Additional examples are estrogens (fosfestrol) prescribed for prostate cancer and progestogens (megestrol and medroxyprogesterone) for endometrium cancer (uterus). As hormonal antagonists used in chemotherapy there is the goserelin, which acts in inhibition of gonadotrofines' liberation in treatment of breast and prostate cancers, the tamoxifen (antiestrogen) for breast cancer and the flutamide used for prostate cancer (Calabresi and Chabner, 2001).

Despite the high Compound 1 chemical purity, fraction C obtained from CHD presented was more potent than Compound 1, suggesting the presence of other compounds involved in the antiproliferative activity other than Compound 1. Nowadays, studies on its mechanisms of action studies are being investigated and the bioassay guided isolation of other active components present in this fraction are also being carried out.

Acknowledgements

We would like to thank Sirlene Valério Tinti for competent and technical assistance. FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisas) for financial support.

References

- Askari A, Worthen LR, Shimizu Y (1972) Gaylussacin, a new stilbene derivative from a species of *Gaylussacia*. *Lloydia* 35: 49-54
- Ballington JR, Ballinger WE, Maness EP (1988) Anthocyanin, aglycone and aglycone-sugar content of fruits of temperate North American species of *Gaylussacia* (Ericaceae). *Can J Plant Sci* 68: 247-253
- Calabresi P, Chabner BA (2001) Chemotherapy of neoplastic diseases. In: The pharmacological basis of therapeutics (eds. J.G. Hardman and L.E. Limbird): 1381-1459. Mc Graw Hill, New York
- Calixto JB (2000) Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J and Biol Res* 33:179-189
- Chang J (2000) Medicinal Herbs: Drugs or Dietary Supplements? *Biochemic Pharmacology* 59: 211-219
- Cipollini ML, Stiles EW (1992) Antifungal activity of ripe ericaceous fruits: phenolic-acid interactions and palatability for dispersers. *Biochem System Ecol* 20: 501-514
- Cragg GM, Boyd MR, Khanna R, Kneller R, Mays TD, Mazan KD, Newman DJ, Sausville EA (1999) International collaboration in drug discovery and development: the NCI experience. *Pure Appl Chem* 71: 1619-1633
- Cragg GM, Newman DJ (1999) Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. *Cancer Investigation* 17(2): 153-163
- Ferri MG (1969) Plantas do Brasil. Espécies do cerrado 50 –1. Editora Edgard Blücher, São Paulo
- Johnson RK (1990) Screening methods in antineoplastic drug discovery. *Journal of the Natural Cancer Institute* 82(13): 1082-1083

- Korovin AV, Tkachev AV (2001) Synthesis Of Quinoxalines Fused With Triterpenes, Ursolic Acid and Beulin Derivatives. Russian Chemical Bulletin 50(2): 304-310
- Lee KH (1999) Novel Antitumoral Agents From Higher Plants. Medical Research Review 19(6): 569-596
- Lontsi D, Sondengam BL, Bodo B, Martin MT, (1998) Kalaic Acid, A New Ursane-Type Saponin from *Musanga cecropoides*. Planta Medica 64: 18-191
- Mahato SB, Kundu AP (1994) ^{13}C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids-A Compilation and Some Salient Features. Phytochemistry 37(6): 1517-1575
- Mattos D, Gomes M, Freitas R, Bernado-Filho M (2001) Model to evaluate the toxic effect of drugs: vincristine effect in the mass of organs and in the distribution of radiopharmaceuticals in mice. Mutation Research 496: 137-143
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2003) Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. J Nat Prod 66: 1022-1037
- Pezzuto JM (1997) Plant Derived Anticancer Agents. Biochemical Pharmacology 53:121-33
- Phillipson JD (2001) Phytochemistry and medicinal plants. Phytochemistry 56: 237-243.
- Corrêa PM (1942) Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas 5: 411. Brasília: Ministério da Agricultura / Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro
- Rates SMK (2001) Plants as source of drugs. Toxicon 39: 603-613
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. Nature 277: 665
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J National Cancer Institute 82, 1107-1118
- Verdecchia A, Mariotto A, Capocaccia R, Gatta G, Micheli A, Sant M, Berrino F (2001)

- Incidence and prevalence of all cancerous disease in Italy: trends and implication. *European J of Cancer* 37:1149-1157
- Verpoorte R (1998) Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Develop Trends* 3: 232-238
- Verpoorte R (2000) Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *J Pharm Pharmacol* 52: 253-262
- Verweij J, Jonge MJA (2000) Achievements and future of Chemoterapy. *European J of Cancer* 36:1479-1487
- Wall ME, Wani MC, Cook CE (1966) Plant anti-tumor agents: I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J Am Chem Soc* 88: 3888-3890
- Wall ME (1998) Camptothecin and taxol: discovery to clinic. *Med Res Rev.* 18(5): 299-314
- Walker K, Croteau R (2001) Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA: taxane2-O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 97: 13591-13596

Address

M.A. Antônio, CPQBA-UNICAMP, Post office box 6171, Zip Code 13081 - 970, Campinas, São Paulo, Brazil, Tel. ++01938847500 Extention 249, Fax ++01938847811; Email: marcia@cpqba.unicamp.br

Table 1: Efficacies of crude dichlorometanic extract (CHD), fraction C (FC), isolated compound from *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. (Compound 1) and positive controls (doxorubicin (DOX) and tamoxifen (TAM)) against human tumoral cell lines*.

Sample	IC ₅₀ (µg/mL)**							
	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	PC-03	OVCAR-03	HT-29
CHD [#]	324,8	ND	306,6	441,1	803,6	321,9	372,9	ND
FC [#]	144,5	12,6	0,3	10,0	0,6	21,9	0,5	11,4
Compound 1 [#]	180,2	44,5	6,2	10,6	25,3	56,2	7,9	121,3
DOX	2,39	1,33	43,9	0,006	1,19	27,54	1,8	ND
TAM	13,6	4,2	0,004	4,7	3,3	2,7	4,9	0,01

* Assessed by the SRB assay; ** IC₅₀ values (concentration eliciting 50% inhibition) were determinated from non-linear regression analysis; ND could not be determinated; [#] Dose range tested: 0,25 to 250 µg/mL. For comparison, the positive control were DOX and TAM.

Capítulo 3

TRITERPENE ISOLATED FROM *Gaylussacia brasiliensis*

(Spreng.) Meisn. (Ericaceae): THE CORRELATIONSHIP
BETWEEN ITS ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY AND COX

INHIBITION

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

**TRITERPENE ISOLATED FROM *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. (Ericaceae):
THE CORRELATIONSHIP BETWEEN ITS ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY AND
COX INHIBITION**

**M.A. Antonio^{1,2,3}, L.K. Kohn^{1,4}, P.C. Dias¹, K.M.M. Ciampi¹, M.A. Foglio¹, A.F. Teixeira^{1,2},
J.E. Carvalho^{1,2,4} and P.E. Pizão^{1,2}**

**¹ Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade
Estadual de Campinas**

**² Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade
Estadual de Campinas**

**³ Unidade Acadêmica da Área de Ciências Biológicas e da Saúde, Curso de Farmácia,
Universidade São Francisco**

**⁴ Departamento de Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia, Universidade
Estadual de Campinas**

(Submetido para publicação em Março/2004, Pharmacological Research)

Abstract

Gaylussacia brasiliensis (Spreng.) Meisn. (Ericaceae) is used in Brazilian folk medicine in the treatment of several inflammatory processes. *G. brasiliensis* crude dichloromethanic extract (CHD), its active compound (1) (2 β , 3 β dihydroxy-urs-12-ene-28-oic-acid) and indomethacin were evaluated on sulforhodamine B antiproliferative assay in a four-level concentration (0,25 to 250 μ g/mL), for 48 h, showing a concentration dependent inhibition on every cell line. Based on experimental evidence that inhibition of COX 2 causes tumor regression, the scope of this work was to evaluate the correlation between CHD and Compound 1 antiproliferative active and COX inhibition. The CHD *in vivo* anti-inflammatory activity was analyzed through the antiedematogenic model induced by carrageenin in rats. CHD (1000 mg/kg, po) inhibited paw edema and its maximum inhibitory effect (44%) was obtained after 5h of the carrageenin injection. Indomethacin (10 mg/kg, po) started to reduce the paw edema on the second hour after the edema induction, with a maximum inhibitory effect (64%) obtained after 4h of the injection. The systemic effect of CHD (500 mg/kg, po) over the synthesis of PGE₂ in the gastric mucosa of rats, with or without previous indomethacin (5 mg/kg, sc) treatment, was measured. CHD inhibited 50% of its PGE₂ synthesis, which was potentiated (82%) by indomethacin previous administration. To evaluate the same pharmacological activity of Compound 1 (250 μ g/mL), the amount of PGE₂ in human cancer cell lines (HT-29 - colon) was measured, for 48 h. Both Compound 1 and indomethacin reduced the synthesis of PGE₂ *in vitro*, at 64 and 57%, respectively. Overall, experimental data suggest that the Compound 1 antitumor mechanism is related to COX inhibition. Nowadays, the investigation involving other mechanisms of action of Compound 1 are being carried out and include: DNA damage (common pharmacological effect of several anti-neoplastic drugs), interference with cell division, as well as antiangiogenic and proapoptotic effects.

Key words: *Gaylussacia brasiliensis*, antiproliferative, cyclooxygenase inhibition, medicinal plants, triterpenoids.

Introduction

Natural products continue to play an important role in the discovery and development of new pharmaceuticals, either as clinically useful drugs, as starting materials to produce synthetic drugs, or yet as lead compounds from which a totally synthetic drug is designed (Phillipson, 2001). In many aspects, both natural and synthetic compounds complement each other on the search for new drug substances since the first ones often possess complex structural features not easily accessible by total synthesis (Topliss *et al.*, 2002).

Over the last years an interest in the research on natural products has increased focusing on new chemotherapeutic substances, resulting in the discovery of more efficient drugs for many diseases and especially on cancer treatment (Newman *et al.*, 2003; Lee, 1999; Calixto, 2000; Rates, 2001; Phillipson, 2001). Some of the most important examples are the taxoid compounds (docetaxel and paclitaxel) (Schiff *et al.*, 1979, Walker and Croteau 2001), obtained from *Taxus* genus species (Pezzuto, 1997; Mattos *et al.*, 2001) and the camptotecin derivatives (irinotecan and topotecan), obtained from *Camptotheca acuminata* (Wall *et al.*, 1966, Wall 1998, Chang, 2000).

In the Pluridisciplinary Chemical, Biological and Agricultural Research Center of the State University of Campinas (UNICAMP) research program, several plant species from the Brazilian *cerrado* woods were studied. *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. was selected throughout the screening program. This plant, popularly known as “camarinha”, is a bush and can be found in the Atlantic Forest (Ilha do Mel, Paranaguá - PR, Brazil). It is used in Brazilian folk medicine for treatment of several inflammatory processes and as healing agent (Corrêa, 1942).

The genus *Gaylussacia* is known to present antifungal activity, probably due to the presence of phenolic compounds (Cipollini & Stiles 1992). Other known compounds in this genus include stilbene (Askari *et al.*, 1972) and anthocyanin derivatives (Ballington *et al.*, 1988).

The sulforhodamine B antiproliferative assay was used to evaluate *Gaylussacia brasiliensis* crude dichloromethanic extract (CHD) and its active compound (1), a triterpenic acid (2 β , 3 β dihydroxy-urs-12-ene-28-oic acid - Figure 1). Both samples were studied in a four-level concentration (250, 25; 2.5; 0.25 μ g/mL) with 48 hours incubation. CHD showed a concentration-dependent inhibition on all cell lines, but had better cytotoxic activity for NCI-ADR (breast expressing the multidrug resistance phenotype) cell line. Compound 1 showed concentration-dependent activity and selectivity for 786-0 (kidney) and MCF-7 (breast) cancer cell lines; the lowest IC₅₀ was for NCI-ADR line with 6 μ g/mL (Antônio, 2003).

The scope of this work was to evaluate the correlation between the antiproliferative activity of both CHD and Compound 1 obtained from *G. brasiliensis* and cyclooxygenase inhibition, taking into consideration that recent studies suggest a role of COX 2 in neoplasia, including hyperproliferation, transformation, tumor growth, invasion and metastasis (Koki and Masferrer, 2002). Besides, clinical studies have reported a 30-50% reduction in adenomatous polyps, incident disease, and death from colorectal cancer with regular use of aspirin or non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (Thun, Henley and Patrono, 2002).

Material and Methods

Plant Material

The aerial parts of *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. were collected at “*Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu*” in São Paulo-Brazil. Voucher specimen is deposited at *Instituto de Biologia* / UNICAMP under registration number UEC-266.

Crude extract and active compound preparation

The material was grinded to a fine power prior to use. The powder (500 g) was submitted to dynamic maceration with dichloromethane (700 mL) for 4 hours. This procedure was repeated 3 times with the same powder. After filtration, the solvent evaporated under vacuum at 40°C providing the crude dichloromethanic extract (CHD) with 9,6% yield.

The crude extract was pre-purified by dry column chromatography on silica gel 60 (Merck 7734) with chloroform/methanol 5% resulting in five different fractions. The active Fraction C was further fractionated (10 g) on successive column chromatography using Silica gel (Merck 7734) (5 X 60 cm) with hexane/CH₂Cl₂ mixtures affording Compound 1 (Antônio, 2003).

Cell Culture

The experiments were performed using the following human cancer cell lines: MCF-7, NCI-ADR, NCI-460 (lung), UACC-62 (melanoma), 786-0, OVCAR-03 (ovary), PC-03 (prostate) and HT-29 (colon). The National Cancer Institute, Frederick MA/USA (NCI), kindly donated these cell lines.

Cells were cultured in 25 cm² flasks (Nunc Brand Products) containing 5 mL of RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies.) with 5% fetal bovine serum (Gibco BRL, Life Technologies). Stock cultures were kept in liquid nitrogen. After the twentieth serial passage the cells were discarded and new flasks were unfrozen for use.

Biological Assays

All the adherent cell lines were detached from the culture flasks by addition of 0,5 mL of trypsin (*Nutricell Nutrientes Celulares*). Thereafter, trypsin was inactivated by addition of 5 mL of 5% serum in RPMI 1640 medium. Cells were separated into single-cell suspensions by a gentle

pipetting action. After counting, they were diluted into appropriate seeding densities and inoculated onto 96-well microtiter plates (Nunc Brand Products). Cells plating volume was 100 μ L per well. Seeding densities varied among the cell lines as follows: $6,5 \times 10^4$ (MCF-7), $5,0 \times 10^4$ (NCI-ADR), $4,0 \times 10^4$ (NCI-460), $3,0 \times 10^4$ (UACC62), $5,0 \times 10^4$ (786-0), $6,5 \times 10^4$ (OVCAR-03), $4,5 \times 10^4$ (PC-03) and $5,0 \times 10^4$ (HT-29) cells per mL. Microtiter plates containing the above were pre incubated for 24 hours at 37°C in order to allow their stabilization before the addition (100 μ L) of the test substance (test substances or drugs). The plates were incubated with the test substance for 48 hours at 37°C and 5% CO₂ (Skehan *et al.*, 1990). The positive controls of these experiments were doxorubicin [(DOX) (Sigma Chemical Co.)] and indomethacin (Sigma Chemical Co.), a non-steroidal anti-inflammatory drugs. These agents were tested at four 10-fold concentrations, starting with a maximum concentration of 10^{-4} M for DOX and 250 μ g/mL for NSAIDs in RPMI/FBS/gentamicin (Garamicina® Schering-Plough).

Solubilization and Dilution of Test Substance

CHD, Compound 1 and indomethacin were tested at four concentrations (0,25; 2,5; 25; 250 μ g/mL) and each concentration studied in triplicate wells. All samples were initially solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Chemical Co.) at 400 times the desired final maximum test concentration. Stock solutions were stored frozen at – 70°C. The concentrates were diluted with complete medium containing 50 μ g/mL gentamicin (Garamicina® Schering-Plough).

Antiproliferative Assay - Sulforhodamine B (SRB) Assay

Sulforhodamine B (SRB - Sigma Chemical Co.) is an aminoxantine with a bright pink color that has two sulfonic groups. Since it is an anionic dye in weak acid solution it is capable of bonding to protein's aminoacids basic terminal cells previously fixed by trichloroacetic acid. For that

reason, this non-clonogenic methodology allows a straight correlation between a high sensitive protein and the cell culture (Skehan *et al.*, 1990; Johnson, 1990).

The SRB assay was performed according to the assay described by Skehan *et al.*, (1990). Briefly, the cells were fixed by means of protein precipitation with 50 % trichloroacetic acid (TCA) (Sigma Chemical Co.) at 4°C (50 µL/well, final concentration 10%) for 1 h. The supernatant was then discarded and the plates were washed 5 times with tap water. The cells were stained for 30 minutes with 0.4% SRB (Sigma Chemical Co.), dissolved in 1% acetic acid (50µL/well) (Sigma Chemical Co.) and subsequently washed 4 times with 1% acetic acid to remove unbound stain. The plates were dried and bound protein stain was solubilized with 150 µL of 10mM Trizma buffer (Sigma Chemical Co.). The optical density was read on an automated spectrophotometer plate reader (Molecular Devices Versa Max Microplate Reader) at 540 nm.

SRB Test Data Calculations

The optical density data were calculated according to Excel[®] program (Microsoft Office Package) and the values for mean $\pm$ average standard error of data from replicated wells were calculated. The background optical measurements were subtracted from appropriate control well values and the appropriate drug-blank measurements. Cellular responses were calculated for growth stimulation, test substance effect and growth inhibition. Three measurements were run at: time zero (T0) value of SRB protein content at the beginning of test substance incubation, control value (C) at the end of the test substance incubation, and a set of test substance-treated test values (T) at the end of the test substance incubation period. If T was greater than or equal to T0 (cytostatic effect), the calculation was $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$. If T was less than T0, cell killing (cytotoxic effect) occurred and was calculated from $100 \times [(T-T_0)/T_0]$. The IC₅₀ values (drugs concentration eliciting 50% inhibition) were determined by non-linear regression analysis.

The results presented here refer to a representative experiment since all assays were run in triplicates and the average standard error was always lower than 5%.

Animals

The *in vivo* evaluation of the pharmacological activity was carried out on *wistar* rats weighing 130-180g from the University's animal facilities, fasted for 12 hours before each experiment. These animals were maintained under standard conditions of light cycle (12 hours light, 12 hours dark) and temperature (20 °C), for at least 7 days before the experiments. Animal's welfare guidelines were adopted during maintenance period and experimentation (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 1996, International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, 1985).

The protocols employed are in agreement with Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Institute of Biology-Unicamp's Ethics Committee for Animal Research (CEEA) (166-1/CEEA-IB/UNICAMP).

Carrageenin - induced rat paw edema

The antiedematogenic activity was evaluated using the carrageenin-induced rat paw inflammation model (Winter *et al.*, 1962). In this experiment, 5 *wistar* male rats, weighing from 120 to 180g, were randomly divided into 3 groups. Group I, negative control, was treated with vehicle (NaCl 0.9%, 10 mL/kg, po); group II received CHD (1000 mg/kg, po) and group III was treated with indomethacin (10 mg/kg, po) as positive control. One hour after administration, edema was induced in the animals by injecting 0.05 mL of 1% (w/v) carrageenin in normal saline into plantar aponeurosis of the left hind paw. Paw volume was measured with a Ugo Basile Plethysmograph

model 7150 at time zero (immediately after carrageenin injection), 30, 60, 120, 180, 240 and 300 minutes after the injection.

Quantitative determination of Prostaglandin E₂ (PGE₂) in the gastric mucosa of rats

After a 24-hour food restrain period and water *ad libitum*, 25 male *wistar* rats, weighing from 200 to 250g, were randomly divided into four groups. Initially, each group received its corresponding subcutaneous treatment, namely, saline solution (0,9%; 10 mL/kg) or indomethacin (30 mg/kg; 2,5 mL/kg).

One hour later, each group received a second oral treatment, with the samples to be evaluated in this model, CHD (500 mg/kg) or saline (10 mL/kg). After one additional hour, the animals were euthanized through cervical displacement.

Stomach processing and sample obtainment

After euthanasia, the stomachs were removed from the abdominal cavity and washed in 0,9% saline solution. The fundic portion was entirely removed while the glandular one was weighed and finely cut given that it represents the object of the analysis (with the help of scissors and scalpels, the glandular portions of the stomachs were reduced to tiny bits). The tiny fragments of the glandular portion were then placed into polypropylene tubes containing 6 mL of cold ethanol (kept in freezer) and indomethacin (100 µM). At this moment, indomethacin blocks the synthesis of prostaglandins.

Purification of the samples

PGE₂ purification was performed according to a modified protocol supplied with the Biotrak PGE₂ Enzymeimmunoassay System RPN 222 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Briefly, 0.5 mL of cold 1:4 water:ethanol solution was added to 0.5 mL of tissue homogenate. A 10- μ l volume of glacial acetic acid was added to each sample followed by a 5 min incubation at room temperature. Samples were then centrifuged at 2500 x g for 2 min. The supernatant was then applied to a preprimed AMPREP C18 minicolumn (Amersham Pharmacia Biotech - RPN 222), and the column was washed with 1 mL of distilled water and hexane. PGE₂ was eluted into siliconized glass vials with two 0.75-mL volumes of ethyl acetate. This fraction was evaporated to dryness under a stream of argon. According to the protocol 1 provided with the EIA kit, samples were brought up in 1 mL of buffer and assayed in 96-well plates. The relative concentration of PGE₂ was normalized against total protein concentration in the same samples.

Quantitative determination of Prostaglandin E₂ (PGE₂) in HT-29 (colon) cancer human cell line

HT-29 cells (5×10^5 cell/well) were pretreated with the test drugs during incubation in 24-well plates containing RPMI 1640 medium with 5% FBS at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. The amount of PGE₂ was measured after a 48-hour exposure of both Compound 1 as well as indomethacin at 250 μ g/mL, using the Biotrak PGE₂ Enzymeimmunoassay System RPN 222 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) according to the protocol 4 manufacturer's instructions.

Statistical analysis

The *in vivo* results were expressed as mean $\pm$ sdm. The individual data were submitted to one way variance analysis (ANOVA) with critical range at $p < 0,05$ and later to Duncan's test with the same critical range.

Results

Antiproliferative Assay - Sulforhodamine B (SRB) Assay

The antiproliferative activity of CHD and Compound 1 from *G.brasiliensis* as well as indomethacin (a non-steroidal anti-inflammatory drug COX non-selective) on sulforhodamine B Assay was evaluated in a four-level concentration (250, 25; 2.5; 0.25 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h. CHD presented the highest antiproliferative activity, inhibiting all cell lines with cellular death for OVCAR -03 (ovary), PC -03 (prostate) and 786-0 (kidney) lines in a concentration-dependent relationship, whereas DOX showed no selectivity in its antiproliferative action. Compound 1 showed antitumoral activity with a concentration-dependent relationship, with cellular selectivity for 786-0 and MCF-7 cancer lines; the lowest IC_{50} was for NCIADR line with 6 $\mu\text{g/mL}$ (Table 1). Also in a concentration-dependent relationship, indomethacin presented some antiproliferative activity, inhibiting all cell lines with cellular selectivity for PC-03, NCI-460 and 786-0. The IC_{50} values are listed at Table 1.

Carrageenin - induced rat paw edema

The antiedematogenic activity of both CHD and indomethacin was evaluated using the carrageenin-induced rat paw inflammation model. CHD, orally administrated at 1000 mg/kg, inhibited paw edema and its maximum inhibitory effect (44%) was obtained after five hours of the carrageenin injection. Indomethacin, administrated by the same route at 10 mg/kg, started to reduce the paw edema on the second hour after the carrageenin injection, with a maximum inhibitory effect (64%) obtained after four hours of this injection. The results are presented in Figure 2, expressed as mean $\pm$ sdm, showing the evolution of the inflammatory response through the paws' dimensions along the time of the experiment.

***In vivo* and *in vitro* quantitative determination of Prostaglandin type E₂ (PGE₂): in the gastric mucosa of rats and human cancer cell lines (HT-29)**

The systemic effect of *G. brasiliensis*' CHD over the synthesis of prostaglandin type 2 in the gastric mucosa of treated rats, with or without prior administration of indomethacin, was evaluated. The obtained data showed that CHD was capable of inhibiting 50% of the PGE₂ synthesis in the gastric mucosa of treated rats. This pharmacological effect was amplified (82%) with previous administration of indomethacin. These results are presented in Table 2 as mean $\pm$ dpm PGE₂ concentration at pg/tissue gram.

Quantitative determination of Prostaglandin E₂ (PGE₂) in HT-29 (colon) cancer human cell line

The amount of PGE₂ in human cancer cell lines (HT-29) was measured after a 48-hour exposure of both Compound 1 as well as indomethacin at 250 μ g/mL. Compound 1 was able to reduce drastically the synthesis of PGE₂ in the *in vitro* model (64%) while indomethacin reduced 57%. The results are shown in Table 3 as mean PGE₂ concentration at pg/well.

Discussion

There is compelling experimental evidence that inhibition of COX 2 causes tumor regression. Pharmacodynamic studies have shown several mechanisms of the anticancer effects of non-anti-inflammatory drugs COX 2 selective: blockage of angiogenesis, promotion of apoptosis, modulation of inflammatory and immune response, among others (Masferrer *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000, Sjö Dahl, 2001; Gasparini *et al.*, 2003).

Cyclooxygenase (COX), the enzyme that catalyses the conversion of arachidonic acid to prostaglandins, is involved in several physiological and pathogenic pathways. Two isoforms are known. COX 1 is constitutively expressed in most tissues and produces prostaglandins involved in the maintenance of the gastric mucosa, regulation of renal blood flow and platelet aggregation (Dannenbergh *et al.*, 2001). The inducible form, COX 2, is expressed in inflamed and neoplastic tissues and, therefore, induced by proinflammatory and mutagenic stimuli, such as growth factor (epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF) and cytokines (tumor necrosis factor α (TNF α), interleukins 1 α e 1 β) (Diaz *et al.*, 1998).

Recent research suggests the role of COX 2 in neoplasia, including hyperproliferation, transformation, tumor growth, invasion and metastasis (Dannenbergh *et al.*, 2001). Several prostaglandins, such as PGE₂, suppress immuno surveillance through downregulation of lymphokines, T-cell and B-cell proliferation, cytotoxic activity of natural killer cells and secretion of TNF α and interleukin 10 (Chandrasekharan *et al.*, 2002). Pai and colleagues showed a close link between PGE₂ and EGF-receptor signaling systems. PGE₂ induces the activation of metalloproteinases MMP2 and MMP9, increases expression of TGF α , transactivates EGF receptor and triggers mitogenic signaling in gastric epithelial and colon cancer cells as well as in rat gastric mucosa *in vivo* (Gasparini *et al.*, 2003).

Thus, in this study, antiproliferative activity of *G.brasiliensis* CHD and Compound 1 was compared with indomethacin's activity (a non steroidal anti-inflammatory drug COX non-selective) on sulforhodamine B antiproliferative assay in a four-level concentration (250, 25; 2.5; 0.25 μ g/mL) for 48 h. CHD, Compound 1, doxorubicin and indomethacin presented antiproliferative activity, in a concentration-dependent relationship.

The analysis of the results suggest a direct correlation between the antiproliferative and the anti-inflammatory activities since each and every antiinflammatory substance tested was capable of reducing the growth of different human cancer cell lines. In order to confirm this hypothesis, the antiedematogenic activity of CHD was evaluated using the carrageenin-induced rat paw inflammation model (Winter *et al.*, 1962) due to the lack of sufficient amounts of Compound 1. The results are presented in Figure 2 showing the evolution of the inflammatory response through the paws' dimensions along the time of the experiment. The intraplantar injection of carrageenin leads to paw edema, which begins with concomitant release of histamine, serotonin and kinins. On a second phase, there is the elevated production of prostaglandins, leukotrienes, oxygen-derived free radicals and local neutrophil infiltration and activation (Giraldelo *et al.*, 1994). CHD orally administrated at 1000 mg/kg caused paw edema inhibition when evaluated on inflammation model induced by carrageenin injection (Figure 2) and its maximum inhibitory effect (44%) was obtained after five hours of carrageenin. This result showed that CHD was able to reduce the experimental paw edema suggesting that its antiproliferative activity may be related with the biosynthesis of the eicosanoids.

On the other hand, prostaglandins are believed to participate in multiple physiological as well as physiopathological responses such as reproductive, immunological, endocrine, tumorigenesis, cardiovascular regulation (Klein *et al.*, 2004) as well as gastric citoprotection (Eberhart and Dubois, 1995). These substances protect the gastric mucosa through many mechanisms, such as the decrease of acid secretion; bicarbonate and mucus production. Prostaglandins also increase the mucosal blood flow (Katori and Majima, 1997). Stress, chronic use of antinflammatory drugs and alcoholic beverages are some of the main causes of gastric ulcers (Barocelli *et al.*, 1997).

Based on the above, the systemic effect of *G. brasiliensis*' CHD over the synthesis of PGE₂ in the gastric mucosa of treated rats, with or without previous administration of indomethacin, was

analyzed through the ELISA methodology. CHD was capable of inhibiting 50% of the PGE₂ synthesis in the gastric mucosa of treated rats. This pharmacological effect was amplified (82%) with previous administration of indomethacin (Table 2).

In order to better analyze those results and confirm whether the reduction in the synthesis of PGE₂ was due to Compound 1 in CHD, the *in vitro* dosage of this prostaglandin was carried out using the human cancer HT-29 cell line after a 48-hour exposure at 250 µg/mL, in the methodology previously described. Compound 1 was able to reduce drastically the synthesis of PGE₂ in the *in vitro* model (64%) while indomethacin reduced 57% (Table 3).

Overall, the experimental data suggest that the Compound 1 antitumor mechanism is related to COX inhibition. However, additional research involving the exact COX isoform is necessary. Gasparini (2003) described a possible interaction between nitric oxide and COX, seeing that an increase in superoxide anion by nitric oxide synthase could potentially activate COX. In the view of those facts, the interference of Compound 1 in the nitric oxide pathway is yet to be investigated.

At the present moment, the investigation involving Compound 1's mechanisms of action are being carried out and include: DNA damage (common pharmacological effect of several anti-neoplastic drugs), interference with cell division, as well as antiangiogenic and proapoptotic effects.

Acknowledgements

We would like to thank Profa. Dra M. Carmo E. do Amaral and Prof. Dr. Volker Bittrich, both botanists from *Instituto de Biologia* / UNICAMP for material plant collection and identification and to FAPESP (*Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo*) and CNPq (*Conselho Nacional de Pesquisas*) for financial support.

References

- Antônio, MA, Kohn LK, Ciampi KMM, Foglio MA, Rodrigues RF, Sousa IMO, Argentin RFP, Amaral MCE, Bittrich V, Carvalho JE, Pizão PE. Antiproliferative activity, isolation and identification of *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. (Ericaceae) active compound.. *Phytomedicine*, 2003 (submitted).
- Askari A, Worthen LR, Shimizu Y. Gaylussacin, a new stilbene derivative from a species of *Gaylussacia*. *Lloydia* 1972; 35 : 49-54.
- Ballington JR, Ballinger WE, Maness EP. Anthocyanin, Aglycone and aglycone-sugar content of fruits of temperate North American species of *Gaylussacia* (Ericaceae). *Can J Plant Sci* 1988; 68 : 247-253.
- Barocelli E & Impicciatore M. Study of the antisecretory and antiulcer mechanism of a new indenopyridazinone derivative in rats. *Pharmacological Research* 1997; 35(5):487-492.
- Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J and Biol Res* 2000; 33 :179-189.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Ross KL, Evanson, NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COXf3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and others analgesic/antipyretic drugs : cloning, structure , and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:13926-31.

- Chang J. Medicinal Herbs: Drugs or Dietary Supplements? *Biochemic Pharmacology* 2000; 59: 211-219.
- Cipollini ML, Stiles EW. Antifungal activity of ripe ericaceous fruits: phenolic-acid interactions and palatability for dispersers. *Biochem System Ecol* 1992; 20: 501-514
- Corrêa PM. Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas 1942; 5 : 411. Brasília: Ministério da Agricultura / Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro.
- Dannenberg AJ, Altieri NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, Subbaramaiah K. Cyclooxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2001; 2:544-51.
- Diaz A, Chepenik KP, Korn JM, Reginato AM, Jimenes SA. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin – 1 beta, tumor necrosis factor alpha, and transforming growth factor – beta 1 in human lung fibroblasts. *Exp Cell Res* 1998;63:222-29.
- Eberhart CE. & Dubois RN. Eicosanoids and gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1995; 109: 285-301.
- Gasparini G, Longo R, Sarmiento R, Morabito A. Inhibitors of cyclooxygenase 2: a new class of anticancer agents?. *Lancet Oncol* 2003; 4:605-15.
- Giraldelo M M, Zapellini A, Muscará M N, De Lucca I, Hyslop S, Cirino G, De Nucci G, Antunes E. Effect of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation in vitro. *European Journal of Pharmacology* 1994; 257: 87-93
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 1996. NIH Publication nº 82-23 revised.
- International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS). Geneva: 1985.
- Katori M, Majima M. Multiple roles of inducible cyclooxygenase-2 and its selective inhibitors. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1997; 190(6) : 547 –258.

- Klein AL, Wold LE, Ren J. The cyclooxygenase-2 product prostaglandin E₂ modulates cardiac contractile function in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Pharmacological Research* 2004; 49: 99-103.
- Koki AT, Masferrer JL. Celecoxib a specific COX -2 inhibitor with anticancer properties. *Cancer control* 2002; 9:28-35.
- Lee KH Novel Antitumoral Agents From Higher Plants. *Medical Research Review* 1999; 19(6): 569-596.
- Liu, X.H., Kirschenbaum, A., Yao, S., Lee, R., Holland, J.F., Levine, A.C. Inhibition of Cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and The Growth Of Prostate Cancer In Vivo. *J. Urology* 2000 ;164: 820-825.
- Masferrer, J.L., Leahy, K.M., Koki, A.T., Zweifel, B.S., Settle, S.L., Woerner, M., Edwards, D.A., Flickinger, A.G., Moore, R.J., Seibert, K. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitor. *Cancer Research* 2000; 60: 1306-1311.
- Mattos D, Gomes M, Freitas R, Bernado-Filho M. Model to evaluate the toxic effect of drugs: vincristine effect in the mass of organs and in the distribution of radiopharmaceuticals in mice. *Mutation Research* 2001; 496: 137-143.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J Nat Prod* 2003;66: 1022-1037.
- Pezzuto JM. Plant Derived Anticancer Agents. *Biochemical Pharmacology* 1997 ; 53:121-133.
- Phillipson JD. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* 2001; 56: 237-243.
- Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon* 2001;39: 603-613.
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979; 277: 665.

- Sjödahl, R. Extent, Mode and Dose Dependence of Anticancer Effects. *Am J Med*, 2001; 110 (1A): 66S-69S.
- Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti – inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Inst* 2002; 99: 252-66.
- Topliss JG, Clark AM, Ernst E, Hufford CD, Johnston GAR, Rimoldi JM and Weimann BJ. Natural and Synthetic Substances Related to Human Health. *Pure Appl. Chem* 2002 ; 74: 1957–1985.
- Walker K, Croteau R. Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA: taxane2- O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 2001; 97: 13591-13596.
- Wall ME. Camptothecin and taxol: discovery to clinic. *Med Res Rev*. 1998; 18(5): 299-314.
- Wall ME, Wani MC, Cook CE. Plant anti-tumor agents: I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J Am Chem Soc* 1966; 88: 3888-3890.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*: 1962;111: 544-547.

Address

M.A. Antônio, CPQBA-UNICAMP, Post office box 6171, Zip Code 13081 - 970, Campinas, São Paulo, Brazil, Tel. ++01938847500 Extention 249, Fax ++01938847811; Email: marcia@cpqba.unicamp.br

Table 1: Efficacies of crude dichloromethanic extract (CHD) and the isolated compound from *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. (Compound 1) as well as positive controls doxorubicin (DOX) and indomethacin (IND) against human tumoral cell lines*.

Sample	IC ₅₀ (µg/mL)**							
	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	PC-03	OVCAR-03	HT-29
CHD [#]	324,8	ND	306,6	441,1	803,6	321,9	372,9	ND
Compound 1 [#]	180,2	44,5	6,2	10,6	25,3	56,2	7,9	121,3
DOX	2,4	1,3	43,9	0,006	1,2	27,5	1,8	ND
IND [#]	56,0	ND	80,5	183,1	29,3	43,5	38,7	ND

* Assessed by the SRB assay; ** IC₅₀ values (concentration eliciting 50% inhibition) were determined through non-linear regression analysis; ND could not be determined; [#] Dose range tested: 0,25 to 250 µg/mL. For comparison, the positive control were DOX and anti-inflammatory drugs

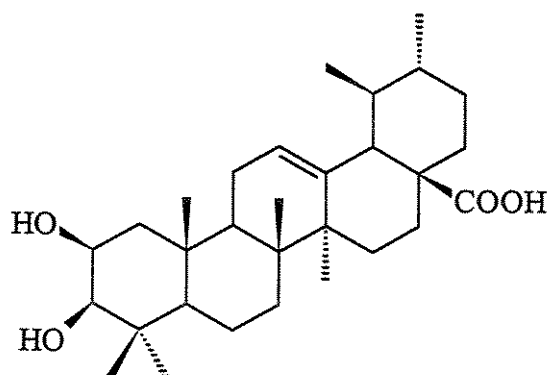
Table 2: Efficacy of crude dichloromethanic extract (CHD) from *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn over the synthesis of prostaglandin E₂ in the gastric mucosa of treated rats, with and without previous administration of indomethacin.

S.c. Treatment plus p.o. treatment	Dose (mg/kg, vo)	N	PGE ₂ pg/g tissue (mean ± dpm)	PGE ₂ reduction (%)
Saline + saline	—	5	380,33 ± 87,35	—
Saline + CHD	500	5	220,57 ± 51,18*	47,4
Indomethacin + Saline	—	4	48,90 ± 2,12*	87,1
Indomethacin + CHD	500	5	68,91 ± 11,45*	82,1

ANOVA $F_{(4,19)} = 7,50$ $p < 0,001$. Duncan's test: * $p < 0,05$.

Table 3: Efficacies of Compound 1 isolated from *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. and indomethacin (250 µg/mL) over the synthesis of prostaglandin E₂ in human cancer HT-29 cell line.

Treatment	Concentration (µg/mL)	PGE ₂ (pg/well)	PGE ₂ reduction (%)
No treatment	---	292,3	---
Indomethacin	250	119,6	58,4
Compound 1	250	105,9	63,8



0

Figure 1: Molecular structure of isolated Compound 1 (2 β , 3 β , hydroxy-Urs-12-ene-28-oic acid) from *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.

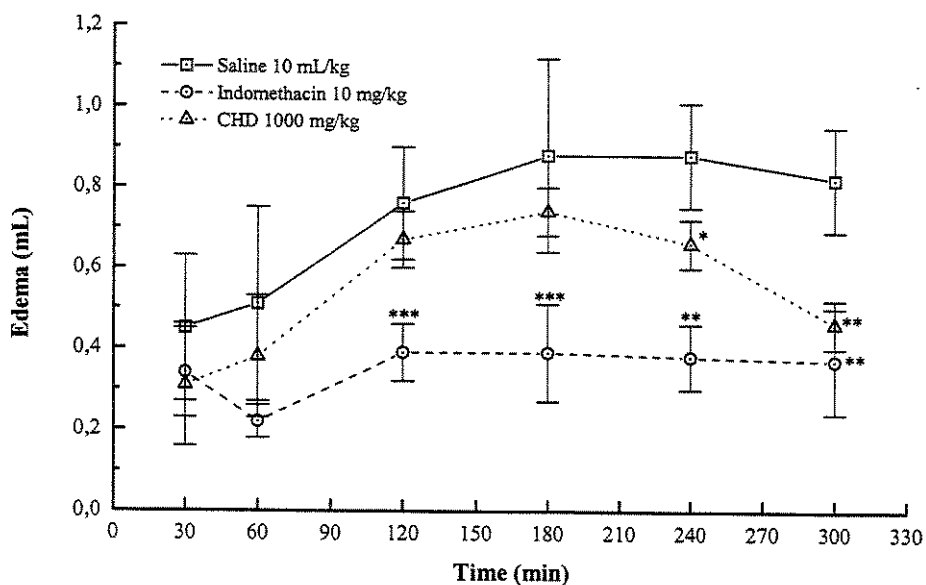


Figure 2: Effect of oral administration of crude dichloromethanic extract (CHD, 1000 mg/kg, po) from *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. and indomethacin (10 mg/kg, po) on carrageenin induced paw edema in rats. ANOVA: 30min: $F_{(2,11)} = 1,16$ $p > 0,05$; 1h: $F_{(2,11)} = 3,84$ $p > 0,05$; 2h: $F_{(2,11)} = 20,24$ $p < 0,001$; 3h: $F_{(2,11)} = 13,08$ $p < 0,01$; 4h: $F_{(2,11)} = 20,89$ $p < 0,01$; 5 h: $F_{(2,10)} = 17,96$ $p < 0,001$. Duncan's test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

CAPÍTULO 4

**Triterpene isolated from *Gaylussacia brasiliensis*
(Spreng.) Meisn. (Ericaceae): antiproliferative
activity and its action mechanism**

**TRITERPENE ISOLATED FROM *Gaylussacia brasiliensis* (SPRENG.) MEISN.
(ERICACEAE): ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY AND ITS ACTION
MECHANISM**

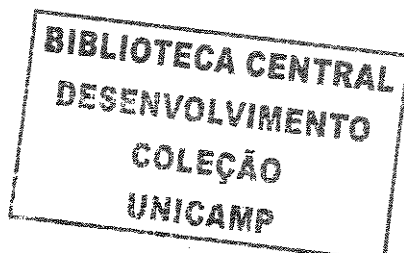
AUTHORS: MÁRCIA APARECIDA ANTÔNIO^{1,2}, LUCIANA KONECNY KOHN^{1,2},
KARIN MAIA MONTEIRO CIAMPI¹, LEANDRO PETINARI³, MARY ANN FOGLIO²,
SELMA CANDELÁRIA GENARI³ and JOÃO ERNESTO DE CARVALHO¹.

¹ Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas

² Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas

³ Departamento de Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas

Correspondence to: Dra. Márcia Aparecida Antônio, CPQBA-UNICAMP, Post Office Box 6171, Zip Code 13081 - 970, Campinas, São Paulo, Brazil, Tel. ++01938847500 Extention 249, Fax ++01938847811; Email: marcia@cpqba.unicamp.br



Abstract

The triterpene active compound (2 β , 3 β dihydroxy-urs-12-ene-28-oic acid) isolated from *G. brasiliensis* (Spreng.) Meisn. (Ericaceae), used in Brazilian folk medicine, was evaluated through the sulforhodamine B antiproliferative assay using OVCAR-03 (human ovary cancer) cell line. Its possible mechanisms of action were investigated including DNA synthesis, cell division interference and its capacity to induce *in vitro* cellular transformation. The DNA-MG bioassay revealed no signs of DNA intercalation. The time-independent (exposure from 4 to 120 hours) antiproliferative activity over OVCAR-03 cell line exposed to this compound together with the morphological analysis revealed an apoptotic phenotype. These results suggest that the triterpene's both cytotoxicity and ability to induce cellular transformation leads to apoptosis. The correlation between the morphological findings with changes in the optical properties of the cultures is currently being carried out using the annexin V test as well as a bioassay guided isolation of other active components present in this plant.

Key words: *Gaylussacia brasiliensis*, antiproliferative, cyclo-oxygenase inhibition, medicinal plants, triterpenoids.

Introduction

Plants have long been a source of drugs and almost 25% of the active components of currently prescribed medicines were first identified in higher plants (Balandrin et al., 1985). Medicine plants have a dominant therapeutic role in the treatment of human illness (Pezzuto, 1997). Six of the top twenty pharmaceutical drugs sold in 1996 were natural products and more than 50% of this top twenty were linked directly to natural product research (Buss, 1999).

As an alternative to other approaches, the scientific research of plants used in traditional medicine is receiving growing interest as a way of identifying new anticancer agents (Garcia *et al.*, 1978; Rimbau and Forn, 1982). In the Pluridisciplinary Chemical, Biological and Agricultural Research Center of the State University of Campinas (UNICAMP) research program, several plant species from the Brazilian *cerrado* woods were studied. *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. was selected throughout the screening program. This plant, popularly known as “camarinha”, is a bush and can be found in the Atlantic Forest (Ilha do Mel, Paranaguá - PR, Brazil). It is used in Brazilian folk medicine for treatment of several inflammatory processes and as healing agent (Corrêa, 1942).

The genus *Gaylussacia* is also known to present antifungal activity, probably due to the presence of phenolic compounds (Cipollini & Stiles 1992). Other known compounds in this genus include stilbene (Askari et al. 1972) and anthocyanin derivatives (Ballington *et al.* 1988).

The sulforhodamine B antiproliferative assay was used to evaluate the antiproliferative active of active compound obtained from *Gaylussacia brasiliensis* crude dichlorometanic extract, a triterpenic acid (2 β , 3 β dihydroxy-urs-12-ene-28-oic acid). Triterpene active compound showed concentration-dependent activity and selectivity for 786-0 (kidney) and MCF-7

(breast) cancer cell lines; the lowest IC₅₀ was for NCI-ADR line with 6 µg/mL (Antônio, 2003). The aim of this work was to assess the *in vitro* the action mechanism of this compound obtained from *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.

Material and Methods

Plant Material

The aerial parts of *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. were collected at “Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu” in São Paulo-Brazil by both botanist Prof.^º Dr.^a M. Carmo E. do Amaral and Prof. Dr. Volker Bittrich. Voucher specimen is deposited at Instituto de Biologia / UNICAMP under registration number UEC-266.

Crude extract and triterpene active compound preparation

The triterpene active compound active compound isolated from *G. brasiliensis* crude dichlorometanic extract was obtained as described by Antônio et al. (2003).

Cell Culture

The experiments were performed using a human cancer cell line OVCAR-03 (ovary), kindly donated for the National Cancer Institute, Frederick MA/USA (NCI).

Cells were cultured in 25 cm² flasks (Nunc Brand Products) containing 5 mL of RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies.) with 5% fetal bovine serum (Gibco BRL, Life Technologies). Stock cultures were kept in liquid nitrogen. After the twentieth serial passage the cells were discarded and new flasks were unfrozen for use.

Biological Assays

All the adherent cell lines were detached from the culture flasks by addition of 0,5 mL of trypsin (Nutricell Nutrientes Celulares). Thereafter, trypsin was inactivated by addition of 5 mL of 5% serum in RPMI 1640 medium. Cells were separated into single-cell suspensions by a gentle pipetting action. After counting, they were diluted into appropriate seeding densities and inoculated onto 96-well microtiter plates (Nunc Brand Products). Cells plating volume was 100 μ L per well and the seeding density as $6,5 \times 10^4$ per mL. Microtiter plates containing the above were pre incubated for 24 hours at 37°C in order to allow their stabilization before the addition (100 μ L) of the test substance. The plates were incubated with the test substance for 1-120 hours at 37°C and 5% CO₂ (Skehan *et al.*, 1990). The positive control of these experiments was 5-fluorouracil (5-FU) (Sigma Chemical Co.). The samples were tested at 25 μ g/mL in RPMI/FBS/gentamicin (Garamicina® Schering-Plough), in triplicate wells. Cell lines's guidelines were adopted during maintenance period and experimentation (UKCCCR Guidelines on the use of cell lines in Cancer Research).

Solubilization and Dilution of Test Substance

All samples were initially solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Chemical Co.) at 400 times the desired final maximum test concentration. Stock solutions were stored frozen at – 70°C. The concentrates were diluted with complete medium containing 50 μ g/mL gentamicin (Garamicina® Schering-Plough).

Antiproliferative Assay - Sulforhodamine B (SRB) Assay

Sulforhodamine B (SRB - Sigma Chemical Co.) is an aminoxantine with a bright pink color that has two sulfonic groups. Since it is an anionic dye in weak acid solution it is capable of bonding to protein's aminoacids basic terminal cells previously fixed by trichloroacetic acid. Therefore, this non-clonogenic methodology allows a straight correlation between a high sensitive protein and the cell culture (Johnson, 1990).

The SRB assay was performed according to the assay described by Skehan et al. (1990). Briefly, the cells were fixed by means of protein precipitation with 50 % trichloroacetic acid (TCA) (Sigma Chemical Co.) at 4°C (50µL/well, final concentration 10%) for 1 h, after 4, 8, 12, 24, 48, 96 and 120 hours test substance exposition. The supernatant was then discarded and the plates were washed 5 times with tap water. The cells were stained for 30 minutes with 0.4% the SRB (Sigma Chemical Co.), dissolved in 1% acetic acid (50µL/well) (Sigma Chemical Co.) and subsequently washed 4 times with 1% acetic acid to remove unbound stain. The plates were dried and bound protein stain was solubilized with 150µL of 10mM Trizma buffer (Sigma Chemical Co.). The optical density was read on an automated spectrophotometer plate reader (Molecular Devices Versa Max Microplate Reader) at 540 nm.

SRB Test Data Calculations

The optical density data were calculated according to Excel[®] program (Microsoft Office Package) and the values for mean $\pm$ average standard error of data from replicated wells were calculated. The background optical measurements were subtracted from appropriate control well values and the appropriate drug-blank measurements. Cellular responses were calculated for growth stimulation, test substance effect and growth inhibition. Three measurements were

run at: time zero (T₀) value of SRB protein content at the beginning of test substance incubation, control value (C) at the end of the test substance incubation, and a set of test substance-treated test values (T) at the end of the test substance incubation period. If T was greater than or equal to T₀ (cytostatic effect), the calculation was $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$. If T was less than T₀, cell killing (cytotoxic effect) occurred and was calculated from $100 \times [(T-T_0)/T_0]$. The results presented here refer to a representative experiment since all assays were run in triplicates and the average standard error was always lower than 5%.

DNA-Methyl Green bioassay (DNA-MG)

Interaction with DNA was determined using the method of Burres et al. (1992). Sample solutions 10, 100 and 1000 μ L of the corresponding triterpene active compound per mL of ethanol were used. Twenty microlitres of sample solutions to be tested were dispensed in triplicate into wells of 96-well and the solvent was removed under vacuum. Twenty micrograms of DNA – MG (Sigma, St. Louis, MO) were suspended in 100 mL of 0,05 M Tris – HCl (Sigma) buffer, pH 7.5, containing 7.5 mM MgSO₄ (Anedra, Argentina), and stirred at 37°C during 24h. Two hundred μ L of DNA-MG reagent were added to each well. The initial absorbance of each sample was read at 655 nm using a Biorad Microplate Modal 450 Reader. Samples were incubated in the dark at room temperature. After 24h, the final absorbance of sample was measured as described above. The decrease in absorbance was calculated as the percentage of the untreated DNA-MG absorbance value. Doxorubicine hydrochloride (Sigma) was used as a positive control. Significant activity is indicated when two independent assays give 20% or more inhibition.

Morphological Analysis

Phase-Contrast Microscopy

Adhered OVCAR-03 cells, at an initial concentration of 10^5 cells/flask, were exposed to 2.5, 25, 50 and 250 $\mu\text{g/mL}$ triterpene active compound for 48 hours. During this length of time, cells were cultured at 37°C and 5% CO_2 . Samples were fixed by 3:1 ethanol/acetic acid for 10 minutes and, then, stained with 0.25% violet cresyl for 15 minutes, quickly washed in distilled water and air dried at room temperature. They were cleared in xylene and mounted in Entellan (Merck Kraal, Darmstadt, Germany).

Scanning Electron Microscopy (SEM)

OVCAR-03 cells were cultured on coverslips at an initial concentration of 1×10^5 cells/mL, reaching semi-confluence (24 hours of culture) and exposed to 2.5, 25, 50 and 250 $\mu\text{g/mL}$ of triterpene active compound for 48 hours. Samples were fixed with 2.5% paraformaldehyde (Merck Kraal) / glutaraldehyde (SIGMA Chemical Co) in 0.1 M phosphate buffer (Merck Kraal) pH 7.4 for 2 hours, then washed with phosphate buffer, post fixed in 1% osmium tetroxide (SIGMA Chemical Co) and dehydrated in an ethanol sequence. The material was critical point dried (Balzers CPD030) and gold sputtered (Balzers SCD 050). The observation of the specimens was performed in a JEOL JSM-5800 LV scanning electron microscope.

Results

Antiproliferative Assay - Sulforhodamine B (SRB) Assay

The antiproliferative activity of triterpene active compound from *G.brasiliensis* as well as 5-fluorouracil (a antimetabolite drug) on sulforhodamine B Assay was evaluated at 25µg/mL for 1-120h. Triterpene active compound presented a time-independent antiproliferative activity. The cytotoxic effect of this compound was observed only after a 120-hour exposure, whereas 5-fluorouracil presented cytostatic and cytotoxic antiproliferative activity in a time-dependent relationship. Thus, its maximum antiproliferative effect took place after 120 hours of exposure. The results are presented at Figure 1.

DNA-MG bioassay

The ability of the triterpene active compound isolated from *G. brasiliensis* crude dichloromethane extract to interact with DNA was analysed using the DNA-MG bioassay. The results obtained show that this compound was inactive, in a decreasing absorbance percentage: 5.5, 5.5 and 6.5% at 10, 100 and 1000 µg/mL, respectively. Doxorubicin, an intercalative drug, was active with a absorbance percentage of 63.4% at the highest concentration.

Morphological Analysis

Phase-Contrast Microscopy

The morphological analysis of the control cells, stained with toluidine blue revealed some irregularity and integral nucleus (Figures 2 A and B). The ones exposed to triterpene active compound at 2,5µg/mL (Figure 2 C), 25 µg/mL (Figures 2 D and E) and 50 µg/mL (Figures 2 F and G) showed several mitotic aberrations, such as cytoplasmatic vacuolization (asterisk), multinucleation (head of arrow), nuclear fragmentation (arrow), cellular fragmentation (double arrow), probably associated with death by apoptosis.

Scanning Electron Microscopy

Twenty-four hours after the treatments, the control cells were semi-confluent with contact inhibition and anchorage dependence. It was possible to notice an irregular morphology with regular and integral nucleus (Figures 3 A and B). Cells exposed to triterpene active compound at 2,5µg/mL (Figure 3 C), 25µg/mL (Figure 3 D), 50µg/mL (Figures 3 E and F) and 250µg/mL (Figures 3 G and H) lost contact inhibition and grew in a multi-layered pattern. The ones treated with triterpene active compound (Figures 3 F, G and H) showed membrane blebbing and pits (Figures 3 F and G) at cellular surface. These alterations indicate cellular injury. In addition, there was an increase in microvilli expression as well as the development of vesicles on the surface of the treated cells.

Discussion

Previous experimental data, using *in vivo* and *in vitro* models, suggest that the triterpene active compound antitumor mechanism is related to COX inhibition (Antônio, 2004). Cyclooxygenase (COX), the enzyme that catalyses the conversion of arachidonic acid to prostaglandins, is involved in several physiological and pathogenetic pathways (Dannenberg *et al.*, 2001). The inducible form, COX 2, is expressed in inflamed and neoplastic tissues and is induced by proinflammatory and mitogenic stimuli (Diaz *et al.*, 1998). Recent research suggests a role of COX 2 in neoplasia, including hyperproliferation, transformation, tumor growth, invasion and metastasis (Dannenberg *et al.*, 2001). However, it is important to notice that the antiproliferative activity of antineoplastic drugs oftentimes involves multiple pathways. For this reason, the investigation of other possible pharmacological mechanisms of this triterpene active compound must be definitely carried out.

Drugs that interact with nucleic acids are among the most useful cancer chemotherapy agents. In general, they can be classified into three groups according to their effect over DNA: antimetabolites agents, intercalating cytostatic agents and alkylating agents. There are several important drugs that are structurally related to either nucleic acids or the building blocks for them. Antimetabolites are structural analogs of naturally occurring compounds and interfere with the production of nucleic acids. They work through a variety of mechanisms including competition for binding sites on enzymes and incorporation into nucleic acids (Allegra *et al.*, 1986). Antimetabolites inhibit the growth of the most rapidly proliferating cells in the body (Thomas, 2003). They are subdivided into three categories: antifolates, purine analogs and pyrimidine antimetabolites (Cragg & Newman, 1999).

In the present study, we questioned whether the triterpene active compound obtained from *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. would present a time-dependent activity over a specific cancer cell line. This result would indicate a cytotoxic effect through the interference with the cells' nucleic acids, which is a slow process. The multiple point exposure (from 4 to 120 hours) of OVCAR-03 cancer cell line to 25 $\mu\text{g/mL}$ of the triterpene active compound did not show any increase in its antiproliferative effect in contrast to one observed with 5-FU. This data suggest that the triterpene active compound does not seem to interfere with the purine and/or pyrimidine metabolic routes. Besides, its chemical structure does not present any similarity to endogenous antimetabolites, which confirms that hypothesis.

On the other hand, intercalating drugs are compounds that are capable of slipping between the layers of nucleic acid base pairs and disrupting the shape of the double helix. This disruption prevents replication and transcription. This effect is directly related to a flat chemical structure that enables them to fit between the base pairs. Therefore, intercalating drugs should be aromatic

or heteroaromatic in nature. Some drugs prefer to approach the helix via the major groove, whereas others “choose” an access via the minor groove. Several antitumor agents such as actinomycin D and adriamycin operate by intercalating DNA (Patrick, 2001). As far as intercalating agents are concerned, there are common structural features such as the presence of planar polyaromatic systems which bind by insertion between DNA base-pairs, with a marked preference for 5'-pyrimidine-purine-3' steps. The chromophores are linked to basic chains that might also play an important role in the affinity and selectivity shown by these compounds. Bisintercalators have two potential intercalating ring systems connected by linkers, which can vary in length and rigidity (Braña *et al.*, 2001).

In order to investigate if there was any nucleic acid intercalation involved in the triterpene active compound's mechanisms of action, the DNA-MG bioassay (Burres, 1992) was performed. This assay detects the presence of agents that interact with the genetic material through the displacement of methyl green from DNA, which leads to the decoloration of the DNA-MG complex. Since it is a simple and rapid one, this assay may be used as a screening technique for detecting the presence of compounds that interact with the DNA. Yet, it is inadequate for substances that covalently bind to DNA (Bonjean *et al.*, 1996). Our results show that the studied compound was inactive in contrast to doxorubicin, an intercalating drug, suggesting that its antiproliferative activity is not related to DNA intercalation. Again, its chemical structure has no similarity to an intercalating agent.

Alkylating agents are highly electrophilic compounds that interact with nucleophiles in order to form strong covalent bonds. There are several nucleophilic groups in DNA and in particular the 7-nitrogen of guanine (Thomas, 2003). Those drugs with two alkylating groups could therefore react with a guanine on each chain and cross-link the strands in a way that makes it impossible to unravel during replication or transcription. Since alkylating agents are very reactive, they will

react with any good nucleophile and, therefore, are not very selective in their action. They will indistinctly alkylate proteins and other macromolecules as well as DNA. Nevertheless, they have been useful in the treatment of cancer. Tumour cells often divide more rapidly than normal ones. As a consequence, any disruption of DNA function will affect the first more drastically than the last (Patrick, 2001). The chemical structure of triterpene active compound isolated from *G. brasiliensis* does not contain any of the necessary characteristics to induce DNA alkylation, in a way that cross-linking between chains will probably not occur. Even so, further investigation is imperative.

Apoptosis is a normal physiologic process, which occurs during embryonic development as well as in maintenance of tissue homeostasis (Hu and Kavanagh, 2003). Certain morphologic features, including loss of plasma membrane asymmetry and attachment, condensation of the cytoplasm and nucleus, and internucleosomal cleavage of DNA, characterize the apoptotic program. Loss of plasma membrane is one of the earliest features. The morphological analysis (Figure 2) revealed mitotic aberration, such as multinucleation, cellular and nuclear fragmentation, in addition to cytoplasmatic vacuolization, membrane blebbing and pits. This latter is mainly associated to the apoptotic phenotype. The cell exposure to triterpene active compound induced the above modifications and may also cause some genetic instability and cellular transformation, leading to cell death. This result is probably responsible for the activation of metabolic pathways that contribute to the DNA fragmentation process and the induction of cell death by apoptosis or necrosis in a dose dependent exposition basis (Bursch *et al.*, 1997; Umemoto *et al.*, 2001; Barbisan *et al.*, 1999).

We can therefore suggest that triterpene active compound had a time-independent cytotoxic effect over OVCAR-03 cell line and had no intercalation effect over nucleic acids. In addition, we may propose that triterpene induced cytotoxicity and cellular transformation, probably

associated to its ability to induce apoptosis. Presently, studies are in progress in order to relate the morphological changes of apoptosis described above to changes in the optical properties of the cultures, through the identification of marked phosphatidilserine with Annexin V (Vermes *et al.*, 1995), flow cytometry analysis as well as the bioassay guided isolation of other active components present in this plant.

Acknowledgements

We would like to thank Profa. Dra M. Carmo E. do Amaral and Prof. Dr. Volker Bittrich, both botanists from Instituto de Biologia / UNICAMP for their assistance in acquiring and identifying the medicinal plants used in this study and to FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisas) for financial support.

References

- ALLEGRA CJ, FINE RL, DRAKE JC, CHABNER BA, 1986. The effect of methotrexate on intracellular folate pools in human MCF-7 breast cancer cells. Evidence for direct inhibition of purine synthesis. *J. Biol. Chem.*, 261: 6478-6485.
- ANTÔNIO MA, KOHN LK, CIAMPI KMM, FOGLIO MA, RODRIGUES RF, SOUSA IMO, ARGENTIN RFP, AMARAL MCE, BITTRICH V, CARVALHO JE, PIZÃO PE, 2003. Antiproliferative activity, isolation and identification of *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. (Ericaceae) active compound. *Phytomedicine* (submitted).

- ANTÔNIO, MA, KOHN LK, DIAS PC, CIAMPI KMM, FOGGIO MA, TEIXEIRA AF, CARVALHO JE, PIZÃO PE, 2004. Triperpene isolated from *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. (Ericaceae): the correlationship between its antiproliferative activity and cox inhibition. Pharmacological Research (submitted).
- ASKARI A, WORTHEN LR, SHIMIZU Y, 1972. Gaylussacin, a new stilbene derivative from a species of *Gaylussacia*. *Lloydia* 35: 49-54.
- BALANDRIN MF, KLOCKE JA, WURTELE ES, BOLLINGER WH, 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228, 1154-1160.
- BALLINGTON JR, BALLINGER WE, MANESS EP, 1988. Anthocyanin, aglycone and aglycone-sugar content of fruits of temperate North American species of *Gaylussacia* (Ericaceae). *Can J Plant Sci* 68: 247-253.
- BARBISAN SF, MELLO MLS, RUSSO J, VIDAL BC, 1999. Apoptosis and catastrophic cell death in benzo(a)pyrene-transformed human breast epithelial cells. *Mutation Research* 431: 133-139.
- BONJEAN K, DE PAUW-GILLET MC, BASSLER R, QUENTIN-LECLERCQ J, ANGENOT L, WRIGHT WC, 1996. Critical evaluating of the DNA-methyl green assay: application to some indole alkaloids. *Phytot. Res.*, 10, S159-S160.
- BRAÑA MF, CACHO M, GRADILLAS A, PASCUAL-TERESA B, RAMOS A, 2001. Intercalators as Anticancer Drugs. *Current Pharm Design*, 7(17): 1745-80.
- BURRES NS, FRIGO AF, RASMUSSEN RR, MCALPINE JB, 1992. A colorimetric microassay for the detection of agents that interact with DNA. *J. Nat. Prod.*, 55(11): 1582-1587.
- BURSCH W, 1996. Active cell death induced by the anti-estrogens Tamoxifen and ICI 164384 in mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy.

- Carcinogenesis 17: 1595-1607.
- BUSS AD, 1999. The future role of natural products in drug discovery. In: Bioassay Methods in Natural Product Research and Drug Development, ed. By L. Bohlin and J.G. Bruhn, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. (in press).
- CIPOLLINI ML, STILES EW, 1992. Antifungal activity of ripe ericaceous fruits: phenolic-acid interactions and palatability for dispersers. Biochem System Ecol 20: 501-514.
- CORRÊA PM, 1942. Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas 5: 411. Brasília: Ministério da Agricultura / Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro.
- CRAGG GM, NEWMAN DJ, 1999. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. Cancer Investigation 17(2): 153-163.
- DANNENBERG AJ, ALTORI NK, BOYLE JO, DANG C, HOWE LR, WEKSLER BB, SUBBARAMAIAH K, 2001. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. Lancet Oncol, 2:544-51.
- DIAZ A, CHEPENIK KP, KORN JM, REGINATO AM, JIMENES AS, 1998. Differential regulation of ciclooxigenases 1 and 2 by interleukin – 1 beta, tumor necrosis factor alpha, and transforming growth factor – beta 1 in human lung fibroblasts. Exp Cell Res, 63:222-29.
- GARCIA J, SÁNCHEZ MS, RIMBAU V, FORN J, 1978. Lack of correlation between antiinflammatory activity and inhibition of 3',5'-cyclic AMP phosphodiesterase activity in a series of antiinflammatory agents. Ver. Esp. Fisiol. 34, 55-60.
- HU W, KAVANAGH JJ, 2003. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. Lancet Oncol. Dec; 4(12): 721-9.
- JOHNSON RK, 1990. Screening methods in antineoplastic drug discovery. Journal of the

- Natural Cancer Institute 82(13): 1082-1083.
- PATRICK GL, 2001. Nucleic acids: Drugs acting on DNA. In: An introduction to medicinal chemistry. 2ª Ed., Oxford University Press, New York, United States, 7(7.2): 127-132.
- PEZZUTO JM, 1997. Plant Derived Anticancer Agents. Biochemical Pharmacology 53:121-33.
- RIMBAU V, FORN J, 1982. Synthesis of 3H-labelled flupamesone. Journal of Laboratory Comp. Radiopharm. 19, 721-724.
- SKEHAN P, STORENG R, SCUDIERO D, MONKS A, MCMAHON J, VISTICA D, WARREN JT, BOKESCH H, KENNEY S, BOYD MR, 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J National Cancer Institute 82, 1107-1118.
- THOMAS G, 2003. Fármacos cujos alvos são os ácidos nucleicos. In: Química Medicinal: uma introdução. 1ª Ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 10.13: 313-323.
- UMEMOTO A, KOMAKI K, MONDEN Y, SUWA M, KANNO Y, KITAGAWA M, SUZUKI M, LIN CX, UHEYAMA Y, MOMEN MA, RAVINDERNATH A and SHIBUTANI S, 2001. Identification and quantification of Tamoxifen-DNA adducts in the liver of rats and mice. Chem. Res. Toxicol. 14 (8): 1006-1013.
- VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER C, 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J. Immunol. Meth. 184:39-51.

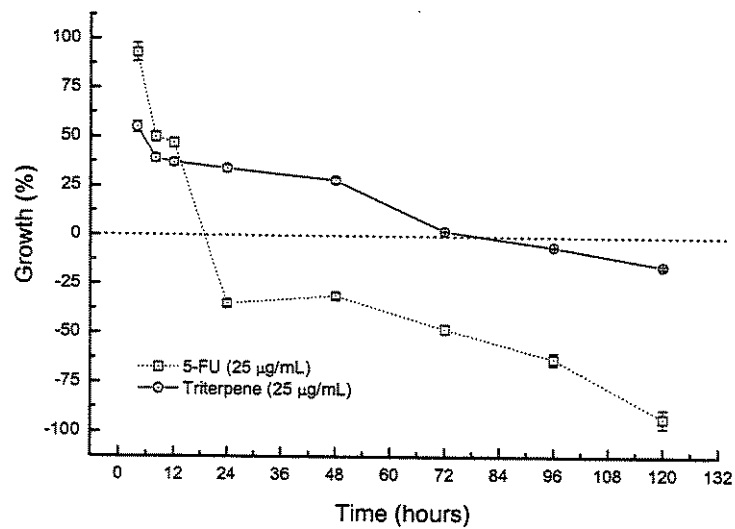


Figure 1. Antiproliferative activity of triterpene active compound and 5-fluorouracil (5-FU) at 25µg/mL over the growth of human ovary cancer cell line OVCAR-03, throughout a 120-hour exposure.

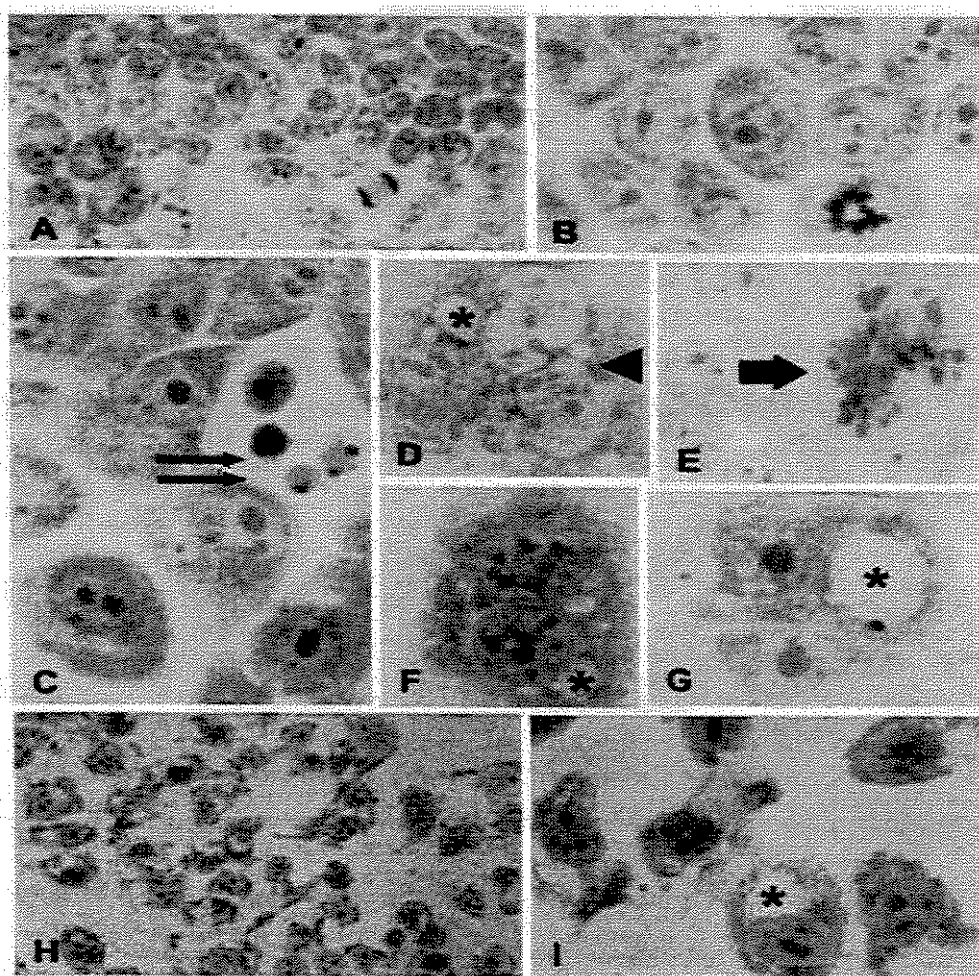


Figure 2. Cytochemical analysis at optical microscopy of OVCAR-03 cells were stained by toluidine blue after 48 hours of the following treatment: A, B: non-treated cells; C to I: cells exposed to increasing concentrations of triterpene active compound: C (2,5µg/mL); D, E (25µg/mL); F,G (50µg/mL) H, I (250µg/mL). Bar Scale: A: 40 µm and B to I: 16µm. (*: cytoplasmatic vacuolization; head of arrow: multinucleation; arrow: nuclear fragmentation; double arrow: cellular fragmentation).

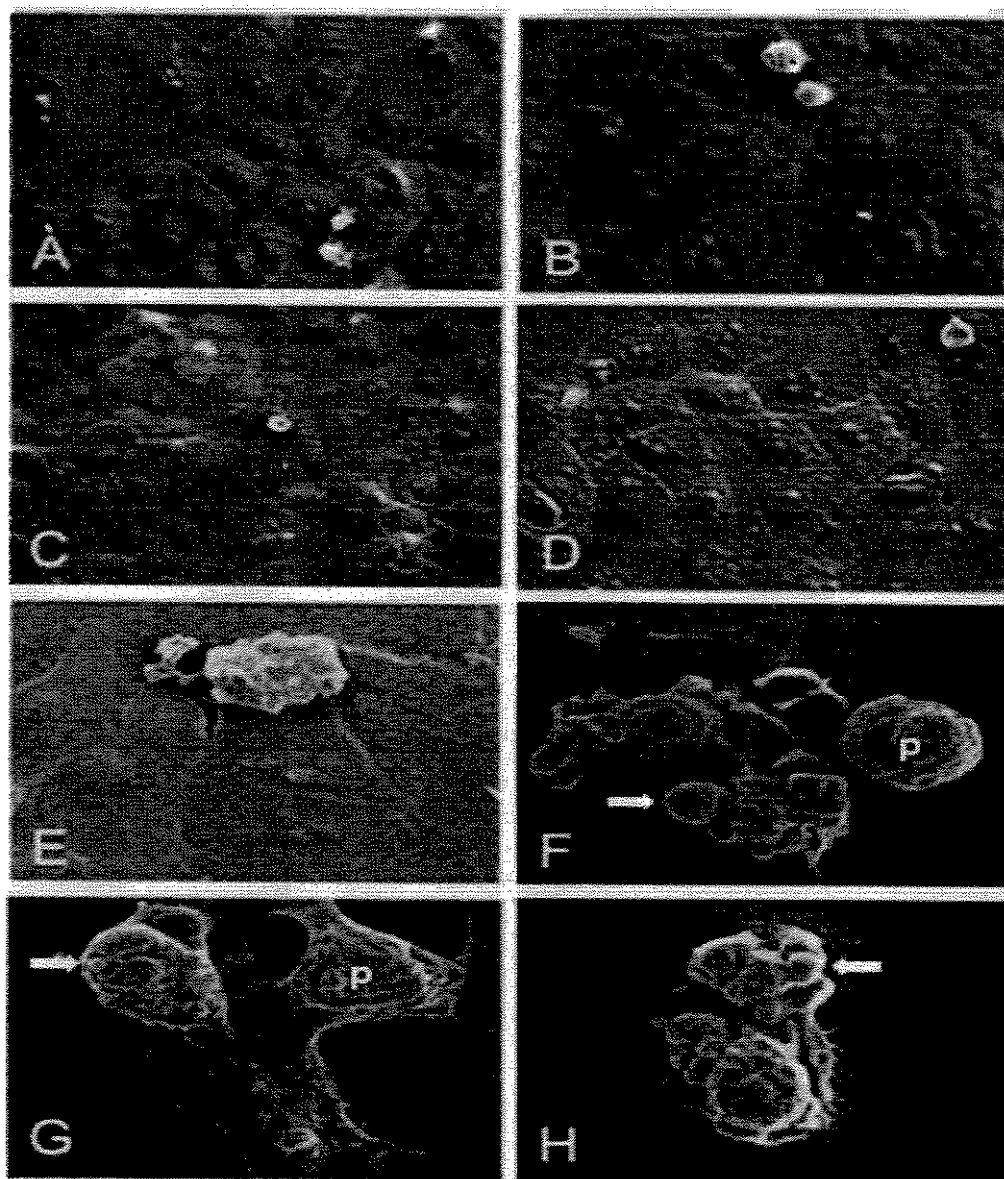


Figure 3. Scanning electron microscopy of OVCAR-03 cells after the following treatment: A, B: non-treated cells; C to H: cells exposed to increasing concentration of triterpene active compound; C (2,5 $\mu\text{g/mL}$), D (25 $\mu\text{g/mL}$), E, F (50 $\mu\text{g/mL}$) G, H (250 $\mu\text{g/mL}$). Bar Scale: A,B,C, D: 40 μm and E, F, G, H: 16 μm . (arrow: membrane blebbing; p: pits).

Conclusão Geral

Conclusão Geral

O trabalho fitoquímico de isolamento e identificação, orientado pelos testes de atividade antiproliferativa, possibilitou o isolamento e identificação de uma substância (MAA-266), identificada como o triterpeno 2 β , 3 β dihydroxy-urs-12-ene-28-oic-acid, que apresenta atividade antiproliferativa, concentração-dependente, nas linhagens hormônio dependentes (ovário, próstata e mama), revelando citotoxicidade para todas as linhagens avaliadas a partir de 70 $\mu\text{g/mL}$. Considerando a similaridade estrutural entre os triterpenos e os esteróides, os resultados obtidos apontam para estudos com o receptor hormonal e a sinalização intramolecular envolvida.

A avaliação da atividade de MAA-266 sobre a síntese da PGE₂ em mucosa gástrica de ratos e em célula tumoral humana HT-29 demonstrou que este composto foi capaz de reduzir drasticamente a concentração deste prostanóide, sugerindo que o mecanismo de ação antiproliferativo também possa envolver a biossíntese dos eicosanóides.

A atividade antiproliferativa de MAA-266 não é dependente do tempo de exposição da célula ao mesmo, descartando a hipótese de que citotoxicidade do mesmo esteja relacionada à interferência com o metabolismo dos ácidos nucleicos, o que pode ser confirmado pela análise da estrutura química deste composto que não apresenta similaridade com os metabólitos endógenos.

A citotoxicidade do composto MAA-266 não está relacionada com a intercalação nos ácidos nucleicos, já que os resultados obtidos demonstraram que o composto MAA-266 foi inativo no ensaio do “DNA-Methylgreen”.

A avaliação morfológica de células das linhagens V-79 e OVCAR-03 expostas a diferentes concentrações do composto MAA-266 (50, 25 e 2,5 µg/mL), por 48 horas, demonstrou várias aberrações mitóticas como vacuolização citoplasmática, presença de heterocromatina supercondensada e corpos apoptóticos. Estas alterações morfológicas apontam para um provável mecanismo pró-apoptótico.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

ABRAMSON, S.B.; AMIN, A.R.; CLANCY, R.M.; ATTUR, M. The role of nitric oxide in tissue destruction. **Practice & Research in Clinical Rheum.**; 15(5): 831-845, 2001.

ALBINA; J.E.; CALDWELL, M.D.; HENRY JR, W.R.; MILLS, C.D. Regulation of macrophage functions by L-arginine. **J. Exp. Medicine**, 169: 1021-1029, 1989.

ALLEGRA; C.J.; FINE; R.L.; DRAKE; J.C.; CHABNER; B.A. The effect of methotrexate on intracellular folate pools in human MCF-7 breast cancer cells. Evidence for direct inhibition of purine synthesis. **J. Biol. Chem.**; 261: 6478-6485, 1986.

ANTÔNIO, M.A.; KOHN, L.K.; DIAS, P.C.; CIAMPI, K.M.M.; FOGLIO, M.A.; TEIXEIRA, A.F.; CARVALHO, J.E.; PIZÃO, P.E. Triperpene isolated from *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. (Ericaceae): the correlationship between its antiproliferative activity and COX inhibition. **Pharmacological Research** (submitted), 2004.

ANTÔNIO; M.A.; KOHN, L.K.; CIAMPI, K.M.M.; FOGLIO, M.A.; RODRIGUES, R.F.; SOUSA, I.M.O; ARGENTIN, R.F.P.; AMARAL, M.C.E.; BITTRICH, V.; CARVALHO, J.E.; PIZÃO, P.E. Antiproliferative activity; isolation and identification of *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. (Ericaceae) active compound. **Phytomedicine** (submitted), 2003.

ARAJ, K.; OGSTON, P.; BEARD, P. Murderous hairpins. **Nature**, 412: 914-916, 2001.

ARNOLD, A.A.; CHUNG, D.C.; SMITH, A.P.; LOUIS, D.N.; GRAEME-COOK, F.; WARSHAW, A.L. Monoclonality and abnormal parathyroid genes in parathyroid adenomas. **N. Engl. J. Med.**; 318: 658, 1968.

ASKARI, A.; WORTHEN, L.R.; SHIMIZU, Y. Gaylussacin; a new stilbene derivative from a species of *Gaylussacia*. **Lloydia**, 35: 49-54, 1972.

BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A.; WURTELE, E.S.; BOLLINGER, W.H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, 228: 1154-1160, 1985.

BALLINGTON, J.R.; BALLINGER, W.E.; MANESS, E.P. Anthocyanin, aglycone and aglycone-sugar content of fruits of temperate North American species of *Gaylussacia* (Ericaceae). **Can J. Plant Sci**, 68: 247-253, 1988.

BARBISAN, S.F.; MELLO, M.L.S.; RUSSO, J.; VIDAL, B.C. Apoptosis and catastrophic cell death in benzo(a)pyrene-transformed human breast epithelial cells. **Mutation Research**, 431: 133-139, 1999.

BAROCELLI, E.; IMPICCIATORE, M. Study of the antisecretory and antiulcer mechanism of a new indenopyridazinone derivative in rats. **Pharmacological Research**, 35(5): 487-492, 1997.

BONJEAN, K.; DE PAUW-GILLET, M.C.; BASSLER, R.; QUENTIN-LECLERCQ, J.; ANGENOT, L.; WRIGHT, W.C. Critical evaluating of the DNA-methyl green assay: application to some indole alkaloids. **Phytochem. Res.**, 10: S159-S160, 1996.

BOYD, M.R. Status of the NCI Preclinical Antitumor Drug Discovery Screen. **Principles & Practice of Oncology**, 10(3): 1-12, 1989.

BRAÑA, M.F.; CACHO, M.; GRADILLAS, A.; PASCUAL-TERESA, B.; RAMOS, A. Intercalators as Anticancer Drugs. **Current Pharm Design**, 7(17): 1745-80, 2001.

BRENTANI, R.R.; CHAMMAS, R.; COELHO, F.R.G. Mecanismos de invasão e metástases. In: Brentani; M.N.; Coelho; F.R.G.; Iyeyasu; H.; Kowalski; L.P.; ed. – Bases da Oncologia. 1a ed.; São Paulo; Livraria e Editora Marina; p. 91-98, 1998.

BRUMMELKAMP, T.R.; BERNARDS, R.; AGAMI, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. **Cancer Cell**, 2: 243-247, 2003.

BURRES, N.S.; FRIGO, A.F.; RASMUSSEN, R.R.; MCALPINE, J.B. A colorimetric microassay for the detection of agents that interact with DNA. **J. Nat. Prod.**, 55(11): 1582-1587, 1992.

BURRIS, H.A.; FIELDS, S.M. Topoisomerase I inhibitors. An overview of the camptothecins analogs. **New Drugs Therapy**, 8(2): 333-355, 1994.

BURSCH, W. Active cell death induced by the anti-estrogens Tamoxifen and ICI 164384 in mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. **Carcinogenesis**, 17: 1595-1607, 1996.

BUSS, A.D. The future role of natural products in drug discovery. In: *Bioassay Methods in Natural Product Research and Drug Development*; Ed. By L. Bohlin and J.G. Bruhn; Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 1999.

CAIRNS, J. Mutation selection and the natural history of cancer. **Nature**, 255, 197-201, 1975.

CAIRNS, J. The origin of human cancers. **Nature**, 289: 353-7, 1981.

CALABRESI, P.; CHABNER, B.A. Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Gilman; A.G.; Goodman; L.S.; ed. – The Pharmacological Bases of Therapeutics. 9^a ed.. New York McGraw-Hill Companies; p. 1225-1232, 1996.

CALABRESI, P.; CHABNER, B.A. Chemotherapy of neoplastic diseases. In: The pharmacological basis of therapeutics (Eds. J.G. Hardman and L.E. Limbird): 1381-1459. McGraw Hill; New York, 2001.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety; quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Biol. Res.**, 33: 179-189, 2000.

CHABNER, B.A. In defense of cell-line screening. **J. Nat. Cancer Inst.**, 82(13): 1083-1085, 1990.

CHAMBERS, A.F.; GROOM, A.C.; MacDONALD, I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Rev. Cancer**, 2: 563-572, 2002.

CHAMBERS, A.F.; NAUMOV, G.N.; VARGHESE, H.J.; NADKARNI, K.V.; MacDONALD I.C.; GROOM, A.C. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. **Surg. Oncol. Clinics of North America**, 10: 243-255, 2001.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROSS, K.L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COXf3, a cyclooxygenase–1 variant inhibited by acetaminophen

and others analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Proc Natl Acad Sci USA**, 99:13926-31, 2002.

CHANG, J. Medicinal Herbs: Drugs or Dietary Supplements? **Biochemic Pharmacology**, 59: 211-219, 2000.

CHHATWAL, V.J.; MOOCHHALA, S.M.; CHAN, S.T.; NGOI, S.S. Nitric oxide and cancer. **Medical Hypothesis**; 46:21-24, 1996.

CIPOLLINI, M.L.; STILES, E.W. Antifungal activity of ripe ericaceous fruits: phenolic-acid interactions and palatability for dispersers. **Biochem. System. Ecol.**, 20: 501-514, 1992.

COELHO, F. Controle do câncer. In: Brentani; M.N.; Coelho; F.R.G.; Iyeyasu; H.; Kowalski; L.P.; ed. – Bases da Oncologia. 1ª ed.; São Paulo; Livraria e Editora Marina; p. 1-21, 1998.

COOPER, S. Reappraisal of serum starvation; the restriction point; G0 and G1 phase arrest points. **FASEB J.**; 17: 333-340, 2003.

CORBETT, T.H.; VALERIOTE, F.A.; BAKER, L.H. Is the P388 murine tumor no longer adequate as a drug discovery model? **Invest. New Drugs**, 5: 3-20, 1987.

CORRÊA, P.M. Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas 5: 411. Brasília: Ministério da Agricultura / Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal; Rio de Janeiro, 1942.

COSTELLO, R.T.; FAURIAT, C.; REY, J.; GASTAUT, J.A.; OLIVE, D. Immunobiology of haematological malignant disorders: the basis for novel immunotherapy protocols. **The Lancet Oncology**, 5(1): 47-49, 2004.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; Robbins Pathologic Basis of Disease; 6th ; WB Saunders International; Chapters 1, 2, 4, 6 e 8, 1999.

CRAAG, G.M.; NEWMAN, D.J. Discovery and Developmente of natural Antineoplastic Agents from Natural Sources. **Cancer Investigation**, 17(2):153-163, 1999.

CRAGG, G.M.; BOYD, M.R.; CARDELLINA II, J.H.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M.; McCLOUD, T.G. Ethnobotany and drug discovery: the experience of the U.S. National Cancer Institute. In: Ethnobotany and the Search for New Drugs. Ciba Foundation Symposium 185; edited by D.J. Chadwick; J. Marsh; Chichester; U.K.; Wiley & Sons; pp 178-196, 1994.

CRAGG, G.M.; BOYD, M.R.; KHANNA, R.; KNELLER, R.; MAYS, T.D.; MAZAN, K.D.; NEWMAN, D.J.; SAUSVILLE, E.A. International collaboration in drug discovery and development: the NCI experience. **Pure Appl. Chem.**, 71: 1619-1633, 1999.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. **Cancer Investigation**, 17(2): 153-163, 1999.

CREEMERS, G.J.; LUND, B.; VERWEIJ, J. Topoisomerase I inhibitors: topotecan and irinotecan. **Cancer Treat. Rev.**, 20: 73-96, 1994.

DANNENBERG, A.J.; ALTORI, N.K.; BOYLE, J.O.; DANG, C.; HOWE, L.R.; WEKSLER, B.B.; SUBBARAMAIAH, K. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. **Lancet Oncol.**, 2:544-51, 2001.

DIAZ, A.; CHEPENIK, K.P.; KORN, J.M.; REGINATO, A.M.; JIMENES, S.A. Differential regulation of ciclooxigenases 1 and 2 by interleukin – 1 beta; tumor necrosis factor alpha; and transforming growth factor – beta 1 in human lung fibroblasts. **Exp. Cell Res.**, 63: 222-29, 1998.

DRIMMELER, S.; ZEIHNER, A.M. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. **Nitric Oxide**, 1(4): 275-281, 1997.

EBERHART, C.E.; DUBOIS, R.N. Eicosanoids and gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, 109: 285-301, 1995.

EVAN, G.; VOUSDEN, K.H. Proliferation; cell cycle and apoptosis. **Nature**, 44: 342-348, 2001.

FEARON, R.R.; HAMILTON, S.R.; VOGELSTEIN, B. Clonal analysis of human colorectal tumors. **Science**, 238: 193-197, 1987.

FELLOWS, L.E. Pharmaceuticals from traditional medicinal plants and others: future prospects
In: Coombs JD; ed. New drugs from natural sources. London: IBC Technical Services, 1995.

FERLAY, J.; PARKIN, D.M.; PISANI, P. IARC Press. **WHO**, 1998.

FERRI, G.M. Contribuição ao conhecimento da ecologia do cerrado e da Caatinga. Estudo; Ciências e Letras, 12: 1-170, 1975.

FERRI, G.M. Plantas do Brasil. Espécies do cerrado 50 –1. Editora Edgard Blücher; São Paulo, 1969.

FERRI, G.M. Vegetação Brasileira. Editora Itatiaia; Belo Horizonte; Reconquista do Brasil; New Series; 26: 51-69, 1980.

FIDLER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature Ver. Câncer**, 3: 453-458, 2003.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N. Engl. J. Med.**, 285: 1182-1186, 1971.

FOULDS, L. Neoplastic Development. New York; Academic Press, 1975.

FOX, S.B.; GASPARINI, G.; HARRIS, A.L. Angiogenesis: pathological; prognostic; and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. **The Lancet Oncology**, 2(5): 278-289, 2001.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. In: Farmacologia Clínica - Fundamentos Da Terapêutica Racional, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2ª edição, 1998.

GARCIA, J.; SÁNCHEZ, M.S.; RIMBAU, V.; FORN, J. Lack of correlation between antiinflammatory activity and inhibition of 3',5'-cyclic AMP phosphodiesterase activity in a series of antiinflammatory agents. **Ver. Esp. Fisiol.**, 34: 55-60, 1978.

GASPARINI, G.; LONGO, R.; SARMIENTO, R.; MORABITO, A. Inhibitors of cyclooxygenase 2: a new class of anticancer agents? **Lancet Oncol.**, 4: 605-15, 2003.

GIRALDELO, M.M.; ZAPPELLINI, A.; MUSCARÁ, M.N.; DE LUCCA, I.; HYSLOP, S.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Effect of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation *in vitro*. **Eur. J. of Pharmacology**, 257: 87-93, 1994.

GOLDIN, A.; VENDITTI, J.M.; MacDONALD, J.S.; MUGGIA, F.M.; HENNEY, J.E.; DEVITA, V.T.. Current results of the screening program at the Division of Cancer Treatment National Cancer Institute. **Eur. J. Cancer**, 17: 129-142, 1981.

GRINDEY, G.B. Current status of cancer drug development: failure or limited success? **Cancer Cel.**, 2(6): 163-171, 1990.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 1996. NIH Publication nº 82-23 revised.

HAJRI, A.; METZGER, E.; VALLAT, F.; COFFY, S.; FLATTER, E.; EVRARD, S.; MARESCAUX, J.; APRAHAMIAN, M. Role of nitric oxide in pancreatic tumor growth: in vivo and in vitro studies. **Brit. J. Cancer**; 78(7): 841-849, 1998.

HAMBURGUER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in Plants: the Link between Phytochemistry and Medicine. **Phytochemistry**, 30(12):3964-3974, 1991.

HARTWELL, L.H.; KASTAN, M.B. Cell cycle control and cancer. **Science**, 266:1821-1828, 1994.

HU, W.; KAVANAGH, J.J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. **Lancet Oncol.** Dec; 4(12): 721-9, 2003.

International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS). Geneva: 1985.

JAATTLEA, M. Programmed cell death: many ways for cells to die decently. **Ann. Med.**, 34: 480-188, 2002.

JENKINS, D.C.; CHARLES, I.G.; THOMSEN, I.I. Roles of nitric oxide in tumor growth. **Proc. Nat. Ac. Sciences**, 92: 4392-4396, 1995.

JOHNSON, R.K. Screening methods in antineoplastic drug discovery. **J. Natural Cancer Inst.**, 82(13): 1082-1083, 1990.

KATORI, M.; MAJIMA, M. Multiples roles of inducible cyclooxygenase-2 and its selective inhibitors. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, 190(6): 547 –258, 1997.

KATZUNG, B.G. In: *Farmacologia Básica & Clínica*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 8ª edição, 2003.

KIM, R.; TANABE, K.; UCHIDA, Y.; EMI, M.; INOUE, H.; TOGE, T. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis: the contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, 50: 343-352, 2002.

KINGSBURY, W.D.; BOEHM, J.C.; JAKAS, D.R.; HOLDEN, K.G.; HECHT, S.M.; GALLAGHER, G.; CARANFA, M.J.; McCABE, F.L.; FAUCETTE, L.F.; JOHNSON, R.K.; HERTZBERG, R.P. Synthesis of water-soluble (aminoalkyl)camptothecin analogues: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity. **J. Med. Chem.**, 34: 98-107, 1991.

KINGSBURY, W.D.; HERTZBERG, R.P.; BOEHM, J.C.; CARANFA, M.J.; HOLDEN, K.G.; JAKAS, D.R. Chemical synthesis and structure-activity-relationships related to SKF 104864; a novel watersoluble analog of camptothecin. **Proc. Am. Soc. Cancer Res.**, 30: 622, 1989.

KLEIN, A.L.; WOLD, L.E.; REN, J. The cyclooxygenase-2 product prostaglandin E₂ modulates cardiac contractile function in adult rat ventricular cardiomyocytes. **Pharmacol. Res.**, 49: 99-103, 2004.

KOKI, A.T.; MASFERRER, J.L. Celecoxib a specific COX -2 inhibitor with anticancer properties. **Cancer Control**, 9:28-35; 2002.

KOROVIN, A.V.; TKACHEV, A.V. Synthesis Of Quinoxalines Fused With Triterpenes; Ursolic Acid and Beulin Derivatives. **Russian Chemical Bulletin**, 50(2): 304-310, 2001.

KRONCHE, K.D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how; why; when and where? **Nitric Oxide**, 1(2): 107-120, 1997.

LACONI, E.; PANI, P.; FARBER, E. The resistance phenotype in the development and treatment of cancer. **The Lancet Oncol.**, 1(4): 235, 2000.

LEE, K.H. Novel Antitumoral Agents From Higher Plants. **Med. Res. Rev.**, 19(6): 569-596, 1999.

LIU, Q.; CHAN, S.T.F.; MAHENDRAN, R. Nitric oxide induces cyclooxygenase expression and inhibits cell growth in colon cancer cell lines. **Carcinogenesis**, 24: 637-642, 2003.

LIU, X.H.; KIRSCHENBAUM, A.; YAO, S.; LEE, R.; HOLLAND, J.F.; LEVINE, A.C. Inhibition of Cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and The Growth Of Prostate Cancer In Vivo. **J. Urology**, 164: 820-825, 2000.

LONTSI, D.; SONDENGAM, B.L.; BODO, B.; MARTIN, M.T. Kalaic Acid; A New Ursane-Type Saponin from *Musanga cecropoides*. **Planta Medica**, 64: 18-191, 1998.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. ^{13}C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids-A Compilation and Some Salient Features. **Phytochemistry**, 37(6): 1517-1575, 1994.

MASFERRER, J.L.; LEAHY, K.M.; KOKI, A.T.; ZWEIFEL, B.S.; SETTLE, S.L.; WOERNER, M.; EDWARDS, D.A.; FLICKINGER, A.G.; MOORE, R.J.; SEIBERT, K. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitor. **Cancer Research**, 60: 1306-1311, 2000.

MATTOS, D.; GOMES, M.; FREITAS, R.; BERNADO-FILHO, M. Model to evaluate the toxic effect of drugs: vincristine effect in the mass of organs and in the distribution of radiopharmaceuticals in mice. **Mutation Research**, 496: 137-143, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Instituto Nacional do Câncer- INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estatísticas>. Acessado em 21 de janeiro de 2004, 2003.

MUGGIA, F.M. Closing the loop: provinding feedback on drug development. **Cancer Treat. Rep.**, 71(1): 1-2, 1987.

MUGGIA, F.M.; CREAVER, P.J.; HANSEN, H.H.; COHEN, M.H.; SELAWRY, O.S. Phase I clinical trial of weekly and daily treatment wth camptothecin (NSC 100880). **Cancer Chem. Rep.**, 54: 461-470, 1970.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. **J Nat Prod**, 66: 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, 66: 1022-1037, 2003.

NYGREN, P.; LARSSON, R. Overview of the clinical efficacy of investigational anticancer drugs. **J. Int. Medic.**, 253: 46- 75, 2003.

OSBORNE, M.; BOYLE, P.; LIPKIN, M. Cancer prevention. **Lancet**, 349(11): 27-30, 1997.

PAGET, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **Cancer Metastasis Rev.**, 8: 98-101, 1989.

PARDEE, A. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. **Proc. Nat. Ac. Sci. USA**, 71: 1286-1290, 1974.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S. (ed.). Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur. J. Cancer**; 37: S4-S66, 2001.

PARKIN, D. M.; WHELAN, S.L.; FERLAY, J.; RAYMOND, L.; YOUNG, J. (ed.). Cancer Incidence in Five Continents. Lyon: IARC; . v.3 . IARC Scientific Publications; n.143), 1997.

PARKIN, D.M.; PISANI, P.; FERLAY, J. Global Cancer Statistics. **CA - A Cancer Journal for Clinicians**; 49(1): 33-64, 1999.

PATRICK, G.L. Nucleic acids: Drugs acting on DNA. In: An introduction to medicinal chemistry. 2^a Ed.; Oxford University Press; New York; United States; 7(7.2): 127-132, 2001.

PEGGS, G.; MacKINNON, S. Imatinib mesylate – the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.**, 348: 1048-1050, 2003.

PEZZUTO, J.M. Plant Derived Anticancer Agents. **Biochemical Pharmacology**, 53: 121-133, 1997.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochem.**, 56: 237-243, 2001.

PISANI, P.; PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY J.. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. **Int. J. Cancer**, 83:18-29. 1999.

POMMIER, Y. Eukaryotic DNA Topoisomerase I: genome gatekeeper and its intruders; camptothecins. **Semin. Oncol.**, 23(1): 3-10, 1996.

PONDER, B.A.J.; JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L.; WEATHERALL, D.J. Direct examination of the clonality of carcinogen-induced epithelial dysplasia in chimeric mice. **J. Natl. Cancer Inst.**, 77: 967, 1986.

PORTER, P.L.; MALONE, K.E.; HEAGERTY, P.J.; GATTI, L.; ALEXANDER, G.; FIRGO, E.; DALING, J.; ROBERTS, J. Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E; alone and in combination; correlate with survival in young breast cancer patients. **Nat. Med.**, 3: 222-225, 1997.

POTMESIL, M. Camptothecins: from bench research to hospital wards. **Cancer Res.**, 54: 1431-1439, 1994.

RAJE, N.; ANDERSON, K.C. Thalidomide and immunomodulatory drugs as cancer therapy. **Curr. Opin. Oncol.**, 14: 635- 640, 2002.

RANG, H. P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. In: Farmacologia. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 4ª edição, 2001.

RANG, H. P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. In: Farmacologia. Editora Elsevier, América do Sul, 5ª edição, 2004.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, 39: 603-613, 2001.

RIMBAU, V.; FORN, J. Synthesis of 3H-labelled flupamesone. **J. Laboratory Comp. Radiopharm.**, 19: 721-724, 1982.

ROWINSKY, E.K.; GILBERT, M.; McCGUERE, W.P.; NOE, D.A.; GROCHOW, L.B.; FORASTIERE, A.A.; ETTINGER, D.S.; LUBEJKO, B.G.; CLARK, B.; SARTORIUS S.E.; CORNBLATH, D.R.; HENDRICKS, C.B.; DONEHOWER, R.C. Sequences of taxol and cisplatin: a phase I and pharmacologic study. **J. Clin. Oncol.**, 9: 1692-1703, 1995.

SCHIFF, P.B.; FANT, J.; HORWITZ, S.B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**, 277: 665, 1979.

SEPP-LORENZINO, L.; RANDS, E.; MAO, X.; CONNOLLY, B.; SHIPMAN, J.; ANTANAVAGE, J.; HILL, S.; DAVIS, L.; BECK, S.; RICKERT, K.; COLL, K.; CIECKO, P.; FRALEY, M.; HOFFMAN, W.; HARTMAN, G.; HEIMBROOK, D.; GIBBS, J.; KOHL, N.; THOMAS, K. A Novel Orally Bioavailable Inhibitor of Kinase Insert Domain-Containing Receptor Induces Antiangiogenic Effects and Prevents Tumor Growth in Vivo. **Cancer Res.**, 64: 751-756, 2004.

SHOEMAKER, R.H. New approaches to antitumor drug screening: the human tumor colony forming assay. **Cancer Treat. Rep.**, 71(1): 9-12, 1986.

SIEBER, O.M.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I.P.M. Genomic instability – the engine of tumorigenesis. **Nature Rev.**, 3: 701-708, 2003.

SIMPSON, A.J.G.; CABALLERO, O.L.; DANÍ, S.U. Oncogenes e genes supressores. In: Brentani; M.N., Coelho, F.R.G.; Iyeyasu, H.; Kowalski, L.P., ed. – Bases da Oncologia. 1a ed., São Paulo; Livraria e Editora Marina; p. 53-70, 1998.

SJÖDAHL, R. Extent; Mode and Dose Dependence of Anticancer Effects. **Am. J. Med.**, 110(1A): 66S-69S, 2001.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Nat. Cancer Inst.**, 82: 1107-1118, 1990.

SOUZA-FAGUNDES, E.M.; QUEIROZ, A.B.R.; MARTINS FILHO, O.A.; GAZZINELLI, G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ALVES, T.N.A.; ZANI, C.L. Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Mem. Ins. Osvaldo Cruz**, 97(8): 1207-1212, 2002.

STEEG, P.S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. **Nature Rev.**, 3: 55-572, 2003.

SUGARBAKER, P.H. Metastatic inefficiency: the scientific basis for resection of liver metastasis from colorectal cancer. **J. Surg. Oncol. Suppl.**, 3: 158-160, 1993.

SWANTON, C. Cell-cycle targeted therapies. **The Lancet Oncol.**, 5: 27-36, 2004.

TETSU, O.; McCORMICK, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. **Nature**, 398: 422-426, 1999.

THOMAS, G. Fármacos cujos alvos são os ácidos nucléicos. In: Química Medicinal: uma introdução. 1ª Ed.; Ed. Guanabara Koogan; Rio de Janeiro; RJ; 10.13: 313-323, 2003.

THUN, M.J.; HENLEY, S.J.; PATRONO, C. Nonsteroidal anti – inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic; pharmacologic; and clinical issues. **J. Natl. Inst.**, 99: 252-66, 2002.

TOPLISS, J.G.; CLARK, A.M.; ERNST, E.; HUFFORD, C.D.; JOHNSTON, G.A.R.; RIMOLDI, J.M.; WEIMANN, B.J. Natural and Synthetic Substances Related to Human Health. **Pure Appl. Chem.**, 74: 1957–1985, 2002.

TZAHAR, E.; YARDEN, Y. The Erb/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal li-gands. **Biochem. Biophys. Acta**, 1377: M25-M37, 1998.

UMEMOTO, A.; KOMAKI, K.; MONDEN, Y.; SUWA, M.; KANNO, Y.; KITAGAWA, M.; SUZUKI, M.; LIN, C.X.; UHEYAMA, Y.; MOMEN, M.A.; RAVINDERNATH, A.; SHIBUTANI, S. Identification and quantification of Tamoxifen-DNA adducts in the liver of rats and mice. **Chem. Res. Toxicol.**, 14 (8): 1006-1013, 2001.

VERDECCHIA, A.; MARIOTTO, A.; CAPOCACCIA, R.; GATTA, G.; MICHELI, A.; SANT, M.; BERRINO, F. Incidence and prevalence of all cancerous disease in Italy: trends and implication. **Eur. J. Cancer**, 37:1149-1157, 2001.

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

VERPOORTE, R Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Develop. Trends**, 3: 232-238, 1998.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. **J. Pharm. Pharmacol.**, 52: 253-262, 2000.

VERWEIJ, J.; JONGE, M.J.A. Achievements and future of Chemoterapy. **Eur. J. Cancer**, 36: 1479-1487, 2000.

VON HOFF, D.D. Use of a radiometric system to screen for antineoplastic agents: correlation with a human tumor cloning system. **Cancer Res.**, 45(9): 4032-4038, 1985.

WALKER, K.; CROTEAU, R. Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA: taxane2- O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. **Proc. Nat. Ac. Sc. U.S.A.**, 97: 13591-13596, 2001.

WALL, M.E. Camptothecin and taxol: discovery to clinic. **Med. Res. Rev.**, 18(5): 299-314, 1998.

WALL, M.E. Camptothecin and taxol: discovery to clinic. **Med. Res. Rev.**, 18(5): 299-314, 1998.

WALL, M.E. et al. Plant anti-tumor agent. 1. The isolation and structure of camptothecin; a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **J. Am. Chem. Soc.**, 88: 3888-3890, 1966.

WALL, M.E.; WANI, M.C.; COOK, C.E. Plant anti-tumor agents: I. The isolation and structure of camptothecin; a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **J. Am. Chem. Soc.**, 88: 3888-3890, 1966.

WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGOON, P.; McPHAIL, A.T. Plant antitumor agent.VI.The isolation and struture of taxol; a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*, **J. Am. Chem. Soc.**, 93: 2325-2327, 1971.

WEISS, L. Metastatic inefficiency. **Adv. Cancer Res.**, 54: 159-211, 1990.

WILLINGHAM, M.C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. **J. Histochem. Cytochem.**, 47(9): 1101-1109, 1999.

WINK, D.A.; VODOVOTZ, Y.; COOK, J.A.; KRISHNA, M.C.; KIM, S.; COFFIN, D.; DEGRAFF, W.; DELUCA, A.M.; LIEBMANN, J.; MITCHELL, J.B. The role of nitric oxide chemistry in cancer treatment. **Biochemistry (Mosc.)**, 63(7): 802-809, 1998.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 111: 544-547, 1962.

YOUNG, A.; BLAKESLEY, R. Sequencing plasmids from single colonies with the dsDNA cycle sequencing system. **Focus**, 13:13, 1991.

ZIJLSTRA, J.G.; DE JONG, S.; DE VRIES, E.G.E.; MULDER, N.H. Topoisomerases; new targets in cancer chemotherapy. **Med. Oncol. Tumor Pharmacother.**, 7: 11-18, 1990.

Apêndice 1

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS
DA *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. (ERICACEAE)

Isolamento e identificação dos princípios ativos da

***Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.**

(Ericaceae)

1. Processamento Fitoquímico

1.1. Coleta

O material vegetal foi coletado na cidade de Mogi-Guaçu, Fazenda Campininha, reserva de cerrado em dezembro/97. A identificação botânica desta espécie foi realizada pelos botânicos Prof^{es}. Dr^{as} M. Carmen E. do Amaral e pelo Prof. Dr. Volker Bittrich do Departamento de Botânica do IB – UNICAMP. A exsicata da *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. encontra-se depositada no Herbário do IB/UNICAMP, UEC-266 .

1.2. Preparação do Material Vegetal

O material vegetal foi seco em estufa com ventilação a 45° C marca Fabbe, modelo 170. O material vegetal seco foi moído em um triturador de facas, marca Stephen, modelo UM 40.

1.3. Preparação dos Extratos Brutos

Cinquenta gramas de material vegetal moído foram submetidos ao processo de maceração com 400 ml de diclorometano durante 24 h por duas vezes. Os filtrados recolhidos foram misturados, tratados com Na₂ SO₄, filtrados e evaporados em rotavapor numa temperatura de 40⁰ a obtenção do extrato bruto diclorometano (EBD).

O resíduo vegetal do processo de maceração com diclorometano foi retomado 400 ml de etanol 95% para maceração durante 24 h por duas vezes. Os filtrados recolhidos foram misturados, tratados com Na₂ SO₄, filtrados e evaporados em rotavapor numa temperatura de 55⁰ C até completa eliminação do etanol e posteriormente liofilizado resultando no extrato bruto etanólico (EBE).

1.4. Fracionamento do Extrato Bruto Diclorometânico

1.4.3. Fracionamento em Coluna Seca

Resultados anteriores demonstraram que a atividade antiproliferativa de EBD era superior a do EBE. O perfil cromatográfico demonstrou que EBD apresentava todos os compostos presentes nas frações 6, 7 e 9-10, as quais também apresentaram atividade antiproliferativa (vide resultados no item 2). Desta forma, o fracionamento fitoquímico foi direcionado no sentido de melhorar o isolamento e a purificação dos compostos responsáveis pela atividade farmacológica de EBD,

através da realização de uma coluna seca. Para a realização desta coluna de Silicagel 60 (Merck, 0,063- 0,200mm - 8 cm de diâmetro e 20 cm de altura) foram utilizados 7,1 g de EBD e 4,1g de sílica, sendo o eluente uma mistura de clorofórmio – metanol 1% (500 mL). A coluna, após eluição, foi dividida em cinco frações de 4 cm cada e extraídas com metanol, fornecendo as frações 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Estas foram submetidas à cromatografia de camada delgada (eluente: clorofórmio metanol 1% e revelador: anisaldeído). O perfil cromatográfico dessas frações está descrito na figura 1.

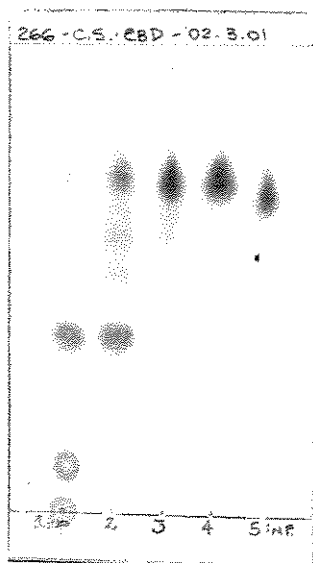


Figura 1: Perfil cromatográfico das frações 1, 2, 3, 4 e 5 obtidas a partir do EBD da *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.

De acordo com o perfil cromatográfico, as frações foram reagrupadas da seguinte forma: a fração 1 foi armazenada já que a mesma apresentava o mesmo perfil cromatográfico do EBD. As frações 2 e 3 foram unidas, assim como as frações 4 e 5, sendo que esta última fração foi armazenada para posterior teste de atividade farmacológica.

A partir da fração 2-3 foi realizada uma nova coluna seca. Para a realização desta coluna de Silicagel 60 (Merck, 0,063- 0,200mm - 8 cm de diâmetro e 20 cm de altura) foram utilizados 4,6 g da fração 2-3, sendo o eluente uma mistura de clorofórmio – metanol 1% (400 mL). A coluna, após eluição, foi dividida em cinco frações de 4 cm cada e extraídas com metanol, fornecendo 05 frações. As frações obtidas (1', 2', 3', 4' e 5') foram submetidas à cromatografia de camada delgada (eluente: clorofórmio metanol 1% e revelador: anisaldeído). O perfil cromatográfico dessas frações está descrito na figura 2.

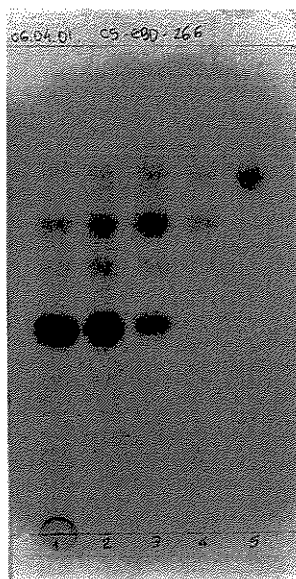


Figura 2: Perfil cromatográfico das frações 1', 2', 3', 4' e 5' obtidas a partir da fração 2-3 da *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.

Com o intuito de obtermos maiores quantidades dos componentes principais de cada fração, estas foram reagrupadas conforme as suas similaridades e recromatografadas sucessivamente em coluna de silicagel, obtendo-se as frações A (frações 4-5), B (fração 3'), C (fração 1'), D (fração

3''') e E (fração 2'''''), que foram submetidas à teste de avaliação da atividade antiproliferativa. O perfil cromatográfico destas frações está descrito na figura 3.

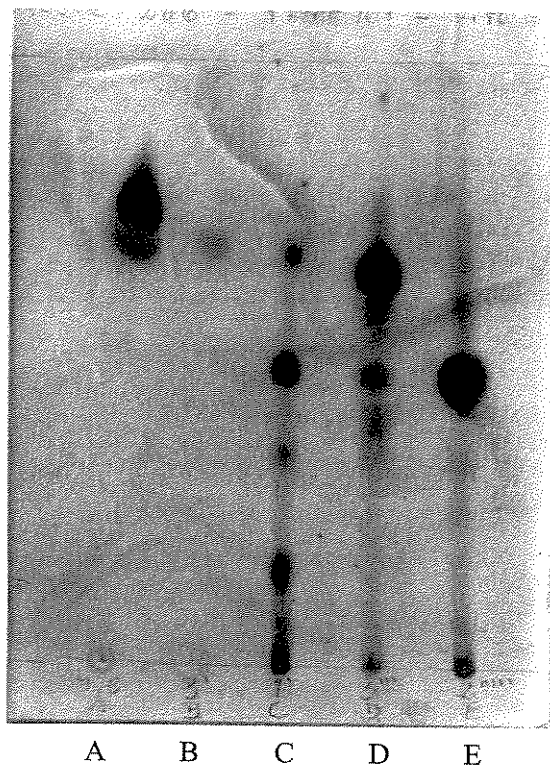


Figura 3: Perfil cromatográfico das frações A, B, C, D e E obtidas a partir dos fracionamentos sucessivos das frações de *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. reagrupadas anteriormente.

1.4.4. Fracionamento em Coluna Clássica

Com o objetivo de isolar as frações ativas em maior quantidade, o EBD de *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. foi fracionado em coluna clássica (1 g de EBD), com a seguinte sequência de eluentes:

1. CHCl_3 puro - 2 frações de 25,0 mL cada (50,0 mL).
2. CHCl_3 – MeOH 1% - 2 frações de 25,0 mL cada (50,0 mL).
3. CHCl_3 – MeOH 2% - 2 frações de 25,0 mL cada (50,0 mL).
4. CHCl_3 – MeOH 3% - 2 frações de 25,0 mL cada (50,0 mL).
5. CHCl_3 – MeOH 4% - 2 frações de 25,0 mL cada (50,0 mL).
6. CHCl_3 – MeOH 5% - 2 frações de 25,0 mL cada (50,0 mL).
7. CHCl_3 – MeOH 6% - 2 frações de 25,0 mL cada (50,0 mL).
8. CHCl_3 – MeOH 7% - 2 frações de 25,0 mL cada (50,0 mL).
9. CHCl_3 – MeOH 8% - 2 frações de 25,0 mL cada (50,0 mL).
10. CHCl_3 – MeOH 9% - 2 frações de 25,0 mL cada (50,0 mL).
11. CHCl_3 – MeOH 10% - 2 frações de 25,0 mL cada (50,0 mL).

Foram obtidas 22 novas frações e estas foram submetidas à cromatografia de camada delgada, utilizando como sistema solvente o clorofórmio-metanol 1% e como revelador o anisaldeído. O perfil cromatográfico dessas frações está descrito na figura 4.

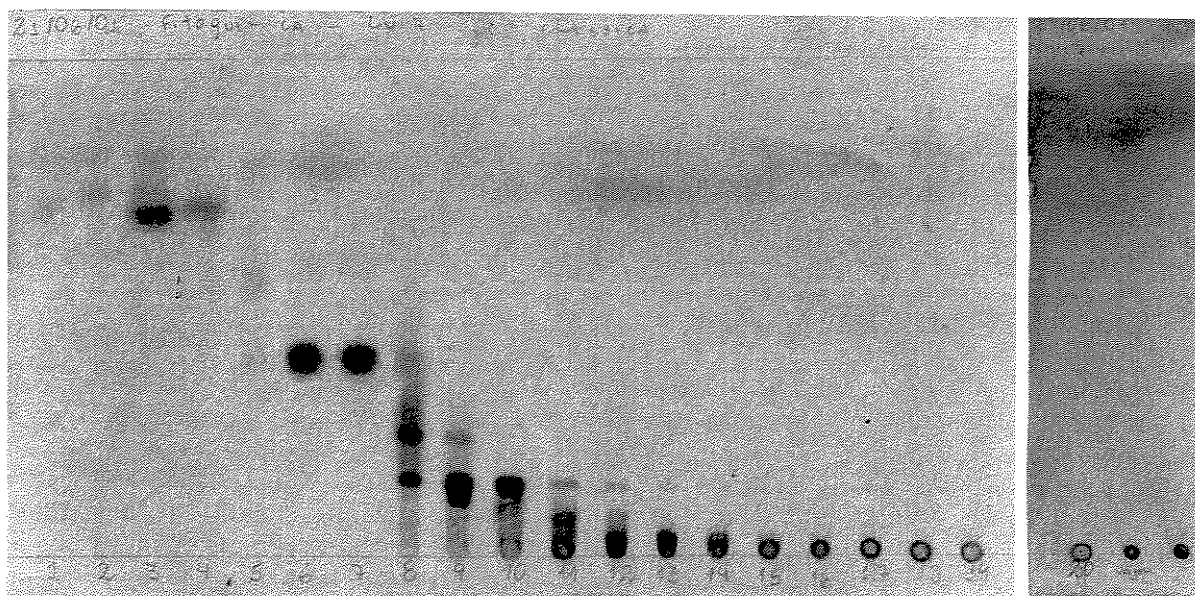


Figura 4: Perfil cromatográfico das 22 frações obtidas a partir de EBD da *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.

De acordo com o perfil cromatográfico, as frações foram reagrupadas como segue: frações 1 a 5 (30,0 mg), frações 6 a 7 (80,0 mg); fração 8, frações 9 a 10, frações 11 a 12 (75,0 mg) e frações 13 a 22 (50,0 mg). As frações foram codificadas como demonstrado abaixo e seu perfil cromatográfico das mesmas está descrito na figura 5:

- Fração A₁ – frações 6 e 7.
- Fração B₁ – fração 8.
- Fração C₁ – frações 9 e 10.
- Fração D₁ – frações 11 e 12.
- Fração E₁ – frações 13 à 22.

Todas estas frações foram submetidas à teste de avaliação de atividade antiproliferativa.

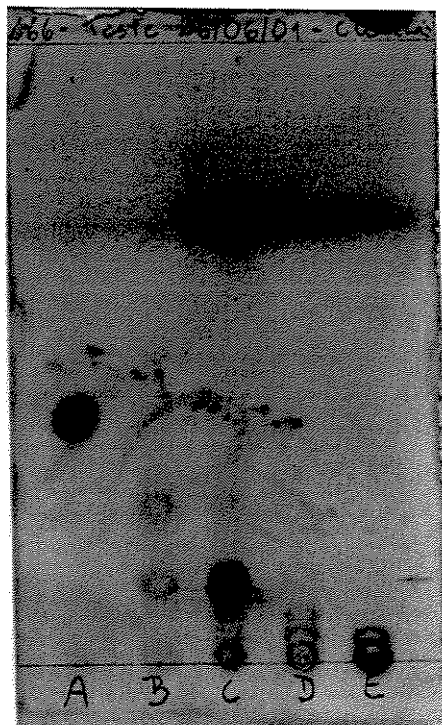


Figura 5: Perfil cromatográfico das frações A₁, B₁, C₁, D₁ e E₁ obtidas a partir da *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.

1.4.5. Purificação da Fração C

Dando continuidade ao processo de fracionamento fitoquímico, os trabalhos prosseguiram no sentido de obter maiores quantidades da fração C, assim como purificá-la, utilizando uma outra técnica de fracionamento, a coluna clássica. Assim, foram geradas 8 novas frações (B, D, E, F, G, H, I e J) que foram submetidas a avaliação de atividade antiproliferativa. O perfil cromatográfico destas frações é demonstrado na figura 6.



Figura 6: Perfil cromatográfico das frações obtidas a partir do extrato bruto diclorometânico de *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.

Os resultados demonstraram que somente as frações H, I e J foram capazes de reduzir a porcentagem de crescimento das células tumorais humanas, de forma concentração-dependente, mas só a fração I apresentou seletividade celular para a linhagem tumoral K-562 (leucemia). Entretanto as quantidade obtidas destas frações foram insuficientes para a continuidade dos estudos e ainda existia a necessidade de purificar as mesmas a fim de isolar o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(is) pela atividade farmacológica observada.

Portanto, foi realizada uma coluna clássica preparativa a partir da fração J e as frações obtidas foram reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico, gerando agora uma fração que apresentava o mesmo valor de R_f daquela anteriormente ativa. O perfil cromatográfico desta fração é demonstrado na figura 7 do anexo.

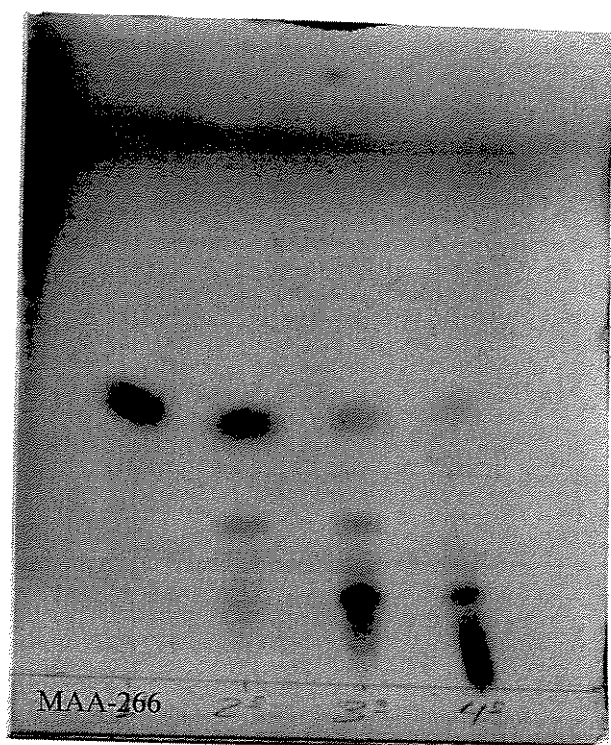


Figura 7: Perfil cromatográfico das frações obtidas a partir da coluna clássica preparativa de *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.

A análise do perfil desta fração na cromatoplaça demonstrou que a mesma tratava-se apenas de uma mancha isolada, sugerindo ser um composto puro, que foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (detector DAD).

Os resultados evidenciaram apenas 01 (um) pico em 8.7 min, bastante evidente em 823 nm (figura 21 do anexo), mostrando que realmente tratava-se uma substância única neste comprimento de onda. Esta substância, que recebeu o código de designação MAA-266, foi então submetida a avaliação da atividade antiproliferativa e demonstrou atividade antitumoral concentração-dependente, com seletividade celular para as linhagens tumorais 786-0 (renal) e MCF-7 (mama) (figura 8).

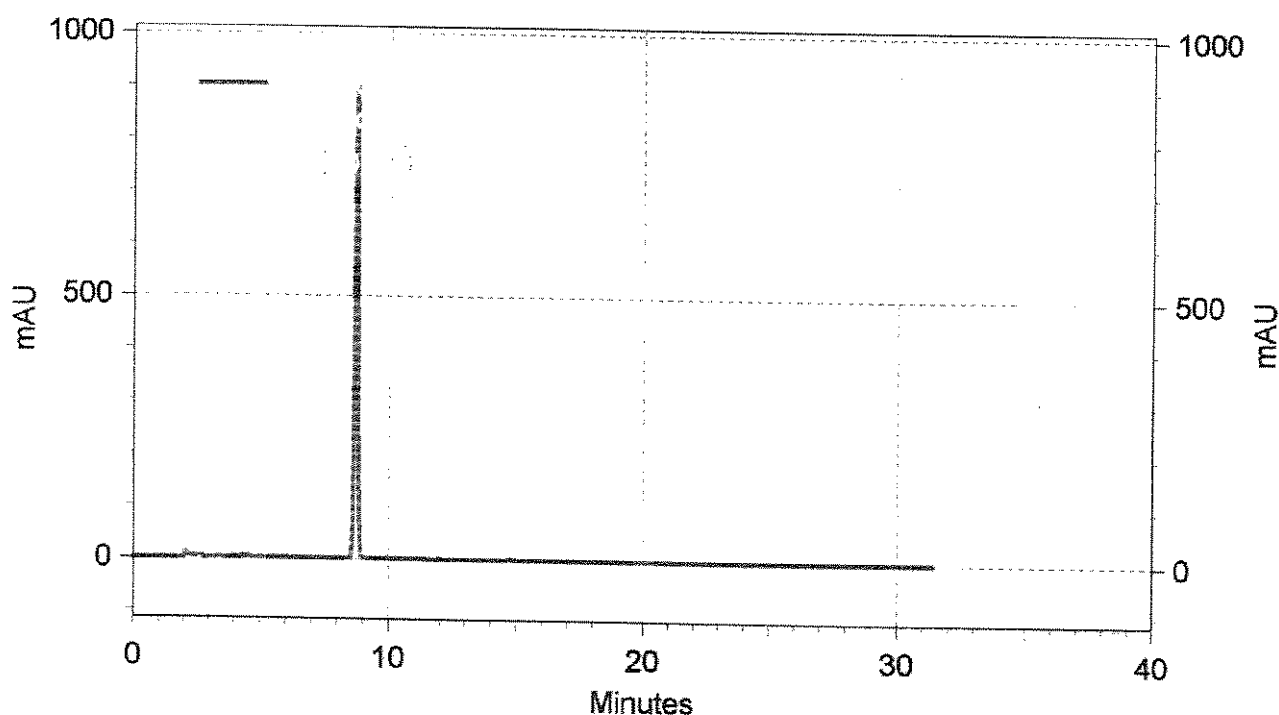


Figura 8 – Cromatograma observado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de MAA-266 obtido de *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.

Neste momento, acreditamos que MAA-266 é um do(s) composto(s) responsável(is) pela ação antiproliferativa conferida à *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. e os trabalhos foram direcionados no sentido da elucidação da estrutura. Assim, MAA-266 foi enviada ao Instituto de

Química (IQ) da UNICAMP para testes de ressonância magnética nuclear (RMN), rotação óptica e infravermelho, que permitiram identificar quimicamente a mesma.

Além disso, foram repetidos todos os procedimentos utilizados para a obtenção de MAA-266, a fim de obtermos maior quantidade do composto para submetê-lo a testes de atividade antitumoral in vivo e ao estudo do mecanismo de ação antiproliferativo. Até o presente momento já foram obtidos 128,7 mg deste composto.

1.4.6. Caracterização química de MAA-266

Através de comparação dos espectros de RMN¹H, RMN¹³C com dados de modelos de terpenos (Mahato, 1994), dados de infravermelho e massas, MAA-266 identificado, através de análise conjunta de seus dados espectrais, como um terpeno. O espectro de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (INOVA 500 MHz) é apresentado na figura 9 e a estrutura química de MAA-266 demonstrada na figura 10.

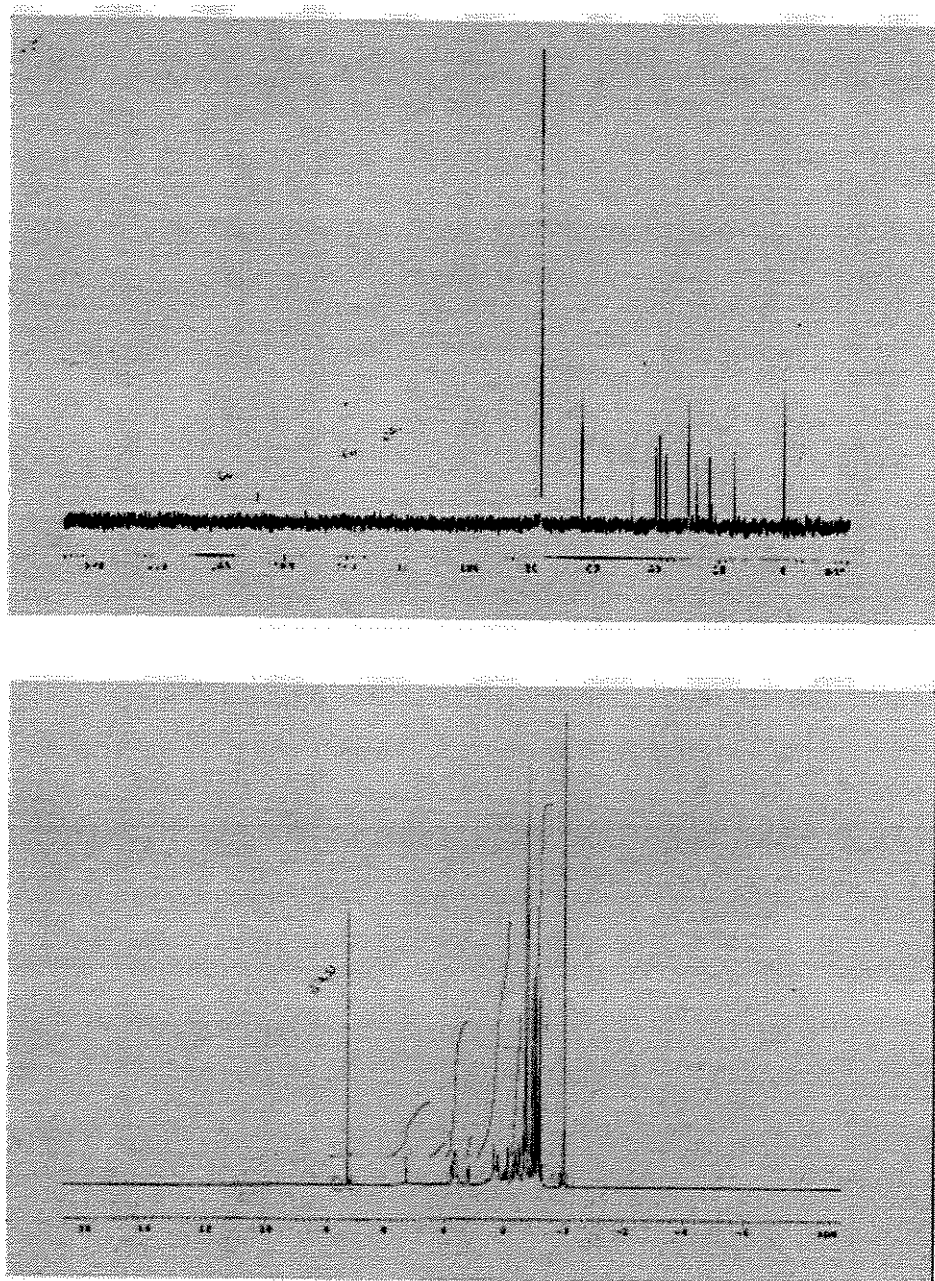


Figura 9: Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (INOVA 500 MHz) do composto MAA-266.

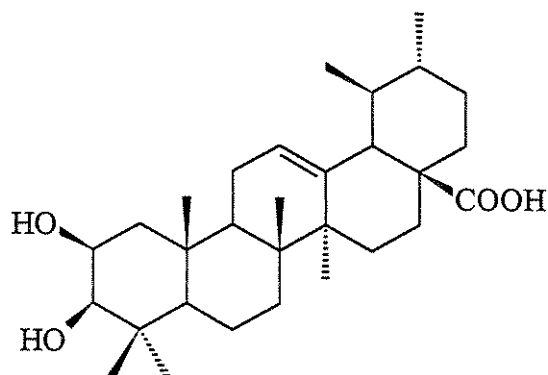


Figura 10: Estrutura molecular do composto MAA-266 obtido da *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.

O composto MAA-266 foi identificado através de análise conjunta de seus dados espectrais. O sinal largo em 414 cm^{-1} correspondente ao OH e banda em $1686,4\text{ cm}^{-1}$ correspondente a carbonila do grupo ácido do composto MAA-266 no espectro de infravermelho. O ion molecular 470 para MAA-266 observado no espectro de massas aliado a presença de 30 sinais de carbono observados no RMN ^{13}C permitiram juntamente com os dados do experimento DEPT (135° e 90°) sugerir a formula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$. Este dados estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Correlação dos dados ^1H , ^{13}C NMR do composto MAA-266 isolado de *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn..

Carbono	Tip e	Correlações H- ^{13}C	Correlações H-H	Composto MAA-266
1	CH ₂	1,62 e 1,65	H ₉ , H ₁₅ , H ₁₆ , H ₁₈	38,5
2	CH	3,75	-	72,0
3	CH	3,14	H ₂₂	78,7
4	C ^o	-	-	38,6
5	CH	0,64	H ₁₉	55,1
6	CH ₂	0,83	H ₇	18,2
7	CH ₂	1,28	H ₅ , H ₆ , H ₉	32,9
8	C ^o	-	-	39,6
9	CH	1,5	H ₁₁	47,4
10	C ^o	-	-	36,6
11	CH ₂	1,85	H ₁₂ , H ₉ , H ₁₆	23,1
12	CH	5,2	H ₁₁	125,2
13	C ^o	-	-	138,1
14	C ^o	-	-	41,9
15	CH ₂	0,98 e 1,3	H ₆ , H ₁₆	27,9
16	CH ₂	1,09 e 1,84	H ₁₅ , H ₁₁	24,1
17	C ^o	-	-	47,5
18	CH	2,21	H ₁₉	52,6
19	CH	1,33	H ₁₈	39,0
20	CH	1,74	H ₁₆	38,7
21	CH ₂	1,28 e 1,02	H ₉ , H ₁	30,6
22	CH ₂	1,7	H ₁₆	36,6
23	CH ₃	1,1	H ₂₄	28,0
24	CH ₃	0,84	H ₂₃	16,9
25	CH ₃	0,92	H ₂₄ , H ₂₆	16,6
26	CH ₃	0,93	H ₂₅ , H ₂₀	15,3
27	CH ₃	1,09	H ₂₃	23,4
28	C ^o	-	-	180,1
29	CH ₃	0,88	H ₁₉	17,0
30	CH ₃	0,96	H ₂₀	21,1